



# Жидкостная цитология в скрининге рака шейки матки

К.б.н., доцент кафедры КЛД КГМА Анцилевич Л.М.

# Рак шейки матки - статистика



*Рак шейки матки занимает II место в мире среди злокачественных опухолей репродуктивных органов у женщин и уступает только раку молочной железы*

*Только в России от рака шейки матки ежедневно умирает 17 женщин*

*В последние годы заболеваемость раком шейки матки растет у женщин в возрастной группе до 29 лет*

## Заболевание раком шейки матки в России (1996-2006) на 100 000 женщин



Источник: «Злокачественные новообразования в России в 2009 году»" Под редакцией академика В. И. Чиссова, Москва, 2011

# Скрининг рака шейки матки

- Рак шейки матки развивается в течение 7-15 лет. Заболевание, выявленное на ранних стадиях, поддается 100% излечению.
- С помощью простого цитологического исследования можно обнаружить патологию клеток до появления злокачественной стадии.
- Риск развития инвазивного рака в 5-10 раз выше у женщин, которые никогда не участвовали в скрининге.
- Скрининг женщин в возрасте 25-64 лет с интервалом 5 лет может привести к снижению смертности на 84%
- Скрининг в возрасте 25-63 лет с интервалом в 3 года – к снижению смертности на 90%.

# Виды скрининговых цитологических исследований

Традиционное цитологическое исследование

Исследование методом жидкостной цитологии

## Традиционная и жидкостная цитология. Сравнение.

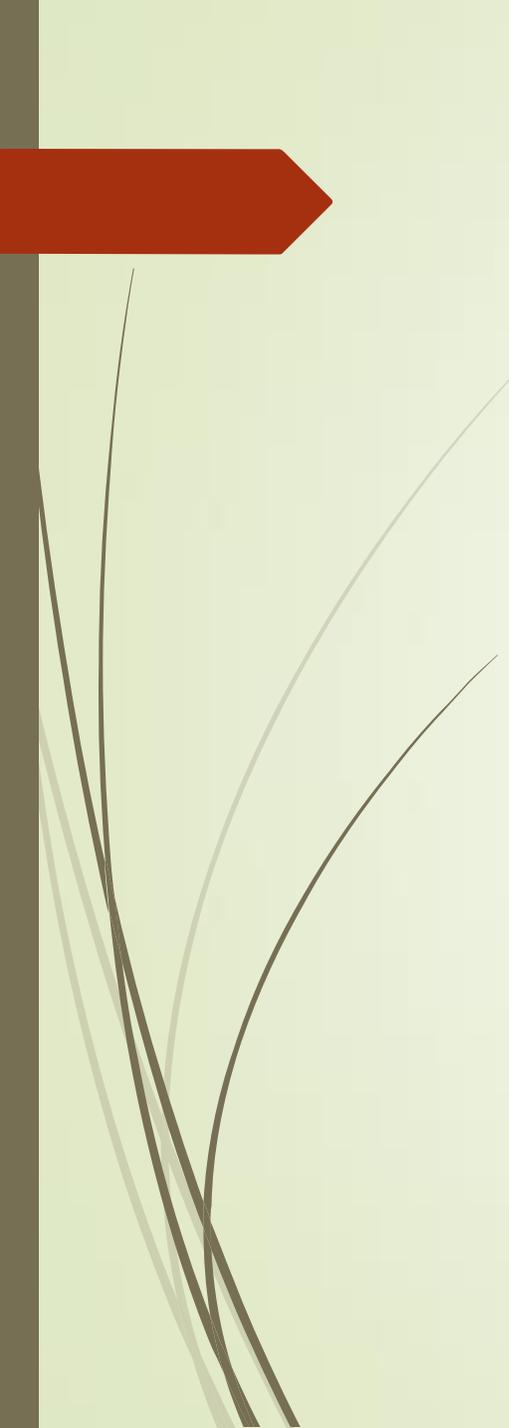
	Традиционная цитология	Жидкостная цитология
<b>Забор материала</b>		Специальным инструментом (щеточкой) с экзо- и эндоцервикса
<b>Обработка и приготовление препарата</b>	 <p>Со щеточки материал наносится на сухое стекло. Фиксация – высушивание на воздухе. Ручная окраска по Паппенгейму</p>	 <p>Материал со щеточки помещается в контейнер с консервирующей жидкостью. Фиксация влажная. Автоматическое приготовление и окраска препарата.</p>
<b>Микроскопия</b>		По правилам микроскопии цитологических препаратов

