

ЦИТОЛОГИЯ

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-006.441-091.8-076.5-078.33

Славнова Е.Н.¹, Тюрина Н.Г.¹, Головин С.Т.², Петров А.Н.¹

КОМПЛЕКСНАЯ МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЛИМФОМЫ МАРГИНАЛЬНОЙ ЗОНЫ

¹Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «Национальный медицинский радиологический исследовательский центр» Минздрава РФ, 125284, Москва, Российская Федерация;
²Клинический госпиталь ФКУЗ «МСЧ МВД России по г. Москве», 127299, Москва, Российская Федерация

Цель исследования: определить возможности комплексной морфологической диагностики [рутинной цитологии и гистологии, иммуноцитохимии (ИЦХ) и иммуногистохимии (ИГХ), молекулярной генетики] лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ). В исследование включены 10 больных с установленным на основании применения морфологического (цитологического и гистологического), иммуноморфологического (ИЦХ и ИГХ) и молекулярно-генетического методов исследования диагноза лимфомы из клеток маргинальной зоны. Для иммунофенотипирования применяли ИЦХ-метод (EnVision FLEX) с использованием моноклональных антител фирмы DAKO. Для иммунофенотипирования методом проточной цитофлюориметрии (проточный цитофлюориметр FACS Calibur фирмы Becton Dickinson, США) применяли антитела фирмы DAKO, меченные флюоресцентными метками (FITC или RPE). Панель антител включала: общий лейкоцитарный антиген, общие цитоцератины, CD19, CD20, CD79a, CD10, Bcl2, Bcl6, CD23, CD34, TdT, CD3, CD4, CD5, CD8, CyclinD1, Ki67, κ, λ. Использовали FISH-метод с зондами Bcl2 FISH DNA Probe, Split Signal и MALT1 FISH DNA Probe Split Signal фирмы DAKO. Для дифференциальной диагностики с фолликулярной лимфомой у одного больного определяли перестройку гена Bcl2. Для диагностики ЛМЗ трех больных с помощью FISH-метода определяли транслокацию t(11;18)(q21;q21), вовлекающую ген ингибитора апоптоза API2 и ген MALT1. Рутинное цитологическое исследование десяти случаев позволило установить точный диагноз лимфомы лишь в пяти из них, без указания, что это ЛМЗ. В двух случаях при рутинном цитологическом исследовании высказано лишь подозрение на лимфому. У всех 10 больных наблюдали положительную экспрессию пан-В-клеточных маркеров CD19, CD20, CD79a, как при ИГХ, так и при ИЦХ и проточной цитофлюориметрии. У 6 (60%) больных наблюдали положительную экспрессию гена Bcl2 как при ИГХ, так и при ИЦХ и проточной цитофлюориметрии. При сравнении ИГХ, проточной цитофлюориметрии и ИЦХ выявлено отсутствие экспрессии CD5, CD3, CD10, CD34, CD23, Bcl6, TdT, циклина D1. При ИГХ и ИЦХ в 10 случаях белок пролиферативной активности Ki-67 составлял не более 30%. При проточной цитофлюориметрии определяли клональность по легким цепям иммуноглобулинов κ или λ (Igλ/Igκ). В целом коэффициент корреляции (r; p < 0,05) между данными ИГХ и ИЦХ, проточной цитофлюориметрии составил 1. 4 больным для уточнения диагноза проведена FISH-реакция. Перестройка гена Bcl2 у больного с нодальной ЛМЗ не обнаружена. У 3 больных с MALT-лимфомами обнаружена перестройка гена MALT1. Таким образом, точность рутинного цитологического исследования при установлении диагноза лимфомы без указания на ее тип при ЛМЗ составила 50%, чувствительность — 50%, специфичность — 100%. Точность иммунофенотипирования, позволяющая установить ЛМЗ, составила 100%, чувствительность — 100%, специфичность — 100%. Коэффициент корреляции (r; p < 0,05) между данными ИГХ и ИЦХ, проточной цитофлюориметрии составил 1. Точность, чувствительность и специфичность комплексного исследования (цитологии, ИЦХ и FISH-метода) в диагностике ЛМЗ составили 100%.

Ключевые слова: лимфома маргинальной зоны; цитология; иммуноцитохимия; проточная цитофлюориметрия; FISH-метод.

Для цитирования: Славнова Е.Н., Тюрина Н.Г., Головин С.Т., Петров А.Н. Комплексная морфологическая диагностика лимфомы маргинальной зоны. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (8): 490-497. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-490-497>

Slavnova E.N.¹, Tyurina N.G.¹, Golovin S.T.², Petrov A.N.¹

THE COMPLEX MORPHOLOGIC DIAGNOSTIC OF MARGINAL ZONE LYMPHOMA

¹The P.A. Hertsen Moscow research oncologic institute, the branch of the National medical radiologic research center of Minzdrav of Russia, 125284 Moscow, Russia

²The clinical hospital "The Moscow medical sanitary unit of the Interior Ministry", 127299 Moscow, Russia

The purpose of study: To determine possibilities of complex morphological diagnostic (routine cytology and histology, immunocytochemistry and immunohistochemistry, molecular genetics) of lymphoma of marginal zone. The study included 10 patients with diagnosis of lymphoma of marginal zone cells, established on the basis of application of morphological (cytological and histological), immunomorphologic (immunocytochemical and immunohistochemical) and molecular genetic techniques. The immunofenotyping was implemented using immunocytochemical technique (EnVision FLEX) applying monoclonal antibodies by DAKO manufacturer. The immunofenotyping was implemented by flow cytofluorometry technique (flow cytofluorometer FACS Calibur by Becton Dickinson, USA) using antibodies by DAKO manufacturer labeled by fluorescent marks (FITC or RPE). The antibody panel

Для корреспонденции: Славнова Елена Николаевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр.отд-ния онкоцитологии Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена, филиала ФГБУ «Национальный медицинский радиологический исследовательский центр», 125284, Москва, e-mail: slavnov@rambler.ru

