



МЕТОДИЧНИ НАСОКИ ЗА ДИАГНОСТИКА НА ТУМОРИ НА ЛИМФОИДНАТА ТЪКАН

ВЕРСИЯ 1.0 ОТ 12.03.2005

МЕТОДИЧНИТЕ НАСОКИ СА ИЗГОТВЕНИ ОТ ЕКИП В СЪСТАВ:

АВТОРИ: ст.н.с. II ст. Маргарита Генова, д.м.; проф. Иван Вълков, д.м.н. (Национален център по хематология и трансфузиология, София), доц. Светлана Христова, д.м. (Медицински университет, Катедра по обща и клинична патология, София); СЪТРУДНИЦИ: д-р Йохан Димитров; д-р Велизар Шиваров; д-р Весела Николова (Национален център по хематология и трансфузиология)

ПРИЧИНИ ЗА РАЗРАБОТВАНЕ НА МЕТОДИЧНИ НАСОКИ ЗА ДИАГНОСТИКА НА ТУМОРИ НА ЛИМФОИДНАТА ТЪКАН:

1. Лечението на лимфомите зависи непосредствено от точния субтип на лимфома, стадия и общото клинично състояние на болния. Значението на хистологичния субтип при диагнозата за хода на заболяването и избора на терапевтичен подход е доказано от значими клинични проучвания.

Хистопатологичната диагноза е от значение за:

- 1.1. определяне на група прогностичен риск при конкретния болен
- 1.2. определяне на подходяща схема на лечение при конкретния болен
- 1.3. определяне на групи на болни при включването им в клинични проучвания
- 1.4. осигуряване на правилна регистрация на туморите на хемопоеичната и лимфоидна тъкан, което е от значение за определяне на националната здравна политика и планиране на медицинските дейности и обезпечаване с медикаменти в областта.

2. Хематопатологията е област на бързо и непрекъснато навлизане на диагностични методи в рутинната практика. През последните години все повече нови таргет-ориентирани медикаменти станаха достояние на клиничната хематология, използването на които е пряко свързано с възможността за установяване на съответните “мишени”(антигени, генетични аберации и др.) при конкретния болен. Това изисква условия за съхраняване на материал за последващи изследвания и потвърждаване на диагнозата.

3. Епидемиологията на туморите на хемопоеичната и лимфоидна тъкан варира в отделните страни и е сложно зависима от редица популационни, генетични, инфекциозни и други фактори и само коректната регистрация позволява изучаването на разпространението на отделните заболявания в дадена страна. Настоящите насоки не могат да формулират очакваната честота на диагностициране на отделните нозологични единици в България, като насока за патолозите, поради липса на системни проучвания досега. Коректното регистриране на окончателната диагноза и анализът на данните след определен период от време би позволил адекватно преработване на настоящото ръководство за нуждите на България.

Номенклатурата на лимфомите винаги е била спорна област, свързана от една страна с дефиниране на клинично неприложими патохистологични класификации, а от друга, с включване на болни от различни нозологии в едни същи клинични категории. Използването на различни класификационни схеми (Килска класификация в Европейските страни и класификацията на Lukes and Collins и съответно Working formulation в САЩ) доведе до пълна несъпоставимост на данните за епидемиологията,

разпространението, клиничния ход и преживяемостта при болните с лимфоми.

През 1994 година, International Lymphoma Study Group, в състава на която влизат хематопатолози от различни страни по света, предлагат така наречената REAL (Revised European American Lymphoma) класификация. Предварителното условие в този проект е формулирането на класификационна схема, в която отделните заболявания да са характеризирани с цялата достъпна за практиката информация – морфологична, имунофенотипна, цитогенетична, информация за клиничните прояви и клиничния ход. Така създадената класификация използва терминологията на Килската класификация, като отграничава нодалната от екстранодалната локализация като съществен прогностичен параметър.

Възпроизводимостта, практическата приложимост и клиничното значение на REAL-класификацията е валидирана в широко мащабно многоцентрово проучване и се потвърждава в резултатите, публикувани през 1997 година в окончателния доклад от “Проекта за Класификация на Не-ходжкинови лимфоми” (Non-Hodgkin’s Lymphoma Classification Project). За по-голямата част от заболяванията е установена възпроизводимост над 85-95% на диагнозата. Очертава се решаващата роля на имунофенотипизацията особено в групата на периферните Т-клетъчни лимфоми. Анализът на данните показва, че групирането на болните само съобразно прогностичния индекс води до включване на различни нозологични единици в групите, които изискват различен терапевтичен подход. Така че приложението на REAL класификацията се оказва не само практично за диагностиката, но и за вземане на конкретни клинични решения.

Основавайки се на тези анализи, Световната здравна организация приема този подход като база за класификация на туморите на лимфоидната тъкан. Възложено е на 52 патолози от различни страни в няколко работни групи, с подкрепата на консултативен комитет от 35 клинични специалисти, да разработят предложение за обща класификация на миелоидните и лимфоидни неоплазии. Запазена е терминологията на REAL класификацията, като са направени малки промени в определянето на отделни нозологични единици. Предложението е подложено на широка дискусия и е прието от привъженците на различни класификационни схеми като новия международен стандарт в областта на хематологията.

Окончателният вариант е публикуван пред 2001 година в серията “сини книги” на СЗО и съдържа дефинициите, както и илюстрира отделните нозологични категории морфологично, имунофенотипно и цитогенетично.

Класификация

Класификацията на Световната здравна организация на хематологичните неоплазии е международно възприетата таксономия за лимфопротрофративните заболявания и е основна за диагнозата, класифицирането и клиничното поведение при болни с лимфоми (Таблица 1).

Препоръка

Препоръчва се всяка лаборатория, ангажирана в диагностиката на хематологичните неоплазии, да разработи стандартна оперативна процедура за практическото приложение на тази класификация, като формулира ясно номенклатурата и използваните диагностични критерии.

1. Таксономична структура

Класификацията на СЗО разглежда неоплазиите на лимфоидната тъкан в три големи групи: В-клетъчни неоплазии, Т-и НК-клетъчни неоплазии и Ходжкинови лимфоми. От своя страна, В-клетъчните и Т-и НК-клетъчни неоплазии се подразделят на такива от прекурсорен клетъчен произход (лимфобластни левкемии/лимфоми) и на такива, които произхождат от вероятни по-късни етапи в В- и Т/НК-клетъчната онтогенеза (перифирни или зрели неоплазии). Идентифицирани са и единици, групирани в зависимост от първичната проява – дисеминирана/левкемична, първично екстранодална или предимно нодална. Настоящата класификация не дефинира степен на малигненост.

2. Трудности при класифицирането

3.1. Некласифицируеми лимфоми.

Независимо, че СЗО класификацията не предвижда категория “Некласифицируеми лимфоми”, в практиката остава малък дял случаи, които не могат да бъдат класифицирани (поради неадекватен материал, липса на имунофенотипно изследване или поради обективна невъзможност). Тези случаи трябва да бъдат категоризирани до максималната възможна степен, но не трябва непременно да бъдат отнасяни към определена нозологична категория, ако не отговарят на минималния брой диагностични критерии, специфични за нея. Например, “В-клетъчен лимфом, некласифицируем, вероятно с висока степен на малигненост поради висока митотична активност”.

3.2. Лимфоми в “сивата зона”.

В редки случаи е невъзможно категорично отграничаване на Неходжкинов от Ходжкинов лимфом дори от опитни експерти, поради значително морфологично и имунофенотипно припокриване. Най-често затрудненията са по отношение на Ходжкинов лимфом – нодуларен с лимфоцитно преобладаване и В-клетъчен лимфом с богатство на Т-лимфоцити, или класически Ходжкинов лимфом от едроклетъчен анапластен лимфом. Възможно е част от тези случаи да представляват истински преходни форми между двете нозологични категории, но също така е възможно в част затрудненията да нямат същинсна биологична основа.

3.3. “Съставни лимфоми”.

СЗО класификацията не съдържа дефиниция за така наречените “съставни лимфоми”, които могат да се срещнат много рядко като едновременно наличие на два и повече морфологично отграничени Неходжкинови и/или Ходжкинови лимфоми в един и същи лимфен възел или екстранодална тъкан, които могат да бъдат или не бъдат клонално свързани.

3.4. “Дискордантни лимфоми”.

Дискордантните лимфоми се определят като хистологично отграничени лимфоми, установени едновременно или последователно в различни лимфни възли или анатомични локализации при един и същи болен, без да е зъдължителна клонална връзка между тях. Част от тези случаи представляват прогресия от ниска към висока степен на малигненост.

Препоръка

Във всички случаи от 2.3. и 2.4. хистологичният резултат трябва да съдържа всеки един от нозологичните подтипове.