# Сравнение методов исследования

Параметр	Традиционный метод исследования	Метод жидкостной цитологии
Тип препарата	Многослойный (толстый)	Монослойный
Объем исследуемого материала	Часть собранного материала	Весь собранный материал
Распределение материала на стекле	Неравномерное	Равномерное
Наличие сопутствующих элементов	Слизь, элементы воспаления и периферической крови, разрушенные клетки	Минимальное
Сохранность исследуемого материала	При нарушении правил влажной фиксации – высыхание, бактериальное загрязнение препарата	Транспортировка материала в оптимальных условиях, благодаря стабилизирующему раствору
Количество цитологических препаратов, получаемых из одного анализа	Один препарат	До 5 препаратов
Окрашивание	Неравномерное окрашивание клеточного материала, связанное с его многослойностью	Равномерное окрашивание препарата

# Расшифровка анализов по системе Бетесда.

- ASC-US – наблюдаются изменения плоских клеток эпителия; часто такой показатель встречается у женщин в возрасте от 45-ти лет в связи со снижением уровня эстрогена;
- AGC – выявлены измененные цилиндрические клетки, что является показателем воспалительных заболеваний (например, вагиноза);
- LSIL – имеется небольшой процент атипичных клеток не раковой этиологии;
- ASC-H – обнаружены нарушения в клеточном строении, что указывает на предраковое состояние (дисплазию) или начальную стадию развития рака;
- HSIL – данная аббревиатура указывает на онкоцитологию, что подтверждается наличием в образце измененных плоских клеток;
- AIS – наличие в мазке клеток цилиндрического эпителия, что указывает на рак.

- 
- При использовании метода жидкостной цитологии чувствительность теста достигает 95 %, в то время как при традиционном цитологическом анализе – лишь 40-60 %.
  - По рекомендации ВОЗ жидкостная цитология является «**ЗОЛОТЫМ СТАНДАРТОМ**» исследования мазка.

# 90 гг. 3 производителя оборудования для жидкостной цитологии

- 1. система **ThinPrep** производства Hologic, США , включающая в себя раствор (жидкость) для консервации Thinprep Pap test, процессор Thinprep 2000 и систему визуализации микропрепаратов ThinPrep imaging system,
- 2. система **SurePath** производства Becton Dickinson, США, включающая в себя раствор (жидкость) для консервации surepath, раствор (жидкость) для фильтрации клеток от слизи и крови Density Gradient, аппарат для окраски мазков Prepstain и сканер для микропрепаратов FocalPoin Slide Profiler с программным обеспечением,
- 3. цитоцентрифуга **CytoSpin** производства фирмы Thermo Shandon, Великобритания.

# Три типа технологий изготовления цитологических тонкослойных слайд-препаратов

- 1. Технология **ThinPrep (Cytoc Corporation)** – закрытая автоматическая система для гинекологического PAP-скрининга, исследования некоторых типов биожидкостей.
- 2. Технология **SurePath™ (Becton Dickinson)** – полуавтоматизированная закрытая система для гинекологического PAP-скрининга и исследования некоторых других биожидкостей.
- 3. Технологии цитоцентрифугирования – **Cyto System (Andreas Hettich GmbH)** и **CytoSpin (Thermo Shandon Inc)** – открытые технологии, основой которых является нанесение тонкослойного клеточного препарата на слайд из пробы, полученной при использовании ЖЦ во время горизонтального центрифугирования в системах специальной конструкции

# Технология ThinPrep (Cytoc Corporation)

- Этапы технологии ThinPrep:
- 1. Получение пробы в жидкой форме (биожидкости) или при смыве со специальной щетки или шпателя с использованием специального контейнера, который содержит фиксирующий клетки транспортный раствор.
- 2. Автоматическое перемешивание, вакуумная фильтрация, концентрация клеток на фильтре, аппликация клеток в определенную зону специального слайда и окраска по Папаниколау (все операции проводятся внутри специального устройства по закрытой технологии).
- 3. Автоматический или ручной анализ препарата.