included: common leukocytic antigen, common cytokeratins CD19, CD20, CD79a, CD10, Bcl2, Bcl6, CD23, CD34, TdT, CD3, CD4, CD5, CD8, CyclinD1, Ki67, κ , λ . The FISH technique was applied using probes Bcl2 FISH DNA Probe, Split Signal u MALT1 FISH DNA Probe Split Signal by DAKO manufacturer. In one patient a gene Bcl2 change was detected with purpose of differentiating diagnostic with follicular lymphoma. In three patients, diagnosing lymphoma of marginal zone was implemented by FISH technique using detection of translocation (11;18)(q21;q21), involving gene of inhibitor of apoptosis API2 and gene MALT1. The routine cytological analysis of ten cases permitted to establish an exact diagnosis of lymphoma only in five cases and with no indication that it is lymphoma of marginal zone. In two cases under routine cytological analysis only a suspicion about lymphoma was suggested. In all ten patients a positive expression of pan-B-cellular markers CD19, CD20, CD79a was observed both under immunocytochemistry and immunohistochemistry and flow cytometry. In 6 patients (60%) a positive expression of gene Bcl2 was observed both under immunocytochemistry and immunohistochemistry and flow cytometry. The comparison of immunocytochemistry and immunohistochemistry and flow cytometry established absence of expression of CD5, CD3, CD10, CD34, CD23, Bcl6, TdT, cyclin D1. Under immunocytochemistry and immunohistochemistry in ten cases proliferative activity protein Ki-67 made up no more than 30%. Under flow cytometry clonality on light chains of immunoglobulins κ or λ (Ig λ /Ig κ) were established. Overall, correlation coefficient (r , $p < 0,05$) between immunocytochemistry and immunohistochemistry, flow cytometry made up to 1. The four patients were applied FISH-reaction for adjustment of diagnosis. In patient with nodal lymphoma of marginal zone gene Bcl2 change was absent. In three patients with MALT-lymphoma a gene MALT1 change was established. Thereby, accuracy of routine cytological analysis at diagnosing lymphoma without indication of its type in case of lymphoma of marginal zone made up to 50%, sensitivity - 50%, specificity - 100%. The accuracy of immunofenotyping permitting diagnosing lymphoma of marginal zone made up to 100%, sensitivity - 100%, specificity - 100%. The correlation coefficient (r ; $p < 0,05$) between data of immunocytochemistry and immunohistochemistry, flow cytometry made up to 1. The accuracy, sensitivity and specificity of complex analysis (cytology, immunocytochemistry and FISH-technique) in diagnostic of lymphoma of marginal zone made up to 100%.

Key words: lymphoma of marginal zone; cytology; immunocytochemistry; flow cytometry; FISH-technique

For citation: Slavnova E.N., Tyurina N.G., Golovin S.T., Petrov A.N. The complex morphologic diagnostic of marginal zone lymphoma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (8): 490-497. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-490-497>*

For correspondence: Slavnova E.N., candidate of medical sciences, senior researcher of the department of oncocytoology. e-mail: slavnov@rambler.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 30.03.2017
Accepted 15.04.2017

Введение. Лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ) относят к индолентным лимфомам. Впервые о них упоминают Albert и Sheibani в 1984—1986 гг. как о моноцитотидной В-клеточной лимфоме [1]. Термин «лимфома маргинальной зоны» введен позже в REAL классификации в 1994 г. [2]. Субстрат ЛМЗ — опухолевые клетки, аналогичные нормальным клеткам маргинальной зоны лимфоидной ткани селезенки, слизистых оболочек (MALT) и лимфатических узлов. ЛМЗ составляют 11% всех лимфоидных опухолей и чаще возникают в возрасте старше 50 лет. В классификации ВОЗ (2008) опухолей гемопоэтической и лимфоидной ткани выделяют три вида ЛМЗ: лимфому маргинальной зоны селезенки, нодальную и экстранодальную лимфому маргинальной зоны лимфоидной ткани, ассоциированную со слизистыми оболочками (MALT-лимфома) [3].

Селезеночная лимфома маргинальной зоны (СЛМЗ) — редкая В-клеточная опухоль. СЛМЗ составляет 1% всех лимфом и может быть причиной неверной диагностики неклассифицируемых хронических лимфоидных лейкозов, которые CD5-негативны [4]. Большинство пациентов старше 50 лет, соотношение мужчин и женщин одинаковое [5].

Опухоль поражает селезенку и лимфатические узлы ворот селезенки, костный мозг и периферическую кровь. Может быть вовлечена печень. Периферические лимфатические узлы обычно не вовлечены. У больных наблюдают спленомегалию, иногда сопровождающуюся аутоиммунной тромбоцитопенией или анемией и переменным присутствием ворсинчатых лимфоцитов в периферической крови. У одной трети пациентов возможно наличие небольшого количества моноклонального белка (парапротеин IgM) в сыворотке крови, однако не отмечают гипервязкость и гипергаммаглобулинемию [6]. В Южной Европе описана ассоциация СЛМЗ с вирусом гепатита С.

Морфологически очаговые опухолевые инфильтраты располагаются вокруг белой селезеночной пульпы или (чаще) заменяют реактивные зародышевые центры со сглаживанием картины нормального фолликула [7]. Опухолевые лимфоциты представлены клетками малого и среднего размера с дис-

персной структурой глыбчатого хроматина, характерными светлыми бороздами и обильной бледной слабо базофильной цитоплазмой, напоминающими клетки маргинальной зоны, которые перемежаются с редкими трансформированными бластами. В начальных стадиях заболевания структура селезенки сохранена. По мере прогрессирования заболевания наблюдают последовательное диффузное поражение белой, а затем и красной пульпы за счет инфильтрации опухолевыми клетками маргинальной зоны, а также вовлечение в патологический процесс синусов [8].

В редких случаях в центрах белых узелков пульпы могут присутствовать клетки с плазматической дифференцировкой, скопления плазматических клеток. Опухолевые лимфоидные клетки могут определяться в периферической крови и иногда характеризуются наличием ворсинок. [9]. Дифференциальную диагностику необходимо проводить с лимфомой из малых лимфоцитов/хроническим В-клеточным лимфолейкозом, волосатоклеточным лейкозом, лимфомой клеток мантии, фолликулярной лимфомой и лимфоплазматической лимфомой. Для дифференциальной диагностики СЛМЗ помимо морфологического исследования необходимо иммунофенотипирование.

Имунофенотип опухолевых клеток следующий: положительная экспрессия поверхностных IgM+, IgD+/-, CD20+, CD79a+, отрицательная экспрессия CD5-, CD10-, CD23-, CD43- и аннексина А1- [10]. Экспрессия CD103 и циклина D1 отсутствует. Пролиферативная активность Ki67 низкая. Отсутствие экспрессии циклина D1 и CD5 позволяет исключить лимфому из клеток мантии и хронический лимфолейкоз соответственно. Отсутствие аннексина А1 исключает волосатоклеточный лейкоз, а отрицательная экспрессия CD10 и BCL6 позволяет исключить фолликулярную лимфому.

В большинстве СЛМЗ определяют перестройку генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, в 50% случаев — соматические мутации V H -гена. Цитогенетически выявляют нарушения в области длинного плеча 7 хромосомы. Делеция 7q31-32 и транслокация этого региона в область капша-цепи хромосомы

2 описаны в 40% случаев СЛМЗ [11]. В ряде случаев СЛМЗ определяет дисрегуляцию гена *CDK6* (циклинзависимая киназа 6), расположенного в локусе 7q21. Достаточно часто (36%) описаны полная или частичная трисомия хромосомы 3 и ряд других цитогенетических аномалий. СЛМЗ не имеет транслокацию t(11; 18), характерную для MALT-лимфом, t(14; 18) (перестройка гена *BCL2*), характерную для фолликулярной лимфомы, t(11; 14) (перестройка гена *CCND1*), характерную для лимфомы зоны мантии. СЛМЗ имеет специфический транскрипционный профиль по сравнению с другими мелкоклеточными лимфомами. Однако в диагностике СЛМЗ имеются определенные трудности. Выделяют редкие случаи с атипичной морфологией либо атипичным иммунофенотипом. Эти молекулярные изменения включают гены, участвующие в сигнальных каскадах АКТ1 и В-клеточного рецептора. Нередко определяют трисомии хромосом 12 и 18, делеции 13q14 и 7q.