Таблица 1. Класификация на туморите на лимфоидната тъкан на СЗО, 2001 (* - International Classification of Diseases (ICD-O))

В-клетъчни НЕОПЛАЗИИ

1.	Прекурсорни В-клетъчни неоплазии	
1.1.	Прекурсорна В-лимфобластна левкемия ¹ / лимфом ² (прекурсорна В-клетъчна ОЛЛ)	9835/3 ¹ 9728/3 ²
2	Зрели В-клетъчни неоплазии	
2.1.	Хронична лимфоцитна левкемия ¹ /дребноклетъчен лимфоцитен лимфом ² Вариант: Болест на мю тежките вериги	9823/3 ¹ 9670/3 ²
2.2.	В-клетъчна пролимфоцитна левкемия	9833/3
2.3.	Лимфоплазмоцитен лимфом Вариант: Болест на гамма тежките вериги	9671/3
2.4.	Спленален маргинално-зонов лимфом	9689/3
2.5.	Трихолевкоза Вариант: Трихолевкоза вариант	9940/3
2.6.	Плазмоклетъчен миелом Варианти: Несекретиращ миелом Бавноразвиващ се (индолентен) миелом Тлеещ миелом Плазмоклетъчна левкемия	9732/3
2.7.	Солитарен плазмоцитом на костта	9731/3
2.8.	Екстраосален плазмоцитом	9734/3
2.9.	Екстранодален маргинално-зонов В-клетъчен лимфом от мукозо-асоциираната лимфоидна тъкан (МАЛТ-лимфом)	9699/3
2.10.	Нодален маргинално-зонов В-клетъчен лимфом	9699/3
2.11.	Фоликуларен лимфом ¹ Степен 1 ² Степен 2 ³ Степен 3 ⁴ (3а; 3в) Тип: Фоликуларен; Фоликуларен и дифузен; Дифузен Варианти:	9690/3 ¹ 9691/3 ² 9695/3 ³ 9698/3 ⁴

	Дифузен лимфом от фоликулния център (степен 1; степен 2) Кожен лимфом от фоликулния център	
2.12.	Мантелно-клетъчен лимфом Варианти: Бластоиден класически вариант Бластоиден плеоморфен вариант	9673/3
2.13.	Дифузен В-едроклетъчен лимфом Варианти: Центробластен Имунобластен С богатство на Т-клетки/хистиоцити Анапластичен	9680/3
2.14.	Медиастинален (тимусен) В-едроклетъчен лимфом	9679/3
2.15.	Интравакуларен В-едроклетъчен лимфом	9680/3
2.16.	Първичен лимфом в изливи в телесните кухини (ефузионен)	9678/3
2.17.	Бъркитов лимфом ¹ /левкемия ² Варианти: С плазмоцитойдна диференциация Атипичен Бъркитов/Бъркитоподобен	9687/3 ¹ 9826/3 ²
3	В-клетъчни пролиферации с несигурен малигнен потенциал	
3.1.	Лимфоматоидна грануломатоза	9766/1
3.2.	Пост-трансплантационен лимфопролиферативен процес, полиморфен	9970/1*

Т- и НК-клетъчни неоплазии

1.	Прекурсорни Т-клетъчни неоплазии	
1.1.	Прекурсорна Т-лимфобластна левкемия ¹ / лимфом ² (прекурсорна В-клетъчна ОЛЛ)	9837/3 ¹ 9729/3 ²
1.2.	Бластен НК-клетъчен лимфом	9727/3
2	Зрели Т-клетъчни и НК-клетъчни неоплазии	
2.1.	Т-клетъчна пролимфоцитна левкемия	9834/3
2.2.	Т-клетъчна левкемия от големи гранулирани лимфоцити (Т-LGLL)	9831/3
2.3.	Агресивна НК-клетъчна левкемия	9948/3
2.4.	Т-клетъчна левкемия/ лимфом на възрастните	9827/3
2.5.	Екстранодален НК/Т-клетъчен лимфом, назален тип	9719/3
2.6.	Ентеропатичен тип Т-клетъчен лимфом	9717/3
2.7.	Хепатоспленален Т-клетъчен лимфом	9716/3
2.8.	Субкутанен панакулитоподобен Т-клетъчен лимфом	9708/3
2.9.	Микозис фунгоидес	9700/3
2.10.	Синдром на Sezary	9701/3
2.11.	Първичен кожен анапластен едроклетъчен лимфом	9718/3
2.12.	Периферен Т-клетъчен лимфом, неуточнен	9702/3
2.13.	Ангиоимунобластен Т-клетъчен лимфом	9705/3
2.14.	Анапластичен едроклетъчен лимфом	9714/3
3	Т-клетъчни пролиферации с несигурен малигнен потенциал	
3.1.	Лимфоматоидна папулоза	9718/1

Ходжкинов лимфом

1.	Ходжкинов лимфом – нодуларен с лимфоцитна преобладаване	9659/3
2.	Класически Ходжкинов лимфом	9650/3
3.	Класически Ходжкинов лимфом – нодуларна склероза	9663/3
4.	Класически Ходжкинов лимфом – с богатство на лимфоцити	9651/3
5.	Класически Ходжкинов лимфом – смесен клетъчен състав	9652/3
6.	Класически Ходжкинов лимфом – лимфоцитно изчерпване	9653/3

ЛАБОРАТОРНА ДИАГНОСТИКА.

1. Диагностицирането на туморите на лимфоидната тъкан трябва да се осъществява в лаборатории с необходимите специалисти и материално-техническо обезпечаване. При липса на такива е необходимо преразглеждане на диагностичния материал в профилирана лаборатория.

2. Препоръчва се лабораториите по хистопатология да определят персонално патолог със специален интерес към хематологичните заболявания, чиито задачи да бъдат: създаване на условия (оборудване, реагенти, квалификация) за изпълнение на пълния обем изследвания; оценка на костно-мозъчния статус; обмен на клинична информация; ефективна връзка със звена, които осъществяват медицински дейности и изследвания на болните с лимфоми; участие в Хематологичен комитет, функциониращ в съответното лечебно заведение. Така ще се гарантира изследването на адекватен за диагнозата материал и изготвянето на заключение.

3. Профилираната лаборатория трябва да е в състояние да осъществява в пълен обем или да има ефективен механизъм за достъп до следните диагностични подходи:

3.1. Морфологична експертиза.

Специализираните лаборатории трябва да разполагат с обучен и опитен в диагностиката на хематологичните неоплазии персонал, който да е в състояние да осъществява профилирана цитологична и хистологична оценка на хематологични заболявания.

3.2. Имунофенотипизиране.

Лабораторията трябва да е в състояние да изследва имунофенотипни маркери, валидиращи морфологичната диагноза на лимфомите и/или имат съществено прогностично значение. Имунофенотипизацията може да се осъществява чрез имунохистохимично и/или флоуцитометрично изследване. Лабораторията трябва да формулира за себе си използването на единия или и на двата подхода.

3.3. Молекулярно-биологични изследвания.

Понастоящем, основните техники, които се прилагат в клиничната практика са полимеразната верижна реакция (polymerase chain reaction, PCR), за установяване на клоналност и някои характерни транслокации, и флуоресцентната in situ хибридизация (fluorescent in situ hybridization, FISH) за установяване на транслокации и бройни хромозомни аномалии. Тези подходи се прилагат, аналогично на имунофенотипното изследване, за валидиране на диагнозата и идентифициране на прогностични фактори.

4. Специализираната лаборатория трябва да притежава ефективно действащ механизъм, който да осигурява съпоставка на всички материали, взети за изследване в хода на заболяването (от различни локализации – лимфни възли, костен мозък и др., към момента на

Comment: Класическата цитогенетика има ограничено приложение при диагностиката на лимфомите. Възможно е приложението ѝ при Бъркитов тип левкемия/лимфом например. Новите методики за генотипизиране (т. нар. биочипове) са в процес на разработване и понастоящем са практически неприложими за българските условия.

поставяне на диагнозата или при проследяване и оценка на евентуални рецидиви).

5. Резултатът от цялостното лабораторно изследване за диагностициране и класифициране на лимфоидна неоплазия трябва да бъде изготвен преди началото на терапията.

5.1. Лабораторията трябва да е в състояние да изготви предварителен хистологичен резултат за 5 работни дни от получаване на биологичния материал за изследване.

5.2. В част от случаите молекулярно-биологичните изследвания могат да изискват по-продължителен период. Необходимо ясно да бъде посочено до каква степен окончателната диагноза или субкласифициране е зависима от тях или има отношение към оценката на прогностичния риск.

5.3. При получаване на резултатите от пълния обем изследвания, трябва да се изготви цялостен актуализиран резултат.

6. Лабораторията трябва да притежава ефективен механизъм за осигуряване на качество.

6.1. Лабораторията трябва да притежава разработена система за Вътрешен качествен контрол.

6.2. Лабораторията трябва да участва винаги, когато това е възможно в системи за Външен качествен контрол.

7. Лабораторията трябва да изработи ефективен механизъм за обсъждане на всеки диагностичен случай от мултидисциплинарен екип, съставен от специалисти, които участват в диагнозата и лечението на болни с хематологични неоплазии (за кратко Хематологичен комитет).

7.1. Всеки новодиагностициран болен трябва да бъде обсъден от Хематологичния комитет преди съставяне на лечебния план.

7.2. Хематологичният комитет трябва да обсъжда всички новодиагностицирани болни и болни с рецидив.