# Технология SurePath™ (Bekton Dickinson)

- ▶ **Этапы технологии SurePath:**
- ▶ **1. Получение пробы в жидкой форме (биожидкости) или при смыве со специальной щетки или шпателя с использованием специального контейнера, который содержит фиксирующий клетки транспортный раствор.**
- ▶ **2. Перемешивание.**
- ▶ **3. Автоматическое дозирование жидкой пробы в пробирки со специальным раствором для градиентного центрифугирования.**
- ▶ **4. Очищение и концентрирование исследуемых клеток центрифугированием в градиентном растворе.**
- ▶ **5. Аликвотирование клеточного осадка, его разведение, перемешивание.**
- ▶ **6. Дозирование клеточной суспензии в цитокамеру, которая закреплена вертикально на специальном слайде.**
- ▶ **7. Инкубация для проведения пассивной седиментации (осаждение) в ограниченную просветом цитокамеры зону слайда.**
- ▶ **8. Окраска по Папаниколау.**
- ▶ **9. Автоматический или ручной анализ препарата.**

# Технологии цитоцентрифугирования

- ▶ **Этапы технологии цитоцентрифугирования (ЦЦ):**
- ▶ 1. Получение пробы.
- ▶ 2. Перемешивание пробы.
- ▶ 3. Проведение дополнительных операций по улучшению качества цитологического препарата непосредственно в цитокамере (отмывка и осветление клеточных суспензий, лизис эритроцитов, разделительное центрифугирование в градиентном растворе, коррекция концентрации клеток).
- ▶ 4. Дозирование пробы в герметичную систему из цитокамеры и слайда.
- ▶ 5. Горизонтальное центрифугирование с осаждением клеточных элементов на слайд и получением препаратов для фиксации и окраски (возможна фиксация и окраска слайдов непосредственно в цитокамере).
- ▶ 6. Высушивание препарата в специальной подвеске центрифуги за счет эффективной системы вентиляции, возникающей при вращении ротора.
- ▶ 7. Автоматический или ручной анализ.