В большинстве случаев прогноз благоприятный даже при поражении костного мозга. Может произойти трансформация в диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому. Встречают случаи, ассоциированные с гепатитом С (НСV-положительные). К неблагоприятным клиническим прогнозическим факторам относят большую массу опухоли, тяжелое общее состояние больного. Случаи с мутантным TP53, присутствие 7q делеции и немутированных *IGHV* (вариабельных участков тяжелых цепей иммуноглобулинов) генов связаны с неблагоприятным исходом.

Экстранодальная В-клеточная ЛМЗ, связанная с лимфоидной тканью слизистых оболочек (MALT-лимфома), впервые описана P. Isaacson и D. Wright в 1983 г. и представляет собой экстранодальную В-клеточную лимфому [12]. MALT-лимфома составляет 8% всех В-клеточных лимфом [3] и до 50% первичных лимфом желудка [13]. В большинстве случаев опухоль встречается у взрослых (средний возраст — 61 год), чаще у женщин (соотношение мужчин и женщин — 1:1,2) [3]. Более высокую частоту MALT-лимфом желудка наблюдают на северо-востоке Италии [13]. Отдельный тип, ранее известный как болезнь альфа-тяжелых цепей, который теперь называют иммунопролиферативным заболеванием тонкого кишечника (IPSID), встречаются на Ближнем Востоке, в некоторых регионах Южной Африки и многих других тропических и субтропических районах [14].

T. Hussell и соавт. [15] показали, что MALT-лимфомы желудка связаны с инфицированием *Helicobacter pylori* и зависят от наличия Т-клеток, специфически активированных антигенами *Helicobacter pylori*. Важность этой стимуляции в естественных условиях была четко продемонстрирована возможностью развития ремиссии у больных желудочной MALT-лимфомой при антибактериальной терапии *Helicobacter pylori* [15]. Антигенная стимуляция *Chlamydia psittaci*, *Campylobacter jejuni* и *Borrelia burgdorferi* имеет значение для некоторых случаев MALT-лимфом придатков глаза, тонкого кишечника (IPSID) и кожи соответственно [16, 17, 18]. Во многих случаях MALT-лимфом у больных в анамнезе имелся хронический воспалительный процесс, который приводил к накоплению экстранодальной лимфоидной ткани [19]. Хроническое воспаление может быть результатом инфекции, аутоиммунного заболевания или другого неизвестного стимула. Инфекционные агенты, которые могут вызвать накопление лимфоидной ткани, предшествующей MALT-лимфоме, включают *Helicobacter pylori* (желудочная MALT-лимфома) [15], *Chlamydia psittaci* (MALT-лимфома придатков глаза) [17], *Campylobacter jejuni* (IPSID тонкой кишки) [18] и *Borrelia burgdorferi* (кожная MALT-лимфома) [16]. Аутоиммунные заболевания, такие как синдром Шегрена и тиреозит Хашимото, сопровождающиеся хроническим воспалением, предшествуют MALT-лимфомам слюнных желез и щитовидной железы. Синдром Шегрена/лимфоэпителиальный сиаладенит имеет 44-кратное увеличение риска развития лимфомы [20]. 85% лимфом у больных с синдромом Шегрена/лимфоэпителиальным сиала-

денитом составляют MALT-лимфомы. У больных с тиреозитом Хашимото в 3 раза выше риск развития лимфомы [21]. Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) — наиболее частое место локализации MALT-лимфом (50% всех случаев) [22]. Поражение тонкого кишечника, как правило, отмечают у пациентов с IPSID. MALT-лимфомы обнаруживают в слюнных железах (14%), легких (14%), орбите (12%), коже (11%), щитовидной железе (4%) и молочной железе (4%) [23].

У большинства пациентов заболевание диагностируют в I или II стадии. Меньшая часть пациентов (2—20%) имеет поражение костного мозга и поражение костей [24]. Поражение костного мозга редко отмечают при поражении желудка и более часто при MALT-лимфомах легких и придатков глаза. Мультифокальные очаги поражения при MALT-лимфоме наблюдают у 10% больных, чаще при опухолях ЖКТ, слюнных желез, кожи. Характерный признак во многих случаях — плазматическая дифференцировка; кроме того, у трети пациентов с MALT-лимфомой в сыворотке крови обнаруживают парапротеин (М-компонент) [25]. Исключение составляет иммунопролиферативная болезнь тонкого кишечника (IPSID), при которой в периферической крови обычно можно обнаружить aberrантные альфа-тяжелые цепи.

MALT-лимфома состоит из морфологически гетерогенных малых В-лимфоцитов маргинальной зоны (центроцитоподобного типа), моноцитоподобных клеток, малых лимфоцитов и единичных иммунобластов и центробластов. При MALT-лимфоме инфильтраты из опухолевых клеток обнаруживают в маргинальной зоне вокруг реактивно измененных В-клеточных фолликулов с сохраненной мантией. Плазматическую дифференцировку обнаруживают в опухолевых клетках, подвергшихся антигенной стимуляции, она присутствует примерно в одной трети MALT-лимфом желудка, часто в кожных MALT-лимфомах и служит постоянным признаком тиреозидных MALT-лимфом. Гистологическая особенность иммунопролиферативной болезни тонкого кишечника (IPSID) — плазматическая дифференцировка опухолевых клеток [26]. Иногда в небольшом количестве определяют большие клетки, напоминающие центробласты или иммунобласты. Опухолевые клетки маргинальной зоны инфильтрируют железистую ткань. При этом происходит разрушение эпителия, формируются так называемые лимфоэпителиальные поражения, что служит определяющим признаком MALT-лимфом. Лимфоэпителиальные поражения представляют собой агрегаты из трех или более опухолевых клеток маргинальной зоны с дистрофией и последующим разрушением эпителия. Опухолевый инфильтрат находится в краевой зоне реактивных В-клеточных фолликулов и распространяется в интерфолликулярную область. Опухолевые клетки иногда специфически колонизируют зародышевые центры реактивных фолликулов. Возникающие при этом изменения напоминают фолликулярную лимфому.

Дифференциальную диагностику MALT-лимфом проводят с реактивными воспалительными процессами, которые обычно предшествуют развитию лимфомы, например гастрит, вызванный *Helicobacter pylori*, лимфоэпителиальный сиаладенит, тиреозит Хашимото и другие лимфомы из мелких В-клеток (фолликулярная лимфома, лимфома из клеток мантии, лимфобластная лимфома). Отличие от реактивных процессов состоит в наличии деструктивных инфильтратов из экстрафолликулярных В-клеток, как правило, с морфологией клеток маргинальной зоны. В сложных случаях необходимо прибегать к иммунофенотипированию или молекулярно-генетическому анализу для оценки клональности В-клеток, чтобы установить или исключить диагноз MALT-лимфомы. Однако молекулярные исследования могут также продемонстрировать клональность В-клеток в некоторых неопухолевых разрастаниях. Отличие от других малых В-клеточных лимфом состоит в сочетании характерных морфологических и иммунофенотипических особенностей.