8. Резултатът от хистопатологичното изследване на болен с неоплазия на лимфоидната тъкан може да е предварителен или окончателен, което задължително трябва да бъде вписано върху подписания резултат от извършилия изследването специалист .

8.1. предварителен е резултат, изготвен на базата на морфологично изследване, който не съдържа данни от имунофенотипно изследване, данни за костно-мозъчен статус, цитогенетично изследване (където това е приложимо) и не е обсъден от мултидисциплинарен комитет от специалисти, който консултира всеки новодиагностициран болен с хематологична неоплазия (за по-кратко, Хематологичен комитет). Предварителният резултат може да не съдържа точния субтип на неоплазията съгласно МКБ –10-О-3

8.2. окончателен е резултат, който съдържа описание и обсъждане на данните от морфологичното и имунофенотипно изследване, костно-мозъчния статус, цитогенетично изследване (където това е приложимо) и е обсъден от Хематологичен комитет. Окончателният резултат съдържа точния субтип и код на неоплазията съгласно МКБ 10 – 0.3.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ

Биопсични техники

1. За диагностициране на неоплазиите на лимфоидната тъкан най-често се използва материал от ексцизионна биопсия на лимфен възел. При засягане на екстра-нодални локализации диагнозата се основава на хистобиопсично изследване на материал от съответния орган (храносмилателен тракт, кожа, слезка, костен мозък или др.).
2. Препоръчва се биопсията да се планува след обсъждане между кленичен хематолог, хирург и патолог. Предварителна оценка на диференциална кръвна картина би предотвратило ненужни биопсии при болни с остри левкемии и хронична лимфоцитна левкемия.
3. Направлението за хистопатологично изследване трябва да съдържа точна информация за локализацията на биопсирания материал и клинични и лабораторни данни, съществени за класифицирането на неоплазията съгласно класификацията на СЗО.
 - 3.1. По правило, материалът за изследване се изпраща от хирург. Препоръчва се направлението към лабораторията да съдържа името на клиничния хематолог, назначил биопсията.
 - 3.2. Направлението за изследване трябва да съдържа следната информация:
 - Демографски данни - пол, възраст, раса (където това е необходимо)
 - Дата на вземане на материала
 - Точна локализация на биопсирания материал
 - Данни за разпространение на заболяването – лимфаденомегалия, органомегалия
 - Клинично протичане, клинични белези на биологична активност
 - Важни лабораторни показатели
 - Данни за съпътстващо състояние, свързано с имунен дефицит (HIV, EBV, автоимунни заболявания, вроден имунен дефицит и др.)
 - Данни за предхождащо неопластично заболяване
 - Имена на хирурга, осъществил биопсията. Имена на клиничния хематолог, назначил биопсията.
 - 3.3. Препоръчва се специализираните лаборатории да изготвят специален фиш-направление за болни с хематологични неоплазии .
4. За диагнозата е необходима оценка на всички хистологични препарати, при наличието най-малко на един парафинов блок, представителен за тумора.
5. Ако материалът не е представителен за определяне на диагнозата (недостатъчен, неадекватно обработен, взет извън локализацията на неопластичния процес и т.н.) се пристъпва към повторна биопсия.
6. Тънкоиглената аспирационна биопсия или тънкоиглената true-cut биопсия на лимфен възел или друг орган не се препоръчва за първоначално диагностициране на лимфом. Тя може да се приеме

само по изключение, при невъзможност за добиване на по-голям биопсичен материал чрез хирургична интервенция и когато е съчетана с адекватно имунофенотипно изследване на неопластичната популация.

7. За осигуряване на оптимална диагностика на лимфомите се препоръчва спазването на определени правила при обработката на биопсичния материал.

7.1. Транспортиране на биопсичния материал.

- Препоръчителна е работа с нефиксиран материал.
- Материалът се транспортира по най-бързия начин до патохистологичната лаборатория в затворен стерилен съд и съпроводен от направление съгласно 3.2.
- Трябва да се избягва изсъхване на материала. Препоръчва се пренасянето му увит в напоена с физиологичен серум хартия или в съд със стерилен физиологичен серум, разтвор на HANKs или среда RPMI 1640 на стайна температура до 2 часа или при 4°C до 24 часа. Да не се допуска замръзване на материала.

7.2. Първична обработка на хистологичния материал

- Биопсичният материал трябва да се обработи максимално бързо, за да се съхрани морфологията и антигенните епитопи
- Лимфният възел се срязва перпендикулярно на надлъжната си ос, след което се изготвят успоредни серийни срези с дебелина около 2 мм.
- Слезката се нарязва предварително през 0,5 см за оценка на евентуални нодуларни инфилтрати. Ако консистенцията не позволява изготвяне на тънки срези се препоръчва фиксиране на тъканта, срязана през 1-1,5 см, след което се изготвят и описват допълнително тънки срези.
- Необходимо е полученият материал да бъде описан подробно – размери, цвят, консистенция, наличие или липса на видима нодуларност, кръвоизливи или некроза на срезната повърхност.
- Приготвят се няколко тупферни препарати от прясно срязаната повърхност след като еднократно се постави върху филтърна хартия за цитологична оценка и се изсушават на стайна температура.
- Най-малко два от серийните срезове се фиксират в 5-10 пъти по-голям обем фиксатор.
 - Препоръчват се фиксатори на Суза, Виен или В5 с рН 7,0. Допуска се фиксацията във 10% неутрален формалин, като задължително се контролира рН 7.0.
 - Не трябва да се допуска фиксация над 4 часа с фиксатор на Суза или В5 или над 24 часа с фиксатор на Виен или формалин поради увреждане на антигенните епитопи за имунофенотипизация.

8.1. Част от свежия материал може да бъде изпратен за цитогенетично или микробиологично изследване в съответна среда при необходимост.

- 8.2. Препоръчва се част от материала да бъде бързо замразен на -80°C или в течен азот за последващи молекулярни и/или имунологични изследвания.
9. При всеки болен с лимфом за целите на стадирането и в редки случаи, за диагноза, се изследва биопсичен материал от костен мозък (взет от *crista iliaca* чрез трепанобиопсия), при възможност с аспирация.
- 9.1. Приготвя се поне един отпечатък от костно-мозъчната биопсия за цитологично изследване.
- 9.2. Материалът се фиксира за не повече от 24 часа в буфериран 10% формалин.
- 9.3. Препоръчва се метод на декалцинация, щадящ по отношение на антигенните епитопи.
10. Необходими са тънки качествени хистологични срезове (2-4 μm), рутинно оцветени с хемалаун-еозин, оцветяване за ретикулни влакна, \pm ПАС за оценка на съдовите структури, а при нужда и оцветявания за амилоид, за желязо и по Van Gieson. В лаборатории, постигнали възпроизводими резултати при оцветяване по Giemsa, оцветяването може да предостави допълнителна информация за цитоплазмената базофилия, идентифициране на бластни клетки и мастоцити.
11. Тупфер препаратите рутинно се оцветяват по May-Grunwald-Giemsa.

Comment: Да се избягва само аспирация. Ниска степен на доказателственост за наличие на ангажиране.

Имунохистохимично изследване

1. Лаборатория, която оформя окончателна диагноза при болен с неоплазия на лимфоидната тъкан, трябва да е в състояние да провежда имунохистохимично изследване като идентифицира и локализира антигени в тъканни срези и цитологични препарати чрез съответно имунохистохимично маркиране с антитела, използвани като специфични реагенти в антиген-антитяло реакция и последваща визуализация посредством флуоресцентни бои или ензимни системи.

1.1. В някои случаи имунофенотипизирането е абсолютно задължително за формулиране на точния субтип (напр. При едроклетъчен анапластен лимфом, дифузен В-едроклетъчен лимфом и др.)

1.2. Препоръчва се имунофенотипно валидиране на диагнозата дори в случаи, при които тя може да бъде формулирана само при рутинно оцветяване (фоликуларен лимфом, болест на Ходжкин и др.), за изключване на евентуални диагностични грешки.

1.3. Имунохистохимичното изследване може да не бъде провеждано в случаи, при които малигнената популация е имунофенотипизирана чрез флоуцитометрия и няма съмнение за наличие на дискордантен лимфом или метастаза..

2. Лаборатория, която оформя окончателна диагноза при болен с неоплазия на лимфоидната тъкан, трябва да разполага с оптимален панел от антитела за имунофенотипизация (Таблица 2.)

2.1. В повечето случаи е необходим минимален панел от антитела за рутинна диагностика, които позволяват определяне на линейната принадлежност на неопластичната популация.

- 2.2. При трудни в диференциално-диагностично отношение случаи, както и при необходимост от преразглеждане на диагнозата, се прилага по-широк панел антитела.
- 2.3. Лабораторията поддържа панел от антитела в обем, съобразен с броя на диагностицираните болни с лимфоидни тумори.
- 2.4. Лабораторията трябва да е запозната с типа на оцветяването при използването на различни антитела (цитоплазмено, мембранно, ядрено), положително и отрицателно маркираните структури, евентуалните технически ограничения.
- 2.5. Лабораторията трябва да е разработила и да прилага съответни методи за амплификация на сигнала, при използване на антитела, за които това е необходимо.
- 2.6. Допуска се коопериране между лаборатории, които работят в областта на лимфоидните тумори, за постигане на икономическа ефективност и по-добро качество на диагностиката.