# Метод фильтрации. CellPrep Plus (Biodyne, Корея)

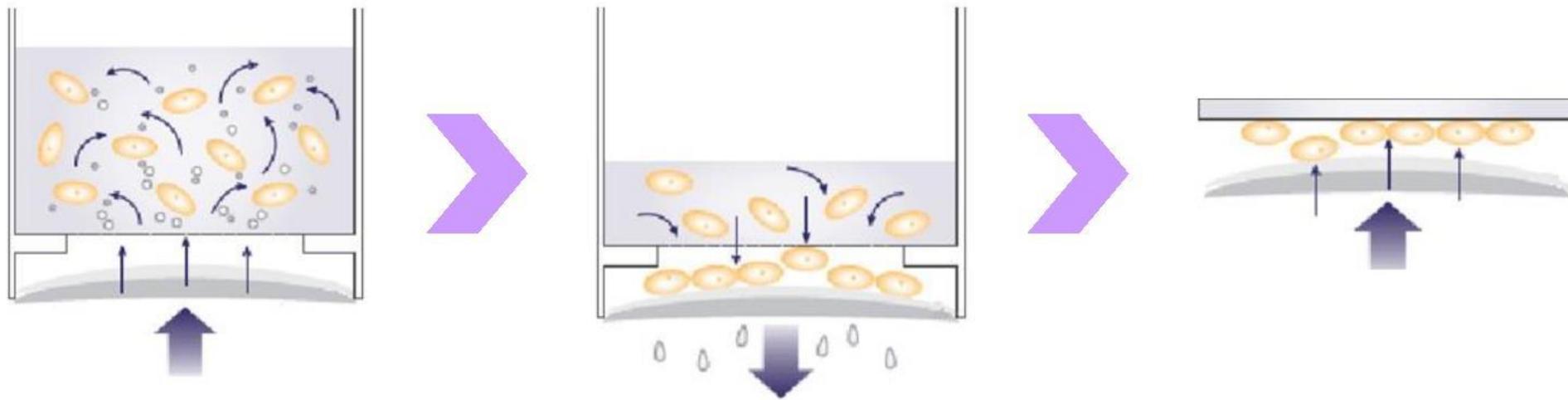


## Особенности прибора CellPrep Plus

- Максимальная производительность прибора - 120 препаратов в час.
- Все операции выполняются в одном модуле, перемещение образцов между отдельными операциями вручную не требуется.
- Подготовка одного стекла с препаратом занимает 26 секунд.
- Протоколы для исследования гинекологического и негинекологического материала (цитологическое исследование мазков шейки матки, мочи, мокроты и др. материала).
- Стандартные протоколы не требуют предварительной подготовки материала (встряхивание на вортексе, центрифугирование и т.д.)
- Возможность неоднократного использования исследуемого материала без повторной пробоподготовки – при исследовании на HPV (вирус папилломы человека), иммуноцитохимическое исследовании и других исследованиях.
- Минимальное количество расходных материалов для работы на приборе.

# Система переноса материала CellPrep Blowing Technology

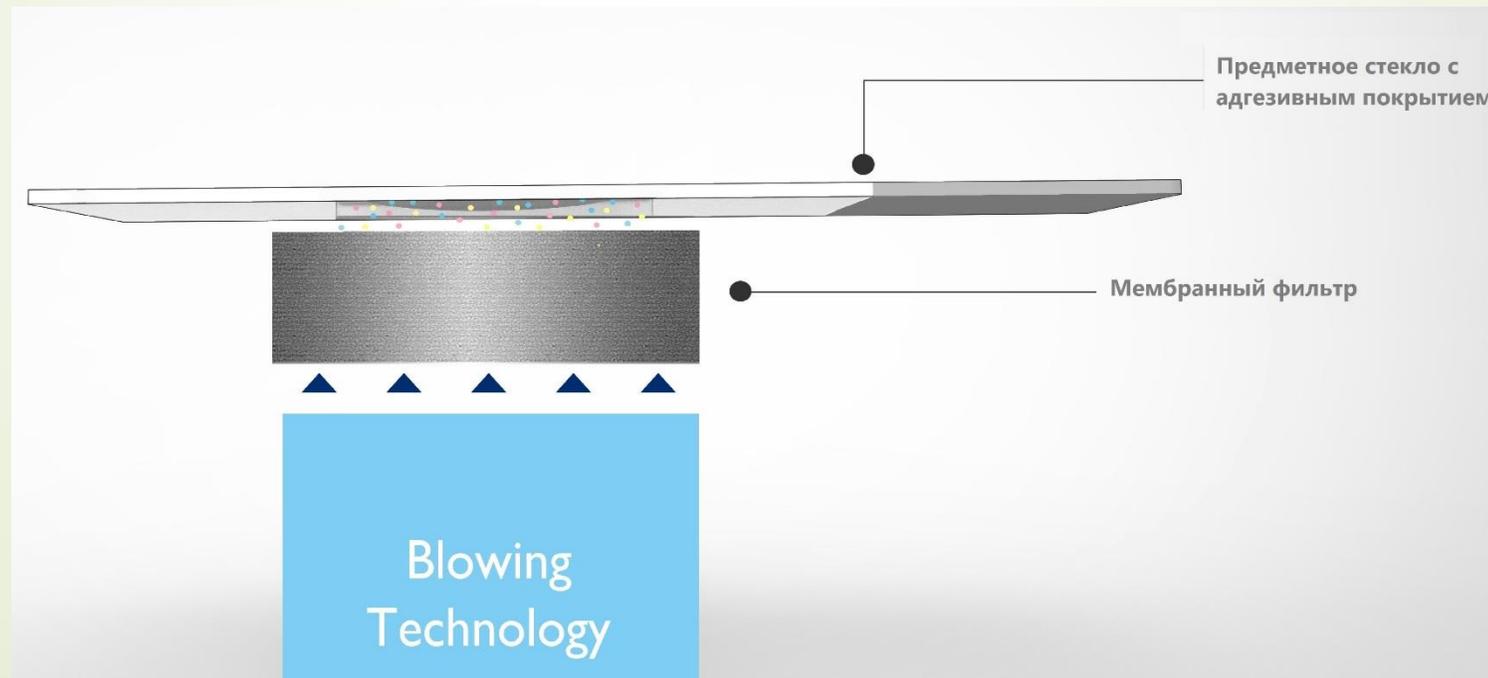
Это первая в мире технология бесконтактного переноса материала на стекло после фильтрации.