Иммунофенотип опухолевых клеток следующий: выявляют экспрессию IgM (при отсутствии IgD), реже — IgA или IgG. Опухолевые клетки MALT-лимфомы являются CD20+, CD79a+, CD5-, CD10-, CD23-, CD43+/-, CD11c+/- (слабая). В колонизированных клетками лимфомы фолликулах определяют сеть фолликулярных дендритных клеток, имеющих положительную экспрессию при иммуноморфологическом исследовании с CD21 и CD35. Специфические антигенные маркеры MALT-лимфом отсутствуют. В большинстве клеток определяют один тип легких цепей — κ или λ , что имеет важное значение в дифференциальной диагностике с доброкачественными лимфоидными инфильтратами. При дифференциальной диагностике с другими В-клеточными мелкоклеточными лимфомами характерно отсутствие CD5 (в отличие от большинства клеток мантии и малых лимфоцитов), циклина D1 (в отличие от клеток мантийной лимфомы) и CD10 (в отличие от фолликулярных лимфом). Диагноз IPSID ставят на основании наличия укороченных свободных тяжелых альфа-цепей и отсутствия легких альфа-цепей в биологических жидкостях (сыворотка крови, моча, выделения тощей кишки и другие жидкости). При IPSID опухолевые клетки (как маргинальной зоны, так и плазматические) экспрессируют тяжелые альфа-цепи (без легких цепей).

Цитогенетические и молекулярно-генетические аномалии при MALT-лимфомах достаточно разнообразны. MALT-лимфомы характеризуются перестройкой генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. В опухолевых клетках наблюдают соматические гипермутации генов вариабельных участков иммуноглобулинов, что указывает на их происхождение из В-клеток памяти из постзародышевых центров. К транслокациям, связанным с MALT-лимфомами, относят t(11; 18) (q21; q21), t(1; 14) (p22; q32), t(14; 18) (q32; q21) и t(3; 14) (p14.1; q32), что приводит к образованию химерного белка (API2-MALT1) или нарушению регуляции транскрипции (BCL10, MALT1, FOXP1) соответственно. Трисомии хромосом 3, 18 или реже других хромосом — редкий и неспецифический признак при MALT-лимфомах. Частота обнаружения транслокаций или трисомий заметно различается в зависимости от первичной локализации заболевания. Транслокацию t(11; 18) (q21; q21) чаще всего обнаруживают в MALT-лимфомах легких и желудка, t(14; 18) (q32; q21) — в MALT-лимфомах придатков глаза/орбиты и слюнных желез, t(3; 14) (p14.1; q32) — в MALT-лимфомах щитовидной железы, придатков глаза/орбиты и кожи. Отмечена географическая изменчивость заболеваемости и локализации MALT-лимфом, что предполагает различные воздействия окружающей среды, таких как инфекционные или другие этиологические факторы.

MALT-лимфомы характеризуются вялым течением и медленной диссеминацией. Рецидивы могут произойти после многих лет, включают различные экстранодальные локализации; их чаще встречают у пациентов с MALT-лимфомами вне желудка [24]. Распространение процесса на другие экстранодальные локализации и костный мозг не приводит к ухудшению течения заболевания. Длительные ремиссии бывают при MALT-лимфомах желудка, ассоциированных с *Helicobacter pylori* при предварительном проведении антибактериальной терапии. Исключение составляют случаи с t(11; 18) (q21; q21), резистентные к эрадикационной терапии *Helicobacter pylori*. При IPSID ремиссии наступали после терапии антибиотиками широкого спектра действия. Антибиотики также были успешно использованы для лечения других MALT-лимфом. Переход в диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому отмечают в редких случаях.

Лимфома маргинальной зоны лимфатического узла (ЛМЗЛУ) — первичная В-клеточная лимфома, морфологически сходна с ЛМЗ экстранодального и селезеночного типов, но без признаков экстранодального или селезеночного поражения. ЛМЗЛУ — редкое заболевание, которое составляет

2% всех лимфоидных новообразований [27]. В большинстве случаев ее встречают у взрослых (средний возраст — около 60 лет) в одинаковом соотношении у мужчин и женщин [28]. Такая лимфома может возникнуть у детей. У 20—24% пациентов обнаруживают вирус гепатита С [28]. Локализация поражения — периферические лимфатические узлы, иногда наблюдают поражение костного мозга и периферической крови [27].

Клинические особенности заключаются в том, что большинство пациентов имеют бессимптомное течение как при локализованной, так и генерализованной периферической лимфаденопатии [27, 28]. Необходимо исключить наличие первичной экстранодальной ЛМЗ.

Морфологически ЛМЗЛУ представлена опухолевыми клетками, малыми лимфоцитами и редкими плазматическими клетками, которые инфильтрируют маргинальную зону реактивных фолликулов и распространяются в межфолликулярные пространства лимфатических узлов. При диффузном поражении в сохранившихся фолликулах можно выявить фолликулярные дендритные клетки и определить маркеры зародышевых центров. Наличие остатков фолликулярных дендритных клеток показывает колонизацию фолликулов, что помогает установлению диагноза ЛМЗЛУ. Опухолевые клетки представлены клетками среднего размера с овальными или вдавленными ядрами с нежной структурой хроматина (центроцитоподобные В-клетки), а также клетками с бобовидным ядром и широким ободком светло-голубой цитоплазмы (моноцитоподобные В-клетки). Варианты с выраженными признаками плазматической дифференцировки необходимо дифференцировать с лимфоплазматической лимфомой. В некоторых случаях имеет место наличие более многочисленных крупных трансформированных клеток (иногда более 20%). Тем не менее, эти клетки, как правило, смешанные, с небольшими клетками и могут быть более распространенными в колонизированных зародышевых центрах.

Иммунофенотип большинства ЛМЗЛУ характеризуется положительной экспрессией пан-В-клеточных маркеров с коэкспрессией CD43 в 50% случаев. Экспрессия CD5, CD23, CD10, BCL6 и циклина D1 отрицательна и BCL2 положительна в большинстве случаев. Экспрессия IgD положительна в большинстве случаев. Опухоли, имитирующие СЛМЗ, имеют сходный фенотип, но, как правило, IgD положительны.

В ЛМЗЛУ наблюдают перестройку генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов и в большинстве случаев соматические мутации VH3- и VH4-генов. Обнаруживают трисомии 3, 18 и 7 хромосом. Не обнаруживают транслокации, связанные с экстранодальными ЛМЗ.

Определен нормальный аналог опухолевых клеток — В-клетка постзародышевого центра маргинальной зоны. Заболевание характеризуется благоприятным течением. 60—80% больных выживают более 5 лет [28]. В редких случаях может происходить трансформация в В-крупноклеточную лимфому.

Педиатрические ЛМЗЛУ имеют отличительные клинические и морфологические характеристики [29]. Их встречают преимущественно у мальчиков (соотношение 20:1). Как правило, они протекают бессимптомно, в локализованной стадии болезни (в 90% — стадия I), в основном с поражением лимфатических узлов головы и шеи. Гистологически опухоль подобна ЛМЗЛУ взрослых, за исключением того, что постепенно трансформируются зародышевые центры, в которых происходят разрушение внешней границы фолликулы и инфильтрация опухолевыми клетками.