Таблица 2. Антитела за диагноза и субкласифициране на лимфоми.

Антитяло	Клинично приложение
CD20, CD79a	Пан-В маркери
CD5,CD10,CD23	Маркират В-клетъчни субпопулации и съответните неоплазии (лимфоцитен лимфом CD5+, CD23+; фоликуларен лимфом CD10+, CD23-, CD5-; мантелно-клетъчен лимфом CD5+, CD23-, CD10-). CD5 е Т-клетъчен маркер и маркира положително и зрели Т-лимфоцити.
Карпа/lambda леки вериги	За идентифициране на клоналност при В-клетъчни лимфоми. Технически изследването е трудно и резултатите трябва да се интерпретират с особено внимание.
Bcl-2	Маркира повечето В-клетъчни и Т-клетъчни лимфоми. Отрицателна реакция в В-лимфоцитите на центъра на реактивни лимфни фоликули и полезен за отграничаване на реактивна фоликуларна хиперплазия от фоликуларен лимфом. Не отграничава фоликуларен лимфом от други лимфоми.
Cyclin D1	Маркира положително лимфоми с t(11;14), най-често мантелно клетъчни. Технически изследването е трудно и изисква използване на системи да амплификация на цветния продукт.
CD3, CD45RO (clone UCHL1)	Пан-Т маркери
CD4, CD8, CD7	Маркират субпопулации на Т-лимфоцити и съответни неоплазии.
CD56, CD57	НК-клетъчни маркери. CD56 маркира повечето НК-клетъчни неоплазии. CD57 маркира и Т-лимфоцити в герминативни центрове и е полезен при диагнозата на Ходжкинов лимфом и нодуларен с лимфоцитно преобладаване.
CD30, CD15	Полезни за отграничаване на Ходжкинов лимфом (CD30+, CD15+) от едроклетъчен анапластен лимфом (CD30+, CD15-)

ALK1	Маркира фузионния протеин NPM-ALK, асоцииран с t(2;5) и други транслокации, засягащи ALK1 гена при едроклетъчен анапластен лимфом с добра прогноза.
Ki-67	Маркира ядрен антиген в дялящи се клетки. Полезен за дефиниране на лимфоми с висок пролиферативен потенциал, при лимфом на Бъркит – до 100%.
EBV(anti-LMP1)	Маркира EBV-положителни лимфоцити.
CD34	Маркира хемопоеични стволови клетки и част от прекурсорните лимфоидни неоплазии.

3. Всяко изследване трябва да включва положителна и отрицателна контрола.
 - 3.1. Фоновото маркиране трябва да се намали максимално чрез специфично блокиране на ендогенните субстрати в зависимост от използваната визуализираща система.
 - 3.2. Като отрицателна контрола на неспецифичното свързване на антителата трябва да се използват контролни изотипни антитела, специфични спрямо антигени, които не се срещат и не могат да бъдат индуцирани в тъкани на бозайници.
 - 3.3. Като отрицателни контроли на имунохистохимичното или имуноцитохимичното изследване с цел оценка на наличието на ендогенен субстрат на визуализиращата система в изследваните тъкани или клетки, успоредно трябва се инкубират препарати от изследвания материал, при които е пропуснато първичното антитяло.
 - 3.4. Като положителна контрола трябва да се използват тъкани или клетки, за които е известно, че са положителни за тествания антиген. При изследване на левкоцитни антигени хемопоеичната тъкан предоставя вътрешни положителни контроли за използваните анти-левкоцитни антитела.
4. За отдиференциране от неоплазии с друга хистогенеза по преценка лабораторията следва да включи и антитела срещу цитокератин, виментин, неврон-специфична енолаза и меланомни маркери.

Имунофенотипизация чрез флоуцитометрия

1. Лаборатория, която оформя окончателна диагноза при лимфоидни неоплазии трябва да е в състояние да идентифицира и характеризира имунофенотипно чрез флоуцитометрия неопластично разраснали хемопоеични клетки от различни линии на лимфоидна диференциация или да има добре функциониращ механизъм за връзка с флоуцитометрична лаборатория, осъществяваща имунофенотипизацията.
 - 1.1. Всеки биологичен материал, изпратен за имунофенотипизация, трябва да бъде изследван морфологично и при необходимост – цитохимично.
 - 1.2. Всяко несъответствие между данните от морфологичното и имунофенотипното изследване следва да бъде изяснено.
2. За имунофенотипизация чрез флоуцитометрия към диагнозата на лимфоидни неоплазии, проби за изследване се препоръчва да бъдат получени от периферна кръв или костен мозък, и по

изключение от ликвор, малигнени изливи, свеж материал от лимфни възли или туморни формации след изготвяне на клетъчна суспензия.

- 2.1. При имунофенотипизация на клетъчни суспензии, изготвени от лимфен възел, слезка или туморна формация трябва да се има предвид, че не могат да бъдат оценени топографските характеристики на изследваните популации и не винаги е възможно отграничаване на примеса от нормални резидуални и реактивни лимфоидни клетки. Интерпретацията на резултата изисква особена предпазливост и тясна колаборация с морфолог.
 - 2.2. При имунофенотипно изследване чрез флоуцитометрия на материал от клетъчни суспензии, изготвени от лимфни възли и други органи, задължително се провежда хистологично изследване на същия клиничен материал.
 - 2.3. При несъответствие на данните от имунофенотипното изследване чрез флоуцитометрия на материал от клетъчни суспензии, изготвени от лимфни възли и други органи, и хистологичното изследване на същия клиничен материал, за показателен се приема хистологичният резултат, съчетан с имунохистохимично изследване.
3. Имунофенотипизация на лимфоидни неоплазии чрез флоуцитометрия предоставя възможност за бързо, чувствително и възпроизводимо определяне на имунофенотипа на неопластичната популация в част от нозологичните субтипове:
- 3.1. имунофенотипизацията чрез флоуцитометрия е диагностичен подход от първа линия (заедно с морфологията) при прекурсорни лимфобластни левкемии, хронична лимфоцитна левкемия, трихоловкозата, пролиферациите от големи гранулирани лимфоцити, като значимо повишава диагностичната прецизност и възможностите за отграничаване от други лимфопролиферативни процеси, и по този начин дава съществена информация за по-нататъшното клинично поведение.
 - 3.2. имунофенотипизацията чрез флоуцитометрия има ограничено приложение за първоначално диагностициране на плазмноклетъчни дискразии или миелом
 - 3.3. имунофенотипизацията чрез флоуцитометрия не е показателна за определяне на неопластичната популация при болни с Ходжкинов лимфом
 - 3.4. имунофенотипизация на периферна кръв се препоръчва при възрастни с неясна персистираща лимфоцитоза преди костно-мозъчно изследване
 - 3.5. имунофенотипизация на периферна кръв не се препоръчва като скринингово изследване за лимфопролиферативно заболяване при липса на абсолютна лимфоцитоза, морфологични данни за абнормни лимфоидни клетки или спленомегалия

- 3.6. при вземане на материал от костен мозък за стадиране на болни с лимфоми е уместно отделяне на част от него за евентуално имунофенотипно изследване.
4. Имунофенотипизиране на лимфоидни неоплазии с флоуцитометрия трябва да се провежда минимум с валидирана двуцветна имунофлуоресценция (4-параметърна флоуцитометрия). С използването на 5- или 6-параметърен анализ се увеличава възможността за идентифициране и характеризиране на абнормна популация в рамките на хетерогенната проба.
5. Лаборатория, която провежда флоуцитометрия при болни с неоплазии на лимфоидната тъкан, трябва да разполага с оптимален панел от антитела за имунофенотипизация (Таблица 3.).

Таблица 3. Антитела, значими за диагнозата и субкласифицирането на лимфоидни неоплазии в периферна кръв и костен мозък

	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>Трети цвят</i>	<i>Четвърти цвят</i>
Моноклонални антитела за В-клетъчни лимфоидни неоплазии	Ig kappa	Ig lambda	CD19	CD20
	CD103	CD22	CD19	CD11c
	CD5	CD10	CD19	CD38
	CD34*	CD133*	CD19	CD38
	CD20	CD22	CD19	CD38
	CD10	CD34*	CD19	CD20
	CD23	FMC7	CD19	HLA-DR
	cyCD79a	CD79b	CD19	CD20
	Smlg	cyI μ	CD19	CD20
Комбинации от МА за Т/ НКклетъчни лимфоидни неоплазии	CD10	CD5	CD3	CD7
	CD1a	CD38	CD3	CD7
	CD2	CD57	CD8	CD7
	CD16	CD56	CD8	CD7
	CD4	CD8	CD3	CD7
	TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$	CD3	CD7
	CD33*	CD117*	CD34*	CD7

Забележка: * - антитела, значими при диагностиката на прекурсорни лимфоидни неоплазии; FITC – fluorescein thiocyanat, PE – phycoerythrin, трети цвят – PerCP или ECD; четвърти цвят - PE-Cy5 или APC в зависимост от флоуцитометъра.