**Suction & blowing technology**

# Преимущества CellPrep Blowing Technology

- эффективный деликатный перенос клеток на стекло
- препятствует наложению клеток друг на друга
- предотвращает образование пустых участков на препарате



# Минимальное количество расходных материалов

1. Вials с фиксирующим раствором
2. Сменные мембранные фильтры
3. Предметные стекла с адгезивным покрытием
4. Кисточки для забора гинекологического материала



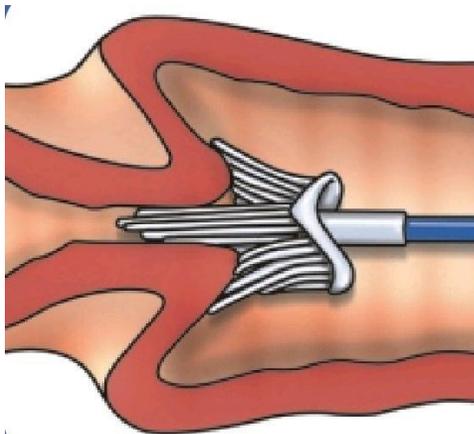
# Диагностическая система BD TriPath – технология Surepath



# Забор и перенос клеточного материала в контейнер BD Surepath™

Перенос клеточного материала для исследования по методу жидкостной цитологии с помощью **цервикальной щетки** типа цервиксбраш к контейнер с консервирующей жидкостью

Использование комбинированной цервикальной щетки увеличивает количество собранных эндоцервикальных клеток в 2-3 раза



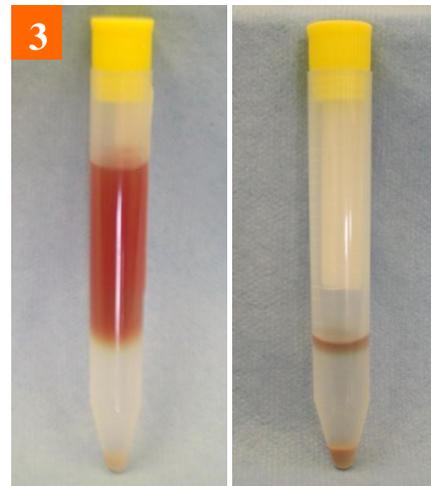
# Приготовление препаратов BD Surepath™



1. Контейнер с образцом



2. Рандомизация клеточного состава и перенос в пробирки



3. Обогащение клеточного состава по градиенту плотности



4. Автоматизированное нанесение монослоя клеток на предметное стекло и окрашивание препарата.