Иммунофенотип похож на ЛМЗЛУ взрослых [29]. Дифференциальную диагностику следует проводить с атипичной гиперплазией маргинальной зоны с моноклональной экспрессией Ig, большие клетки могут экспрессировать CD43. В связи с этим необходимо исследование клональных перестроек IGH альфа-цепи для дифференциации педиатрической ЛМЗЛУ от реактивных изменений [29]. Прогноз педиатрической ЛМЗЛУ отличается очень низкой частотой

Сравнительная характеристика различных методик иммунофенотипирования при лимфоме маргинальной зоны

Антитела	ИГХ-метод		Проточная цитофлюориметрия		ИЦХ-метод		Коэффициент корреляции (r), p < 0,05
	Число больных,%	Степень	Число больных,%	Степень	Число больных,%	Степень	
CD19	100	Выраженная	100	Выраженная	100	Выраженная	1
CD20	100	Выраженная	100	Выраженная	100	Выраженная	1
CD79a	100	Выраженная	100	Выраженная	100	Выраженная	1
CD10	0		0		0		1
CD23	0		0		0		1
CD34	0		0		0		1
TdT	0		0		0		1
Igλ/Igκ	Не выполняли		100	Выраженная	Не выполняли		
Bcl2	60	Выраженная	60	Выраженная	60	Выраженная	1
Bcl6	0		0		0		1
CD3	0		0		0		1
CD4	0		0		0		1
CD8	0		0		0		1
CD5	0		0		0		1
Cyclin D1	0		Не выполняли		0		1

рецидивов и долгосрочной выживаемостью после консервативного лечения.

Цель исследования: определить возможности комплексной морфологической диагностики (рутинной цитологии и гистологии, иммуноцитохимии — ИЦХ и иммуногистохимии — ИГХ, молекулярной генетики) ЛМЗ.

Материал и методы. В исследование включены 10 больных с установленным на основании применения морфологического (цитологического и гистологического), иммуноморфологического (ИЦХ и ИГХ) и молекулярно-генетического методов исследования диагноза ЛМЗ.

Исследуемая группа больных была представлена 6 женщинами и 4 мужчинами (соотношение женщин и мужчин — 3:2) в возрасте от 24 до 74 лет (средний возраст — 56 лет) (рис. 1).

У 8 больных наблюдали экстранодальные поражения (MALT-лимфомы) (желудок — 4, околоушные слюнные железы — 2, легкие — 1, орбита — 1), у 2 больных были поражены лимфатические узлы (надключичные лимфатические узлы — 1, шейные — 1). У одного больного с MALT-лимфомой слюнной железы выявлено поражение костного мозга. Цитологический материал представлял: у 2 больных — пунктаты лимфатических узлов (1 — шейный лимфатический узел, у 1 — надключичный лимфатический узел), у 4 — отпечатки с кусочка опухоли желудка, у 2 — пунктаты слюнных желез, у 1 — пунктат орбиты, у 1 — пунктат легкого.

Для иммунофенотипирования применяли ИЦХ-метод (EpVision FLEX) с использованием моноклональных антител фирмы DAKO. Панель антител включала: общий лейкоцитарный антиген, общие цитокератины, CD19, CD20,

CD79a, CD10, Bcl2, Bcl6, CD23, CD34, TdT, CD3, CD4, CD5, CD8, CyclinD1, Ki67.

Для иммунофенотипирования методом проточной цитофлюориметрии (проточный цитофлюориметр FACS Calibur фирмы Becton Dickinson, США) применяли антитела фирмы DAKO, меченные флюоресцентными метками (FITC или RPE): CD45, CD19, CD20, CD79a, CD10, Bcl2, Bcl6, CD23, CD34, TdT, κ, λ, CD3, CD4, CD5, CD8, Ki67.

Флюоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) применяли в некоторых случаях для диагностики MALT-лимфом. FISH — это метод прямого выявления нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) в клеточных структурах с помощью флюоресцентно меченых зондов. Метод позволяет определить специфические нуклеотидные последовательности непосредственно в клетках, так как зонды, меченные флюорохромами, наносят прямо на клеточный образец, содержащий генетический материал, при этом морфология изучаемых клеток не меняется. Применяли два варианта FISH-метода: на гистологических срезах парафиновых блоков толщиной 4 мкм и на цитологическом материале. Разработка методики FISH на цитологическом материале позволила значительно расширить диагностические возможности цитогенетических исследований. Для дифференциальной диагностики с фолликулярной лимфомой определяли перестройку гена *Bcl2*. Применяли FISH-метод со стратегией разделения (или расщепления сигнала) в исследуемом гене без установления участника транслокации. Использовали зонд *Bcl2* (*Bcl2* FISH DNA Probe, Split Signal, фирмы DAKO). Ген человека *Bcl2* состоит из трех экзонов, охватывающих область 195 кб на длинном плече хромосомы 18 в районе 2 полосы 1 (q21). *Bcl2* FISH ДНК — смесь двух зондов: меченый техасским красным (TexRed) ДНК-зонд (*Bcl2*-вверх), охватывающий 375 кб теломерной области к точке разрыва, и ДНК-зонд (*Bcl2*-вниз), меченный флюоресцеинизотионатом (FITC), охватывающий 641 кб центромерной области к точке разрыва.

В 30—50% случаев зрелоклеточных MALT-лимфом проявляется транслокация t(11; 18) (q21; q21), которая высоко специфична, ее редко выявляют при других нозологических формах лимфом. Для диагностики ЛМЗ у трех больных с помощью FISH-метода определяли транслокацию t(11; 18) (q21; q21), вовлекающую ген ингибитора апоптоза *API2* и ген *MALT1*, которая приводила к обмену гена, локализуемого в локусе q21 (*API2*) хромосомы 11 на 18 хромосому в локус q21 (*MALT1*), что увеличивает синтез каспазы-подобной протеазы и приводит к блокированию апоптоза. Следствие такой перестройки генов — более высокая выживаемость опухо-

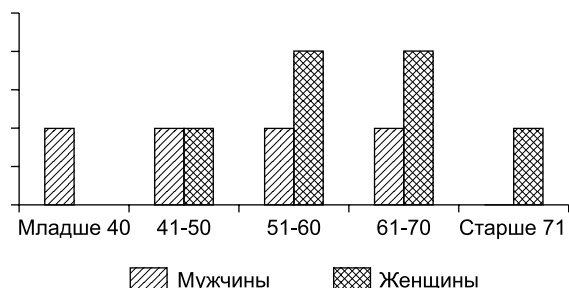


Рис. 1. Возрастные показатели больных лимфомой маргинальной зоны.