6. Тест панелът следва да бъде подбран така, че да включва поне един антиген с ярка експресия върху повечето клетки в пробата, какъвто е CD45.
7. Като отрицателна контрола на неспецифичното свързване на антителата трябва да се използват контролни изотипни антитела, специфични спрямо антигени, които не се срещат и не могат да бъдат индуцирани в тъкани на бозайници, конюгирани със съответните флуорохроми.
8. Резултатите при повтарящо се антияло (антитела) в рамките на тест панела на пациента трябва да са устойчиви (в границите на 5%),

освен ако рутинно не се получава по-голяма разлика, поради използването на различни флуоресцентни маркери или антитела, разпознаващи различни антигенни епитопи, което се препоръчва да бъде отразено в резултата.

9. Резултатите се представят като процент положително маркирани клетки в електронния прозорец на предполагаемите неопластични клетки и включва коментар за линейната принадлежност и степен на съзряване.
 - 9.1. При получаване на абнормална реактивност (по-висок или по-нисък интензитет на светене от наблюдавания върху нормални клетки, аберантно съчетаване на линейно-асоциирани антигени и др.) резултатът би трябвало да включва и описание (слабо или с нисък интензитет и/или ярко или с висок интензитет, линейно-кръстосана или асинхронна експресия и т.н.).

Цитогенетични и молекулярни изследвания.

1. Цитогенетичните и молекулярни изследвания по правило изискват свеж или замразен най-малко на -80°C биологичен материал от периферна кръв, костен мозък, лимфен възел или туморна формация.
 - 1.1. Екстракция на ДНК може да се осъществи и от фиксирани във формалин и включени в парафин хистологични материали.
 - 1.2. FISH може да се осъществи и върху тънки хистологични срези от фиксиран във формалин и включен в парафин хистологичен материал.
 - 1.3. Препоръчително е въвеждане на процедури за замразяване на биологичен материал към диагнозата от болни с неоплазии на лимфоидната тъкан.
2. Изследването на клоналност [гени на имуноглобулиновите тежки вериги – IgH, и T-клетъчните рецептори – TCR] чрез PCR може да бъде особено полезно в диагностично трудни случаи за отграничаване на клонални неопластични процеси от реактивни състояния или определяне на линия на диференциация (B-клетъчна, T- или NK-клетъчна), без да е задължително във всички.
3. Изследването на бройни и структурни хромозомни аберации чрез конвенционална кариотипизация, FISH или PCR може да даде съществена информация за прогнозата в определени нозологични субтипове.
4. Изследването на клонални маркери или определени бройни или структурни хромозомни аберации чрез FISH или PCR може да предостави молекулярен маркер за мониториране на лечението при даден болен в периферна кръв и/или костен мозък и оценка на пълен терапевтичен отговор (напр. Изследване на bcl2/IgH при фоликуларни лимфоми, лекувани с анти-CD20 медикаменти – Mabthera; BCR/ABL при Ph+ прекурсорни лимфобластни левкемии и др.).

ТУМОРИ НА ЛИМФОИДНАТА ТЪКАН

Прекурсорна В-лимфобластна левкемия/лимфом

Морфология	лимфобласти	З
Анатомична локализация	Костен мозък, периферна кръв и/или лимфни възли, слезка, черен дроб, Валдайеров пръстен и др., ц.н.с., тестис	З
Имунофенотипно изследване	Флоуцитометрия: CD45+, CD19+, CD22+, CD79+, HLA DR+ CD34±, CD10±, CD20±, CD13±, CD33± Имунохистохимия: CD45±, CD20±, CD34±, CD10±, CD13±	З Т
Цитогенетично изследване	Бройни и структурни аномалии, хипер-диплоидия, хиподиплоидия	З
Молекулярно изследване	RT-PCR: BCR/ABL, AF4/MLL, PBX/E2A, TEL/AML1 FISH: 11q23	З П

З-задължително, П-препоръчително, Т-при диагностично трудни случаи, Н-незадължително

Хронична лимфоцитна левкемия /дребноклетъчен лимфоцитен лимфом

Морфология	Малки зрели лимфоцити	З
Анатомична локализация	Костен мозък – нодуларна, интерстициална или дифузна инфилтрация Периферна кръв – лимфоцитоза $>10 \cdot 10^9/L$ и/или лимфни възли, слезка – дифузна инфилтрация ± псевдофоликули черен дроб и др.	З З З/Т Н
Имунофенотипно изследване	Флоуцитометрия: CD45 ^{high} +, CD19+, CD5+, CD23+, HLA DR+, sIgM low+, FMC7-, CD20±, CD10-, CD38±*, ZAP 70±* Имунохистохимия: CD45+, CD20+, CD10-, CD5+, CD23+	З П Т
Цитогенетично изследване	+12 в 30% 13q аномалии в 25% t(11;14), 17p-, 11q-	П
Молекулярно изследване	PCR: IgH пренареждания	П

* прогностични маркери

В-клетъчна пролимфоцитна левкемия

Морфология	Средни по размер лимфоидни клетки с умерено кондензиран хроматин, проминираща централна нуклеола и умерено количество базофилна цитоплазма	З
Анатомична локализация	Костен мозък – дифузна интертрабекуларна инфилтрация Периферна кръв – изразена лимфоцитоза >100.10 ⁹ /L и над 50% пролимфоцити Слезка – дифузна инфилтрация	З Т
Имунофенотипно изследване	Флоуцитометрия: CD45high±, CD19+, CD5± (30%), CD23-, HLA DR+, sIgM силна експресия+, FMC7+, CD20+, CD10- Имунохистохимия: CD45+, CD20+, CD10-, CD5-, CD23-	З Т
Цитогенетично изследване	t(11;14) – 20%, 13q-, 11q-	Т
Молекулярно изследване	PCR: IgH пренареждания	Т

Лимфоплазмоцитен лимфом

Морфология	Лимфоцити, лимфопламоцити, плазмоцити	З
Анатомична локализация	Костен мозък (+) – нодуларна и/или дифузна инфилтрация Периферна кръв (±) – умерена лимфоцитоза с морфология на зрели лимфоцити и лимфоплазмоцити Лимфен възел (+) – дифузна инфилтрация, няма псевдофиликули, лимфоцити, лимфоплазмоцити, ± ПАС-пол. интрануклеарни включвания, единични имунобласти, ± епителиодни хистиоцити и мастоцити. Други: кожа, черен дроб и т.н.	З Т
Имунофенотипно изследване	Флоуцитометрия: CD45high+, CD19+, CD22+, CD20+, CD23-, HLA DR+, s/cyIgM силна експресия+, CD5±, FMC7±, CD10- Имунохистохимия: CD45+, CD20+, CD10-, CD5-, CD23-, IgM+, kappa/lambda	З Т
Имунохимично изследване	IgM моноклонал парепротейн в серума	З
Цитогенетично изследване	t(9;14) – 50%	Т
Молекулярно изследване	PCR: IgH пренареждания	Т

Спленален маргинално-зонов лимфом

Морфология	Малки и средни по размер лимфоидни клетки с умерено кондензиран хроматин, обилна цитоплазма, в периферната кръв – често с вилозна характеристика, която може да е полярно разположена	3
Анатомична локализация	Слезка – популация от малки лимфоидни клетки огражда или замества герминативните центрове на бялата пулпа, заличава мантелната зона и се слива с периферната (маргинална) зона, в която са налице по-едри клетки, включително пръснати трансформирани бласти. Лимфни възли в хилуса на слезката. Костен мозък (±) – нодуларна интерстициална инфилтрация, интрасинусоидални инфилтрати Периферна кръв (±) – вилозни лимфоцити	3* П* 3
Имунофенотипно изследване	Флоуцитометрия: CD45high±, CD19+, CD20+, CD22+, CD5-, CD10- CD23-, HLA DR+, CD103- Имунохистохимия: CD45+, CD20+, CD10-, CD5-, CD23-, kappa/lambda	3** П*
Цитогенетично изследване	-7q	Н
Молекулярно изследване	PCR: IgH пренареждания	Т

* - диагнозата може да бъде поставена на базата на хистологично изследване при спленектомия, ** - спленалният маргинално-зонов лимфом може да бъде диагноза на изключване при морфологично изследване на костен мозък и периферна кръв, съчетано с флоуцитометрия без спленектомия.

Трихолевкоза

Морфология	Малки и средни по размер лимфоидни клетки с обилна цитоплазма с вилозна характеристика	3
Анатомична локализация	Костен мозък – начална интерстициална и огнищна, а в напредналите стадии дифузна инфилтрация от лимфоидни клетки с характерен “килийчест” характер; пролиферация и задебеляване на ретикулните влакна. Периферна кръв – вилозни лимфоидни клетки ± цитоплазмени вакуоли и/или включвания. Слезка – популация от малки лимфоидни клетки в червената пулпа, атрофична бяла пулпа	3 3 Н*
Имунофенотипно изследване	Флоуцитометрия: CD45+, CD19+, CD20+, CD103+, CD22+ силна експресия, CD11c+, CD25+, FMC7+, CD5-, CD10- CD23-, HLA DR+ Имунохистохимия: CD45+, CD20+, DBA.44	3 П*
Цитогенетично изследване	Неспецифично	Н
Молекулярно изследване	PCR: IgH пренареждания	Т

* - при изследване по повод на спленектомия.