# Приготовление препаратов BD Surepath™



**Рандомизация клеточного состава и перенос в пробирки**

-Головка щетки с клеточным материалом не извлекается из контейнера

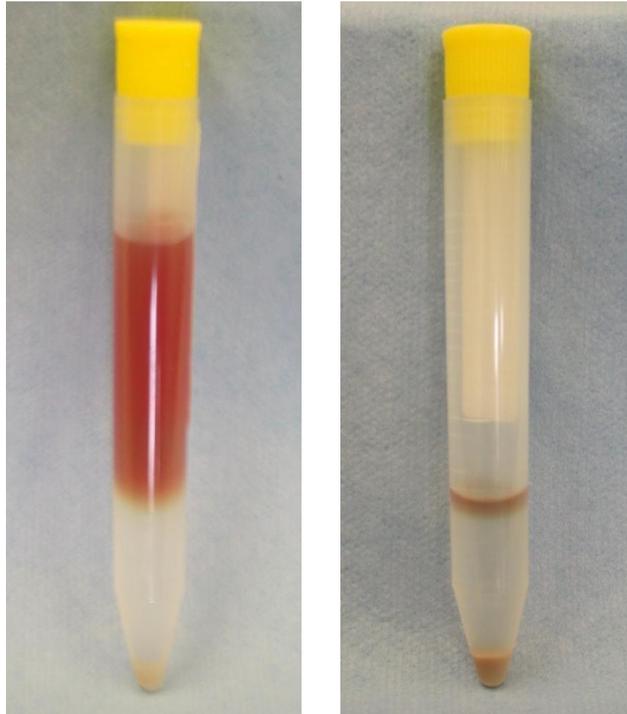
-100% образца рандомизируется с помощью шейкера и многократной аспирации

-рандомизированный образец автоматически переносится в пробирки для дальнейших манипуляций

- 12 препаратов за 3 мин

- 48 препаратов за 12 мин

# Приготовление препаратов BD Surepath™



**Обогащение клеточного состава по градиенту плотности**

## **Запатентованный метод клеточного обогащения:**

-Разделение жидкого материала на слои в соответствии с градиентом плотности

- Удаление артефактов таких как:

-Лейкоциты

-Эритроциты

-Недиагностические некротические массы

-Агрегированные белки

-Разрышенные мембраны клеток

-Микроорганизмы

-Осадок содержит гомогенизированную очищенную клеточную взвесь

# Приготовление и окрашивание препаратов в автомате BD PrepStain™

- Автоматизированное приготовление мазка
- Стандартизованный процесс окрашивания
- Производительность:
  - 48 окрашенных или 96 неокрашенных препаратов за час
  - 300 окрашенных или 600 неокрашенных препаратов за 8-часовой рабочий день (1 оператор)



# Преимущества системы BD SurePath

- Метод одобрен FDA и гарантирует, что 100% собранного образца отправлено в лабораторию для исследования
- Запатентованный метод клеточного обогащения
- Процесс нанесения клеточной взвеси на предметное стекло и окраски всех образцов автоматизирован и стандартизирован
- Возможность проведения дополнительных тестов (ИЦХ, ПЦР до 5) из той же пробы
- Высокое качество препаратов, высокая производительность системы



# Система BD FocalPoint™ GS

- Система BD FocalPoint™ GS Imaging System - это комбинация автоматизированного просмотра и анализа препаратов с помощью аппарата BD FocalPoint™ и локализатора полей зрения с помощью станции просмотра BD FocalPoint™ GS



# Рабочий процесс BD FocalPoint™ GS



1. Предметные  
стекла



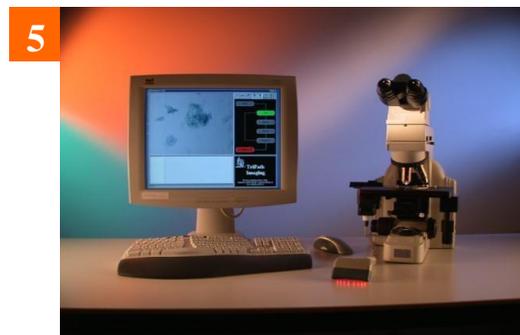
2. Сканирование -  
аппарат



3. Анализ результатов -  
программа

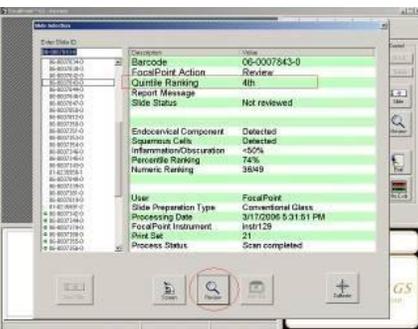


4. Классификация препаратов



5. Направленный пересмотр стекл

# Рабочий процесс BD FocalPoint™ GS



- Предметные стекла помещаются в штативы Штативы загружаются в прибор BD FocalPoint™ (макс. 36 штативов за раз = 288 стекол)