левых В-клеток. Ген человека *MALT1* состоит из 17 экзонов, охватывающих область 80 кб на хромосоме 18 в районе 2 полосы 1 (q21). Проводили FISH-исследование с зондом *MALT1* (*MALT1* FISH DNA Probe Split Signal фирмы DAKO), который представляет собой смесь двух зондов: меченный тейхасским красным (TexRed) ДНК-зонд, (*MALT1*-вверх), охватывающий 316 кб центромерной области от точки разрыва, и меченный флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) ДНК-зонд (*MALT1*-вниз), охватывающий 508 кб теломерной области от точки разрыва.

Гибридизацию выполняли по протоколам фирмы-производителя DAKO для локус-специфических проб. Визуализацию сигналов проводили под флюоресцентным микроскопом Zeiss-Axioscope с использованием тройного фильтра DAPI/RED/GREEN. В каждом случае анализировали 200 интерфазных ядер с четкими сигналами.

Оценку результатов гибридизации ДНК-зонда *MALT1* FISH DNA Probe Split Signal фирмы DAKO проводили следующим образом. Позитивными (с транслокацией) считали ядра с одним красным, одним зеленым и одним желтым сигналами. Ядра с двумя желтыми сигналами считали негативными. Позитивный результат свидетельствовал о наличии транслокации t(11; 18)(q21; q21).

Методика FISH включала этапы депарафинизации (в случае гистологического материала), инкубации с пепсином, денатурации ДНК и гибридизации с ДНК-зондом. Основные сложности при оценке результатов, особенно старых блоков, — деформация клеток при первичной обработке формалином, их близкое расположение друг к другу, что вызывало наложение сигналов и, соответственно, проблемы при интерпретации полученных данных.

Результаты. Определена гистологическая картина ЛМЗ, которая довольно гетерогенна. В составе опухолевого инфильтрата в различных сочетаниях определяли клетки маргинальной зоны (центроцитоподобного типа), малые лимфоциты, в небольшом количестве — иммунобласты и центробласты, клетки моноцитоподобного типа (рис. 2, см. обложку). Таким образом, при гистологическом исследовании оценивали клеточный состав, атипичность опухолевых клеток, наличие плазмцитоподобной дифференцировки и плазмцитарной инфильтрации, присутствие реактивных лимфоидных фолликулов с явлениями колонизации, наличие крупных бластных клеток. При экстранодальных поражениях определяли наличие и выраженность лимфоэпителиальных поражений. Лимфоэпителиальные поражения представляли агрегаты из трех и более клеток маргинальной зоны, разрушающие эпителий желез (рис. 3, см. обложку).

Цитологическая картина ЛМЗ также гетерогенна и представлена полиморфными клетками, которые могут присутствовать в разном количестве: клетки типа малых лимфоцитов, центроцитоподобные, моноцитоподобные В-клетки, клетки с признаками плазмцитарной дифференцировки (рис. 4, см. обложку). Центроцитоподобные клетки цитологически имели мелкий и средний размер, неправильный контур ядерной мембраны, умеренно плотный хроматин, малозаметное ядрышко. В других клетках ядра имели бобовидную форму, цитоплазма была относительно обильной бледно окрашенной, что придавало клеткам моноцитоподобный вид. В ряде случаев наблюдали плазмцитоподобную дифференцировку. Возможна незначительная примесь больших клеток типа центробластов и иммунобластов. В ряде случаев встречали зрелые плазматические клетки.

Проведено параллельное изучение гистологических и цитологических препаратов больных с установленным диагнозом MALT-лимфомы.

В четырех случаях с гистологически установленным диагнозом MALT-лимфомы желудка цитограмма была представлена опухолевыми лимфоцитами мелкого и среднего размера, напоминающими центроциты: слегка плотные ядра клеток,

скудная цитоплазма, отсутствие ядрышек. Часть клеток имела моноцитоподобную морфологию: бобовидной формы ядра, обильная светлоокрашенная цитоплазма. Иногда обнаруживали отдельно расположенные клетки, сходные с центробластами или иммунобластами. Встречали плазматические клетки. Наблюдали дистрофию и распад эпителиальных клеток желез.

В двух случаях с гистологически установленным диагнозом MALT-лимфомы слюнных желез цитограмма была представлена центроцитоподобными лимфоидными и моноцитоподобными клетками, эпителиальные клетки были разрушены.

В одном случае с гистологически установленным диагнозом MALT-лимфомы легких цитограмма была представлена мономорфным клеточным составом из центроцитоподобных лимфоидных клеток.

В одном случае с гистологически установленным диагнозом MALT-лимфомы придатков глаза цитограмма была представлена моноцитоподобными и центроцитоподобными лимфоидными клетками.

В двух случаях с гистологически установленным диагнозом нодальной ЛМЗ цитограмма была полиморфна: преобладали моноцитоподобные лимфоидные опухолевые клетки с обильной светлоокрашенной цитоплазмой, встречали центроцитоподобные клетки, единичные клетки бластного типа (центробласты и иммунобласты), плазматические клетки и гранулоциты.

Рутинное цитологическое исследование 10 случаев позволило установить точный диагноз лимфомы лишь в пяти из них, без указания, что это ЛМЗ. В двух случаях при рутинном цитологическом исследовании высказано лишь подозрение на лимфому. Таким образом, для рутинной цитологии MALT-лимфом чувствительность составила 50%, специфичность — 100% и точность — 50% в установлении диагноза лимфомы без указания на тип. Возраст больных старше 50 лет, экстранодальная локализация, хроническое течение заболевания (аутоиммунные заболевания, хронические инфекции, в том числе гепатит С), типичная цитологическая картина позволили у 7 больных предположить наличие ЛМЗ.

Всем 10 больным проведено иммунофенотипирование различными методами: ИЦХ, проточная цитофлюориметрия и ИГХ (см. таблицу).

У 10 больных наблюдали положительную экспрессию пан-В-клеточных маркеров CD19, CD20, CD79a как при ИГХ, так и при ИЦХ и проточной цитофлюориметрии. Причем экспрессию пан-В-клеточных маркеров опухолевыми клетками оценивали как выраженную. У 6 (60%) больных наблюдали положительную экспрессию Bcl2 как при ИГХ, так и при ИЦХ и проточной цитофлюориметрии. При сравнении ИГХ, проточной цитофлюориметрии и ИЦХ выявлено отсутствие экспрессии CD5, CD3, CD10, CD34, CD23, Bcl6, TdT, циклина D1. При ИГХ и ИЦХ в 10 случаях белок пролиферативной активности Ki-67 составил не более 30%.

При проточной цитофлюориметрии определяли клональность по легким цепям иммуноглобулинов к или λ (Igλ/Igκ).

В целом коэффициент корреляции ($r, p < 0,05$) между данными ИГХ и ИЦХ, проточной цитофлюориметрии составил 1 (рис. 5). При проточной цитофлюориметрии проводили определение клональности по легким цепям λ или κ, что не выполняли при ИГХ и ИЦХ из-за сильного фонового окрашивания (рис. 6, см. обложку).