Плазмоцитом

Диагнозата на плазмноклетъчния миелом при симптомен болен с прогресиращо заболяване изисква минимум:	
<ul style="list-style-type: none">- един главен и един второстепен критерий или- три второстепени критерия включващи (1) и (2)	
Главни критерии: <ul style="list-style-type: none">- Костно-мозъчна плазмоцитна инфилтрация >30%- Морфологичен субстрат на плазмоцитом на биопсичен материал- М-компонента: Серум: IgG > 35 g/L, IgA > 20 g/L Урина: белтък на Bence-Jones > 1g/24 часа	
Второстепени критерии: <ul style="list-style-type: none">- Костно-мозъчна плазмоцитна инфилтрация 10-30%- М-компонент, но по-нисък от горепосочените- Литични костни лезии- Намалени нормални имуноглобулини (<50% от нормата): IgG<600 mg/dL, IgA<100 mg/dL, IgM<50 mg/dL	
Варианти:	
Несекретиращ миелом	Липса на М-компонент
Индолентен миелом	<ul style="list-style-type: none">- М-компонент: IgG<70g/dL, IgA<5g/dL- ≤3 литични костни лезии, без компресионни фрактури- Хемоглобин, серумен калций и креатинин – в норма- Липса на инфекции
Глеещ миелом	<ul style="list-style-type: none">- М-компонент като миелом- Костно-мозъчна плазмоцитна инфилтрация 10-30%
Плазмноклетъчна левкемия	<ul style="list-style-type: none">- циркулиращи плазмоцити >2.10⁹/L или 20% от левкицитите в периферната кръв

Екстранодален маргинално-зонов В-клетъчен лимфом от мукозо-асоциираната лимфоидна тъкан (МАЛТ-лимфом)

Морфология	Екстранодална инфилтрация от хетерогенна популация от <u>малки*</u> лимфоидни клетки, включително маргинално-зонови (наподобяващи центроцити), моноцитοидни клетки и малки лимфоцити, единични пръснати центробласти и имунобласти.	3
Анатомична локализация	Лигавици (храносмилателен тракт – стомах, дебело черво, тънко черво, бял дроб, глава и шия, кожа, очни аднекси, щитовидна жлеза и млечна жлеза – популация от малки лимфоидни клетки огражда реактивни В-фоликули без да заличава мантилната зона до оформяне на по-дифузни зони. Лимфоепителни лезии.	3
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия: CD45+, CD20+, CD21+ и CD35+ фоликуларни дендритни клетки, kappa/lambda, IgM, CD10-, CD5-	П
Цитогенетично изследване	+3 – 60%, t(11;18) – 25%	Т
Молекулярно изследване	PCR: IgH пренареждания	Т

* - МАЛТ лимфомите са съставени по правило от малки лимфоидни клетки, като едраклетъчните елементи са пръснати с различен относителен дял, но наличието на дифузни полета от центробласти и имунобласти съответства на “дифузен В-едроклетъчен лимфом”. Терминът “МАЛТ лимфом с висока степен на малигненост” не следва да се използва.

Нодален маргинално-зонов В-клетъчен лимфом

Морфология	Първично нодална инфилтрация от хетерогенна популация от малки лимфоидни клетки, включително маргинално-зонови (наподобяващи центроцити), моноцитοидни клетки и малки лимфоцити, единични пръснати центробласти и имунобласти.	3
Анатомична локализация	Лимфни възли – популация от малки лимфоидни клетки (моноцитοидни, центроцитοидни, малки лимфоцити) в маргиналната зона и интерфоликуларните пространства. Пръснати поединично центробласти и имунобласти. Възможна плазмоцитна диференциация. Възможна колонизация на фоликулите.	3
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия: CD45+, CD20+, CD21+ и CD35+ фоликуларни дендритни клетки, kappa/lambda, IgD, CD10-, CD5-	П
Цитогенетично изследване	Неустановени	Н
Молекулярно изследване	PCR: IgH пренареждания	Т

Фоликуларни лимфоми

Морфология	Неоплазия от клетките на фоликулния център - центроцити и центробласти, с презимно фоликуларен строеж (при >75% фоликуларен строеж), фоликуларен и дифузен (при 25-75%) или минимално фоликуларен (при < 25%). Неопластичните фоликули са недобре отграничени, разположени плътно "гръб-в-гръб", липсва мантилна зона, по правило не се наблюдават макрофаги. Възможно е и наличието на дифузни зони. В 25-35% настъпва прогресия към В-едроклетъчен лимфом, най-често дифузен. Взаимност от броя на центробластите се дефинират следните степени: I-ва – при 0-5 центробласта на hpf* II-ра – при 6-15 центробласта на hpf III-та – при > 15 центробласта на hpf	З
Анатомична локализация	Предимно лимфни възли. Засягат се слезката, костния мозък, периферната кръв, Валдайеровия пръстен. Възможна екстранодална локализация - меки тъкани, кожа, храносмилателен тракт,. При 2/3 от болните се проявява в III-IV стадий със засягане както на периферните, така и на абдоминалните и интраторакалните лимфни възли, слезка и костен мозък (40%).	З
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия: CD45+, CD20+, CD10+ [фоликуларните зони > интерфоликуларните], slg+, bcl2+ [интрафоликуларно], bcl6+ [ядрено маркеране], CD5- Плътна мрежа от фоликулни дендритни клетки във фоликуларните зони CD21+, CD23+ Флуоцитометрия: CD45+, CD19+, CD20+, CD22+, CD10+, slg+, CD5-, CD23+/-, HLA DR+, CD103-	З П
Цитогенетично изследване	Цитогенетични аномалии – в 100% от случаите t(14;18) (q32;q21) – 80%; +7 – 20%; +18 – 20% и др.	Т
Молекулярно изследване	PCR: IgH пренареждания – 100% <u>Аномалии, засягащи онкогени</u> Bcl2 пренареждания – 80% Bcl6 пренареждания – 15% Bcl6 5'мутации – 40%	Т

* - hpf [high power field] = 0,159 mm² (обектив 40X, окуляри 18 mm) среден брой центробласти от 10 изброени полета

Мантелноклетъчен лимфом

Морфология	<p>Мономорфна популация от малки до средни по размер лимфоидни клетки с неправилни ядра, морфологично наподобяващи центроцити, с дифузен, мантелно-зонов или слабо нодуларен строеж. Липсват трансформирани неопластични клетки (центробласти, параимунобласти). Хиалинизирани малки съдове. Пръснати епителоидни хистиоцити. По правило, не се наблюдава тронсформация в едроклетъчен лимфом.</p> <p>Варианти: <u>Бластоиден, класически</u> – клетките наподобяват лимфобласти с висока митотична активност (>10/10 hpf) <u>Бластоиден, плеоморфен</u> – хетерогенна популация от едри клетки с големи вгънати и овални ядра.</p>	З
Анатомична локализация	<p>Предимно лимфни възли. Засягат се слезката, костния мозък, периферната кръв. Възможна екстранодална локализация – най-често храносмилателен тракт (30%), вкл. множествена лимфоматозна полипоза.</p>	З
Имунофенотипно изследване	<p>Имунохистохимия: CD45+, CD20+, CD5+, CD10-, bcl2+, bcl6-, cyclinD1+, CD23- Рехава мрежа от фоликулни дендритни клетки CD21+, CD35+</p> <p>Флуоцитометрия: CD45+, CD19+, CD20+, CD22+, FMC7+, CD10-, CD5+, CD23-, HLA DR+, CD103-</p>	З П
Цитогенетично изследване	<p>Цитогенетични аномалии – в 75% от случаите t(11;14) (q13;q32) тетраплоидия – бластоиден вариант</p>	Т
Молекулярно изследване	<p>FISH: IgH – bcl1 пренареждания</p> <p>PCR: Свършекспресия на cyclinD1 mRNA</p>	Т

Дифузен В-едроклетъчен лимфом

Морфология	<p>Дифузна пролиферация от големи трансформирани неопластични В-клетки, ядрата на които са съпоставими с тези на макрофаги или двукратно по-големи от тези на зрели лимфоцити.</p> <p>Морфологични варианти: <u>Центробластен</u> (мономолфен, полимофен или мултилобулиран) – средни до едри клетки с овални или кръгли ядра с фин хроматин и 2-4р свързани с ядрената мембрана, нуклеоли. <u>Имунобластен</u> – > 90% от клетъчният състав е от едри клетки с единична проминираща централна нуклеола и значимо количество базофилна цитоплазма ± плазматизация. <u>С богатство на Т-клетки / хистиоцити</u> – неопластичните клетки са < 10% от клетъчния състав с характеристика на центробласти, имунобласти или наподобяващи Щернбергови клетки, преобладаващата популация са не-неопластични Т-клетки ± хистиоцити, рядко пръснати поединично зрели В-клетки.</p>	3
Анатомична локализация	<p>Лимфни възли – обикновено локализирано в началото.</p> <p>Екстранодално засягане (40%) – храносмилателен тракт, кожа, ц.н.с., кости, слезка и др.</p> <p>Първична изява в костния мозък и/или периферната кръв е рядко срещана.</p>	3
Имунофенотипно изследване	<p>Имунохистохимия: CD45+, CD20+, sIg+ (50-75%), CD5±, CD30±, bcl2+ (25-50%), bcl6±, cyclinD1-, Ki-67+>40% от клетките.</p> <p>Флуоцитометрия: CD45+, неспецифичен В-клетъчен фенотип [CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+], CD10±, CD5±, CD23±, HLA DR+, CD103-</p>	3 П
Цитогенетично изследване	Неспецифично	Н
Молекулярно изследване	<p>FISH: IgH – bcl2 пренареждания – 20-30% EBV</p> <p>PCR: Bcl6 пренареждания – 30%</p>	Н