Поскольку патогномоничные иммуноморфологические признаки при ЛМЗ отсутствуют, прежде всего необходимо исключить другие мелкоклеточные В-клеточные лимфомы. При иммуноморфологическом исследовании дифференциально-диагностическую ценность представляет сравнение экспрессии антител CD20 и CD3. При ЛМЗ наблюдали преобладание CD20-позитивных В-лимфоцитов (рис. 7, см. обложку) над CD3-позитивными Т-лимфоцитами (рис. 8, см. обложку). При реактивных процессах Т-лимфоциты преобладают над В-лимфоцитами или находятся в равном соотношении. Точ-

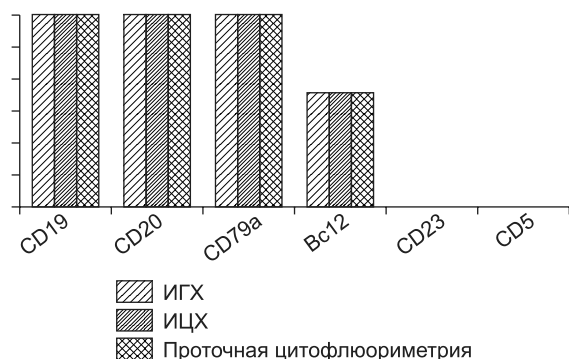


Рис. 5. Результаты иммунотипирования лимфомы маргинальной зоны. Коэффициент корреляции — 1,0 ($r, p < 0,05$).

ность иммунофенотипирования, позволяющая установить ЛМЗ, составила 100%, чувствительность — 100%, специфичность — 100%.

Четырем больным для уточнения диагноза проведена FISH-реакция. Одному больному с нодальной лимфомой проведена FISH-реакция с использованием зонда *Bcl2* (*Bcl2* FISH DNA Probe, Split Signal, Y5407) для дифференциальной диагностики с фолликулярной лимфомой. Перестройка гена *Bcl2* у больного с нодальной лимфомой маргинальной зоны не обнаружена. Для ЛМЗ наиболее частой является транслокация $t(11; 18)(q21; q21)$, которая приводит к обмену гена ингибитора апоптоза *API2*, локализующегося в локусе q21 хромосомы 11 на 18 хромосому в локус q21 в зону гена *MALT1*, отвечающего за синтез каспаза-подобной протеазы. Такая перестройка генов приводит к более высокой выживаемости опухолевых В-клеток. 3 больным (1 — с MALT-лимфомой слюнной железы, 2 — с MALT-лимфомой желудка) проведено FISH-исследование с зондами *MALT1* (*MALT1* FISH DNA Probe Split Signal фирмы DAKO). У 3 больных обнаружена перестройка гена *MALT1*. Точность, чувствительность и специфичность комплексного исследования (цитологии, ИГХ и FISH-метода) в диагностике ЛМЗ составили 100%.

Заключение. Таким образом, точность рутинного цитологического исследования при установлении диагноза лимфомы без указания на ее тип при ЛМЗ составила 50%, чувствительность — 50%, специфичность — 100%. Установить точный диагноз ЛМЗ на основании рутинного цитологического метода не представляется возможным. Можно лишь предположить наличие ЛМЗ при длительном течении хронической инфекции (хронический гастрит, связанный с *Helicobacter pylori*, поражение придатков глаза, связанных с *Chlamydia psittaci*, гепатита С) либо аутоиммунного заболевания (например, синдром Шегрена при поражении слюнных желез, тиреоидит Хашимото). Следует учитывать и цитологическую картину, которая, как правило, полиморфна и представлена клетками типа малых лимфоцитов, центроцитоподобными и моноцитоподобными В-клетками, а также клетками с плазмоцитоподобной дифференцировкой.

Точность иммунофенотипирования, позволяющая установить ЛМЗ, составила 100%, чувствительность — 100%, специфичность — 100%. Коэффициент корреляции ($r, p < 0,05$) между данными ИГХ и ИЦХ, протоочной цитофлуориметрии составил 1. Патогномоничные иммуноморфологические признаки для ЛМЗ отсутствуют. В дифференциальной диагностике использовали метод исключения других мелко-клеточных В-клеточных лимфом. При иммуноморфологическом исследовании дифференциально-диагностическую ценность представляет сравнение экспрессии антител CD20 и CD3: преобладание CD20-позитивных В-лимфоцитов над CD3-позитивными Т-лимфоцитами, наблюдаемое при ЛМЗ.

При реактивных процессах Т-лимфоциты в лимфоидноклеточном инфильтрате преобладают над В-лимфоцитами или находятся в равном соотношении.

Точность, чувствительность и специфичность комплексного исследования (цитологии, ИЦХ и FISH-метода) в диагностике ЛМЗ составили 100%. Выявление при FISH-реакции хромосомной транслокации $t(11; 18)$ у 3 больных MALT-лимфомой необходимо для назначения рационального лечения, поскольку случаи MALT-лимфомы желудка с $t(11; 18)$ резистентны к антибактериальной терапии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2—29 см. REFERENCES)

1. Поддубная И.В., Москаленко О.А., Балакирева Ю.Н. Неходжкинские лимфомы маргинальной зоны. *Современная онкология*. 2006; 1: 8—12.

REFERENCES

1. Poddubnaya I.V., Moskalenko O.A., Balakirev Yu.N. Non-Hodgkin's lymphomas of the marginal zone. *Sovremennaya onkologiya*. 2006; 1: 8—12. (in Russian)
2. Harris N.L., Jaffe E.S., Stein H. et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994; 84(5): 1361—92.
3. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. *WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues (ed 4th)*. Lyon: IARC; 2008.
4. Armitage J.O., Weisenburger D.O. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16: 2780—95.
5. Berger F., Felman P., Thieblemont C., Pranier T., Basseggio L., Bryon P.A., Salles G., Callet-Bauchu E., Coiffier B. Non-MALT marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. *Blood*. 2000; 95: 1950—6.
6. Mollejo M., Menarguez J., Lloret E., Sanchez A., Campo E., Algara P., Cristobal E., Sanchez E., Piris M.A. Splenic marginal zone lymphoma: a distinctive type of low-grade B-cell lymphoma. A clinicopathological study of 13 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 1995; 19: 1146—57.
7. Isaacson P.G., Matutes E., Burke M., Catovsky D. The histopathology of splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood*. 1994; 84: 3828—34.
8. Hammer R.D., Glick A.D., Greer J.P., Collins R.D., Cousar J.B. Splenic marginal zone lymphoma. A distinct B-cell neoplasm. *Am. J. Surg. Pathol.* 1996; 20: 613—26.
9. Melo J.V., Hegde U., Parreira A., Thompson I., Lampert I.A., Catovsky D. Splenic B cell lymphoma with circulating villous lymphocytes: differential diagnosis of B cell leukaemias with large spleens. *J. Clin. Pathol.* 1987; 40: 642—51.
10. Matutes E., Morilla R., Owusu-Ankomah K., Houlihan A., Catovsky D. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood*. 1994; 83: 1558—62.
11. Thieblemont C., Nasser V., Felman P., Leroy K., Gazzo S., Callet-Bauchu E., Loricod B., Granjeaud S., Gaulard P., Haioun C., Traverse-Glehen A., Basseggio L., Bertucci F., Birnbaum D., Magrangeas F., Minvielle S., Avet-Loiseau H., Salles G., Coiffier B., Berger F., Houlgatte R. Small lymphocytic lymphoma, marginal zone B-cell lymphoma, and mantle cell lymphoma exhibit distinct gene-expression profiles allowing molecular diagnosis. *Blood*. 2004; 103: 2727—37.
12. Isaacson P.G., Du M.Q. MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; 4: 644—653.
13. Doglioni C., Wotherspoon A.C., Moschini A., de Boni M., Isaacson P.G. High incidence of primary gastric lymphoma in north-eastern Italy. *Lancet*. 1992; 339: 834—35.
14. Pincel D. Differentiating juvenile myelomonocytic leukemia from infectious disease. *Blood*. 1998; 91: 365—7.
15. Hussell T., Isaacson P.G., Crabtree J.E., Spencer J. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet*. 1992; 342: 571—4.
16. Cerroni L., Zochling N., Putz B., Kerl H. Infection by *Borrelia burgdorferi* and cutaneous B-cell lymphoma. *J. Cutan. Patol.* 1997; 24: 457—61.
17. Ferreri A.J., Ponzoni M., Guldoboni M., Resti A.G., Politi L.S., Cortelazzo S., Demeter J., Zallio F., Palmas A., Muti G., Dognini G.P., Pasini E., Lettini A.A., Sacchetti F., De Concilis C., Doglioni C., Dolcetti R. Bactericidal therapy with doxycycline in ocular adnexal MALT lymphoma: a multicenter prospective trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006; 98: 1375—82.
18. Lecuit M., Abachin E., Martin A., Poyart C., Pochart P., Suarez F.,

- Bengoufa D., Feuillard J., Lavergne A., Gordon J.I., Berche P., Guillemin L., Lortholary O. Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 239—48.
19. Isaacson P.G. Gastrointestinal lymphoma. *Hum. Patol.* 1994; 25: 1020—9.
20. Kassan S.S., Thomas T.L., Moutsopoulos H.M., Hoover R., Kimberly R.P., Budman D.R., Costa J., Decker J.L., Chused T.M. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann. Intern. Med.* 1978; 89: 888—92.
21. Aozasa K. Hashimoto's thyroiditis as a risk factor of thyroid lymphoma. *Acta Pathol. Jpn.* 1990; 40: 459—68.
22. Radaszkiewicz T., Dragosics B., Bauer P. Gastrointestinal malignant lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue: factors relevant to prognosis. *Gastroenterology* 1992; 102: 1628—38.
23. Thieblemont C., Bastion Y., Berger F., Rieux C., Salles G., Dumontet C., Felman P., Coiffier B. Mucosa-associated lymphoid tissue gastrointestinal and nongastrointestinal lymphoma behavior: analysis 108 patients. *Blood.* 1997; 95: 802—6.
24. Raderer M., Streubel B., Woehrer S., Poespoeck A., Jaeger U., Formanek M., Chott A. High relapse rate in patients with MALT lymphoma warrants lifelong follow-up. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 3349—52.
25. Woehrer S., Steubel B., Bartsch R., Chott A., Raderer M. Monoclonal immunoglobulin production is a frequent event in patients with mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 7179—81.
26. Price S.K., Immunoproliferative small intestinal disease: a study of 13 cases with alpha heavy-chain disease. *Histopathology.* 1990; 17: 7—17.
27. Berger F., Felman P., Thieblemont C., Pradier T., Baseggio L., Bryon P.A., Salles G., Callet-Bauchu E., Coiffier B. Non-MALT marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. *Blood.* 2000; 95: 1950—6.
28. Arcaini L., Paulli M., Burcheri S., Rossi A., Spina M., Passamonti F., Lucioni M., Motta T., Canzonieri V., Montanari M., Bonoldi E., Gallamini A., Uziel L., Crugnola M., Ramponi A., Montanari F., Pascutto C., Morra E., Lazzarino M. Primary nodal marginal zone B-cell lymphoma: clinical features and prognostic assessment of rare disease. *Br. J. Haematol.* 2007; 136: 301—4.
29. Tadesse-Heath L., Pittaluga S., Sorbara L., Bussey M., Raffeld M., Jaffe E.S. Marginal zone B-cell lymphoma in children and young adults. *Am. J. Surg. Pathol.* 2003; 27: 522—531.

Поступила 30.03.17

Принята к печати 15.04.17

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 579.861.2.083.18

Балбуцкая А.А.¹, Дмитренко О.А.², Скворцов В.Н.¹

СОВРЕМЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КОАГУЛАЗОПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *STAPHYLOCOCCUS*

¹ Белгородский филиал ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», 308002, Белгород, Российская Федерация;

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 123098, Москва, Российская Федерация

Развитие молекулярных методов исследований в конце XX века позволило расширить номенклатуру видов, образующих род *Staphylococcus*, который в настоящее время насчитывает 51 вид и 27 подвидов. Патогенные виды рода обладают способностью коагулировать плазму крови млекопитающих, образуя группу коагулазопозитивных стафилококков (КПС), включающую 7 видов: *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, *S. hyicus*. В клинической практике наиболее вирулентным среди стафилококков считается *S. aureus*. Накопленные данные свидетельствуют о возрастающей этиологической значимости в инфекционной патологии человека и животных других представителей группы КПС. Пристального внимания заслуживают *Staphylococcus intermedius* группы (SIG), объединяющей три близкородственных вида: *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. delphini*, среди которых наиболее широкое распространение получили метициллинустойчивые клоны *S. pseudintermedius*, способные вызывать различные гнойно-воспалительные заболевания у человека. Лабораторные методы, основанные на фенотипических тестах, не позволяют дифференцировать КПС из-за значительного сходства фенотипических свойств у некоторых представителей этой группы. Проведён сравнительный анализ эффективности различных методов видовой идентификации КПС: биохимического, молекулярно-генетических (мультипраймерная ПЦР (М-ПЦР) для идентификации различий структуры гена термонуклеазы, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) гена каталазы и их секвенирование), матрично-активированная лазерная десорбционная/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-ToF MS) с различными способами пробоподготовки. Исследовано 117 изолятов представителей SIG, выделенных от больных и здоровых особей мелких домашних животных, клинические изоляты от пациентов стационаров. М-ПЦР позволила идентифицировать 97% изолятов, ПДРФ-анализ — 100% изолятов, что подтверждает эффективность молекулярно-генетических методов исследования. MALDI-ToF MS требует пополнения базы данных масс-спектрометра и использование способа предварительной белковой экстракции проб для повышения эффективности видовой идентификации КПС.

Ключевые слова: коагулазоположительные стафилококки; *Staphylococcus intermedius* group (SIG); видовой идентификация, молекулярно-генетические методы; *nuc* ген; *kata* ген; времяпролетная MALDI масс-спектрометрия.

Для цитирования: Балбуцкая А.А., Дмитренко О.А., Скворцов В.Н. Современные особенности видовой идентификации коагулазоположительных бактерий рода *Staphylococcus*. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (8): 497-502. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-497-502>

Для корреспонденции: Балбуцкая Анна Александровна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. Белгородского филиала ФГБНУ «Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», e-mail: negra-2007@mail.ru