Медиастинален (тимусен) В-едроклетъчен лимфом

Морфология	Вариант на дифузния В-едроклетъчен лимфом с вероятен тимусен произход. Неопластичната популация е от различни по размер и форма на ядрата клетки, обисновено с относително обилна цитоплазма. Малък брой реактивни лимфоцити и еозинофили. Изразена фиброза ± резидуални структури от тимуса.	3
Анатомична локализация	Туморни маси в преден медиастинум. При генерализация – засягане на екстранодални органи като бъбреци, надбъбречни жлези, черен дроб, кожа, ц.н.с.	3
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия: CD45+, CD20+, slg-, CD5-, CD10-, CD30±	3
Цитогенетично изследване	Неспецифично	Н
Молекулярно изследване	Ig пренареждания	Н

Интравакуларен В-едроклетъчен лимфом

Морфология	Рядко срещан вариант на дифузния В-едроклетъчен лимфом с изолирано вътресъдово засягане от В-едроклетъчни елементи с везикуларни ядра и проминиращи нуклеоли.	3
Анатомична локализация	Широко разпространение със засягане на екстранодални органи като ц.н.с., кожа, бели дробове, бъбреци, надбъбречни жлези. Вътресъдово засягане на костния мозък.	3
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия: CD45+, CD20+, CD5±	3
Цитогенетично изследване	Неспецифично	Н
Молекулярно изследване	Ig пренареждания	Н

Първичен лимфом от изливи в телесни кухини (ефузионен) *

Морфология	Рядко срещан вариант на дифузния В-едроклетъчен лимфом с изолирана изява като серозен излив без наличие на установими туморни маси. Цитологични цитоцетрофужни препарати от изливи – едри плазмобластни, имунобластни или анапластични клетки с големи ядра и проминиращи нуклеоли, обилна базофилна цитоплазма ± вакуоли. Биопсия от плевра – едроклетъчни елементи с различна степен на атипизъм и полиморфизъм, адхезирали към плеврата и често обвити от фибрин.	3
Анатомична локализация	Плеврална, перикардиална и перитонеална кухина – обикновено се засяга само една.	3
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия: CD45+, отрицателни пан-В маркери [CD20-, CD19-, CD79a-], CD30+ HHV8/KSHV-latent protein+, LMP1 -	П 3
Цитогенетично изследване	Неспецифично	Н
Молекулярно изследване	PCR: Ig пренареждания FISH: HHV8/KSHV genome EBV [EBER]	Н 3

* асоциира се с HHV-8 [human herpes virus 8]/KSHV [Kaposhi sarcoma herpes virus] и състояния на имуноен дефицит.

Лимфом/левкемия на Бъркит

Морфология	<p>Пролиферация от средни по размер неопластични В-клетки с базофилва цитоплазма и висока митотична активност.</p> <p>Морфологични варианти: <u>Класически</u> – дифузна монотонна инфилтрация от неопластични клетки с кохезивна характеристика (особено при използване на живак-съдържащи фиксатори). Ядрата са кръгли, с по-груб хроматин и множествени централни средни по размер нуклеоли. На цитологичен препарат – силно базофилна цитоплазма с множество вакуоли. Висока митотична активност и спонтанна клетъчна смърт. Множество макрофаги, погълнали апоптозирали туморни клетки (тип “звездно небе”). <u>С плазматоидна диференциация.</u> <u>Атипичен лимфом на Бъркит / Бъркит-подобен</u> – по-изразен ядрен плеоморфизъм и проминиращи нуклеоли.</p>	З
Анатомична локализация	<p>Екстранодално засягане с висок риск от засягане на ц.н.с.</p> <p>Най-често – абдоминални маси (илео-цекална област!). Яйчници, бъбреци, млечна жлеза (двустранно и масивно).</p> <p>Лимфни възли (възрастни > деца).</p> <p>Костен мозък и периферна кръв (левкемия).</p>	З
Имунофенотипно изследване	<p>Имунохистохимия: CD45+, CD20+, sIgM+, CD10+, bcl6+, bcl2-, CD5-, CD23-, Ki-67+ в 100% от клетките.</p> <p>Флуоцитометрия: CD45bright+, CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD10+, CD34-/+ , CD23-, HLA DR+, sIgM+</p>	З П
Цитогенетично изследване	t(8;14); t(2;8); t(8,22)	П
Молекулярно изследване	<p>FISH: IgH – мус пренареждания EBV</p>	П

Прекурсорна Т-лимфобластна левкемия/лимфом

Морфология	лимфобласти	З
Анатомична локализация	Костен мозък, периферна кръв и/или лимфни възли, медиастиnum (50%), слезка, черен дроб, Валдайеров пръстен и др., ц.н.с., тестис	З
Имунофенотипно изследване	Флуоцитометрия: CD45+, CD1a+, CD2+, CD3+, CD5+, CD7+, CD4+, CD8+, CD34±, CD10±, CD79a±, CD13±, CD33±, CD117± Имунохистохимия: CD45±, CD3+, CD46RO±	З Т
Цитогенетично изследване	Бройни и структурни аномалии, хипер-диплоидия, хиподиплоидия	З
Молекулярно изследване	RT-PCR: RanBP17, HOX-11 like/CTIP2 – 20%, MTS1/MTS2 – 7-15%, RHOM2/TCRδ – 5-7%	П

Бластен НК-клетъчен лимфом

Морфология	Лимфобласти, сродни с така наречените плазмоцитонидни дендритни клетки, или тип 2 дендритни клетки (type 2 dendritic cell, DC2)	З
Анатомична локализация	Множествено засягане с предпочитание към кожата. Костен мозък, периферна кръв, лимфни възли, меки тъкани.	З
Имунофенотипно изследване	Флуоцитометрия: CD45ниска експресия+, CD4+, CD56+, CD2+/-, CD3-, CD5-, CD7-/, CD34-/, TdT+/-, granzyme B+, TIA-1-/, CD8-, CD33-/слабо+, CD13-, CD123(IL3R-α)+, CD45RA+ и HLA-DR+ Имунохистохимия: CD43+, CD3-, CD56+	З Т
Цитогенетично изследване	Неспецифични	П
Молекулярно изследване	TCR гени– герминативна конфигурация	Н

Т-клетъчна пролимфоцитна левкемия

Морфология	Средни по размер лимфоидни клетки с умерено кондензиран хроматин, проминираща централна нуклеола и умерено количество базофилна цитоплазма с характерни цитоплазмени "псевдоподи".	З
Анатомична локализация	Периферна кръв [основна за диагнозата] – изразена лимфоцитоза $>100.10^9/L$ и над 90% пролимфоцити, силно положителни за алфа-нафтил ацетат естераза Костен мозък – дифузна инфилтрация Лимфни възли, слезка, черен дроб, кожа – дифузна инфилтрация, понякога с частично съхранение на лимфните фоликули.	З З Т
Имунофенотипно изследване	Флоуцитометрия: CD45high+, CD1a-, CD3+, CD2+, CD7+, CD4+/CD8- (60%), CD4+/CD8+ (25%), CD4-/CD8+ (15%)	З
Цитогенетично изследване	Inv (14), t(14;14)	П
Молекулярно изследване	PCR: TCR пренареждания	П

Т-клетъчна левкемия от големи гранулирани лимфоцити (T-LGLL)

Морфология	Персистиращ за повече от 6 месеца повишен $> 2-20.10^9/l$ брой на големи гранулирани лимфоцити в периферната кръв - LGL, с размери около 15 до 18 μm , обилна цитоплазма, съдържаща типични азурни гранули и окръглени или бъбрековидни ядра.	З
Анатомична локализация	Периферна кръв [основна за диагнозата] Костен мозък – интерстициални или малки фокални инфилтрати на фона на хиперцелуларен костен мозък, слезка – червена пулпа, черен дроб - синусоиди. Лимфни възли се засягат рядко	З З Н
Имунофенотипно изследване	Флоуцитометрия: Т-клетъчна LGL-левкемия (85%) CD3+, CD45high+, CD1a-, CD16+, CD4-/CD8+, TCRalpha/beta+, CD57+/- НК-клетъчната LGL-левкемия CD3-, CD16+, CD56+, CD57+	З
Цитогенетично изследване	Неспецифични	Н
Молекулярно изследване	PCR: Т-клетъчна LGL-левкемия TCR пренареждания	Н

Агресивна НК-клетъчна левкемия/лимфом

Морфология	Малигнени клетки с характеристика на бласти или атипични лимфоиди с хиперхромни ядра и проминираща нуклеола. Цитоплазмата е обилна, базофилна и съдържа средни и големи азурни гранули.	З
Анатомична локализация	Периферна кръв [основна за диагнозата] Костен мозък – масивна или фокална инфилтрация от малигнени клетки, примесени с хистиоцити, вкл. с белези на хемофагоцитоза. Лимфни възли, слезка – монморфен инфилтрат, чести апоптотични телца, ± инвазия на съдове.	З З Н
Имунофенотипно изследване	Флоуцитометрия: CD3-, CD45high+, CD2-, CD16-/+, CD56+, TCR-, CD57-, perforin+, TIA-1+, granzyme B+	З П
Цитогенетично изследване	Неспецифични	Н
Молекулярно изследване	PCR: TCR гени и герминативна конфигурация	Н

Екстранодален НК/Т-клетъчен лимфом, назален тип

Морфология	Хетерогенна клетъчна популация с характеристика на малки зрели лимфоцити и различен брой атипични лимфоидни клетки и имунобласти, примесени с плазматични клетки и единични еозинофили и хистиоцити, с характерно разположение около съдовете (ангиоцентричност) и инвазия на съдовите стени (ангиоинвазивост), оклузия на съдовия лумен от атипични лимфоидни клетки, белези на фибриноидна съдова некроза и исхемична некроза както на туморните клетки, така и на нормалните тъкани.	З
Анатомична локализация	Предимно екстранодарно – носна кухина, назофаринкс, небце, кожа, меки тъкани, гастроинтестинален тракт и тестис. Ангажирането на костния мозък и периферната кръв са необичайни.	З
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия: НК-клетъчен (80%) CD3-, CD16+, CD56+, CD57+ Т-клетъчен (10-30%) цитоплазмен CD3+, мембранен CD3-, CD5+, TIA-1+, granzyme-B+	З
Цитогенетично изследване	Незадължително	Н
Молекулярно изследване	PCR: TCR гени в герминативна конфигурация при НК-клетъчен	Н

Ентеропатичен тип Т-клетъчен лимфом

Морфология	Хетерогенна малигнена популация от малки, средни и големи, дори анапластни туморни лимфоидни клетки, често с висок брой интраепителни Т-клетки в съседния лигавичен епител и оформяне на лимфо-епителни лезии.	3
Анатомична локализация	Йеюнума и илеум, с разязвявания, в много от случаите множествени и с перфорация, без видима туморна маса. Ангажирането на костния мозък и периферната кръв са необичайни.	3
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия: CD3+, CD5-, CD30±	3
Цитогенетично изследване	Незадължително	Н
Молекулярно изследване	PCR: TCR пренареждания	Н

Периферен Т-клетъчен лимфом

Морфология	Хетерогенна група, която се характеризира с дифузна или интерфоликуларна пролиферация на лимфомни клетки - в част от случаите атипични малки и средни лимфоцити, в други - големи лимфоидни клетки, със значително клетъчно разнообразие, както по отношение на размера, така и по отношение на ядрения атипизъм. В отделни случаи се срещат силно атипични едроклетъчни елементи, наподобяващи Щернбергови, но класически Щернбергови клетки не се срещат. Значителен примес от еозинофили и епителоидни хистиоцити.	3
Анатомична локализация	Лимфни възли. Често генерализирано заболяване – костен мозък, черен дроб, слезка, кожа, периферна кръв.	3
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия: CD3+, CD4+	3
Цитогенетично изследване	Незадължително	Н
Молекулярно изследване	PCR: TCR пренареждания	Н

Ангиоимунобластен Т-клетъчен лимфом

Морфология	Експанзия на малки Т-лимфоцити в Т-клетъчните зони, в дилатираните периферни синуси и извън пределите на капсулата, в перинодалната мастна тъкан. Групи от така наречените “светли” клетки, със средни размери и обилна светла цитоплазма. Значителна пролиферация на разклоняващи се венули с висок ендотел (HEV), Групи от епителоидни хистиоцити и многобройни еозинофили, плазматични клетки, неутрофили.	3
Анатомична локализация	Генерализирана периферна лимфадено-мегалия, черен дроб, слезка, костен мозък.	3
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия: CD3+, CD4+ CD21+ FDC около съдове	3
Цитогенетично изследване	Незадължително	Н
Молекулярно изследване	PCR: TCR пренареждания FISH: EBV	Н Н

Микозис фунгоидес / Синдром на Sezary

Морфология	Лимфоцити с хиперхромни церебриформни ядра в папиларния слой на кожата с изразен епидермотропизъм, “микроабсцеси на Pautrier”.	3
Анатомична локализация	<u>Микозис фунгоидес</u> I стадий – кожа II стадий – уголемени, но неангажирани регионални лимфни възли III стадий - ангажирани регионални лимфни възли IV – висцерално ангажиране <u>Синдром на Sezary</u> – левкемизация в периферна кръв.	3 3
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия (Микозис фунгоидес): CD3+, CD5+, CD4+ Флоуцитометрия (Синдром на Sezary): CD45high+, CD3+, , CD2+, CD4+	3 3
Цитогенетично изследване	Незадължително	Н
Молекулярно изследване	PCR: TCR пренареждания	Н

Първичен кожен анапластичен едроклетъчен лимфом

Морфология	Повлекла или големи групи от големи бластни клетки - анапластни, с плеоморфни, понякога подковообразни ядра, проминиращи нуклеоли и обилна цитоплазма, разположени в дермата и подкожието, с кохезивен растеж и липса на епидермотропизъм. В различна степен - примес от реактивни клетки (Т-лимфоцити, еозинофилни и неутрофилни гранулоцити, макрофаги)	3
Анатомична локализация	Кожа Регионални лимфни възли - вторично	3
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия: CD30+, CD3±, CD5±, CD4+ , EMA-, ALK-	3
Цитогенетично изследване	Незадължително	Н
Молекулярно изследване	PCR: TCR пренареждания	Н

Анапластичен едроклетъчен лимфом

Морфология	Големи бластни клетки с плеоморфни, понякога подковообразни ядра и проминиращи нуклеоли, включително многоядрени форми, наподобяващи Щернбергови клетки, по правило с по-големи от обичайните размери на едроклетъчните лимфоми, обилна цитоплазма, която им придава епителоиден или хистиоцитен вид. Кохезивен характер на туморния растеж, който засяга. Варианти: 1. Обичаен 2. Лимфохистиоцитен 3. Дребноклетъчен	3
Анатомична локализация	Лимфни възли - предимно синусите на лимфните възли или паракортекса . Естранодални локализации – кожа, кости, меки тъкани, черен дроб.	3
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия: CD30+, EMA+, CD15-, CD45±, CD3±, ALK+ [ядрена и цитоплазмена] подтип / ALK-подтип	3
Цитогенетично изследване	Хромозомни транслокации, в които е въввлечена хромозома 2	Н
Молекулярно изследване	RT-PCR: NPM-ALK	Н

Нодуларен Ходжкинов лимфом с лимфоцитно преобладаване

Морфология	Нодуларен и дифузен инфилтрат, клетъчният състав, на който е от лимфоцити, хистиоцити, епителоидни хистиоцити, плазмоцити и пръснати поединично L&H (лимфоцитно-хистиоцитни) клетки – големи клетки с мутилобулирани ядра везикуларни ядра с няколко базофилни нуклеоли и оскъдна цитоплазма.	3
Анатомична локализация	Лимфни възли – шийни, аксиларни и ингвинални. Рядко се засягат медиастинални лимфни възли, слезка и костен мозък.	3
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия: L&H клетки – CD20+, CD45+, EMA+ (50%), CD30-, CD15-, Oct2+*, BOB.1+* Лимфоцити около L&H клетки – CD3+, CD57+, инфилтрати от CD20+ лимфоцити	3
Цитогенетично изследване	Незадължително	Н
Молекулярно изследване	Незадължително	Н

Класически Ходжкинов лимфом

Морфология	Дифузен инфилтрат, клетъчният състав, на който е от лимфоцити, хистиоцити, епителоидни хистиоцити, плазмоцити, еозинофилни левкоцити и пръснати 0,1-1% Щернбергови клетки – големи многоядрени клетки с проминиращи нуклеоли, и варианти – едноядрени Ходжкинови клетки и “лакунарни” клетки. Варианти: 1. С богатство на лимфоцити 2. Нодуларна склероза 3. Смесен клетъчен състав 4. Лимфоцитно изчерпване	3
Анатомична локализация	Лимфни възли – шийни (75%), медиастинални, аксиларни и ингвинални. Слезка (20%), костен мозък (5%).	3
Имунофенотипно изследване	Имунохистохимия: Щернбергови клетки – CD30+, CD15+, CD45-, CD20+ [40%], EMA-, ALK-, Oct2-*, BOB.1-* Лимфоцити – CD3+ > CD20+	3
Цитогенетично изследване	Незадължително	Н
Молекулярно изследване	Незадължително	Н