- 3 камеры регистрируют данные препаратов, получая 25 изображений высокого качества в секунду

- Автоматическое сканирование цитологического препарата: всего препарата при увеличении 4 × и 1000 полей зрения при увеличении 20 ×

- Анализ клеток в каждом поле зрения, классификация клеток на «нормальные» и «атипичные»

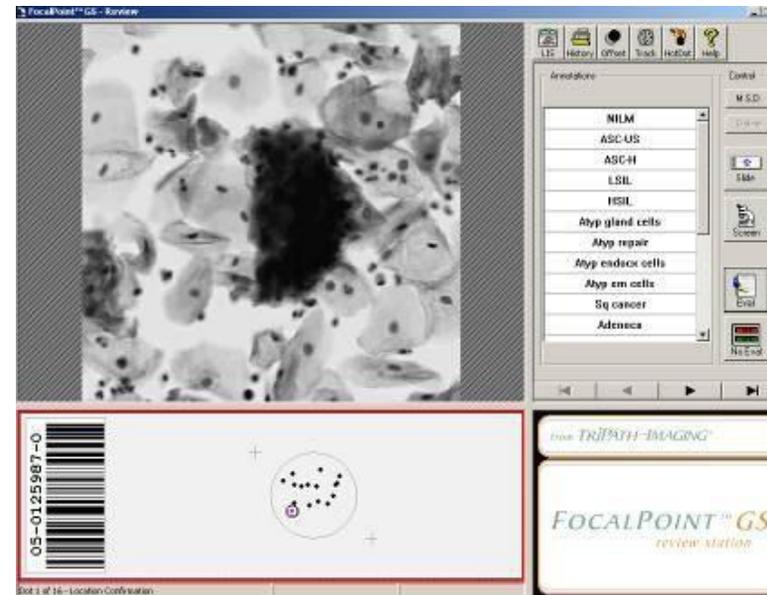
- Обработка и ранжирование препаратов для дальнейшего целенаправленного пересмотра предметных стекол цитологом

# GS станция пересмотра

Считывание штрих-кода  
препарата

Получение итогового отчета по  
препарату

Навигационная система  
цитолога по предметному  
стеклу





## **Цитоскрин – комплекс оборудования для цитоцентрифугирования (Hospitex Diagnostics)**

- ▶ Система подготовки тонкослойных цитологических микропрепаратов**  
Цитоскрин является первой зарегистрированной отечественной разработкой в области жидкостной цитологии и включает в себя набор растворов для транспортировки, хранения и приготовления цитологических микропрепаратов Цитоскрин.  
Производительность – 72 препарата в час.

# Состав системы

- консервант (вials для жидкостной цитологии),
- фильтр (фильтрующий раствор – аналог Density Gradient)
- фиксатор (раствор для фиксации клеток на стекле, предохраняющий клетки от дегидратации, содержащий в своём составе Carbowax – водорастворимый крахмал, или жидкий воск)
- цитоцентрифуга модели 6/4000, позволяющая откручивать 6 образцов по 9 мл на 4000 оборотах в минуту (2170xg)
- встряхиватель Цитомиксер
- аппарат для окрашивания мазков по Папаниколау и другим популярным протоколам окраски (Лейшман, Гимза, Романовский и т.д.) модели АФОМК-13 или АФОМК-16
- микроскоп с камерой или планшетом для микрофотографирования и сохранения в цифровом формате снимков микропрепаратов Микроскрин,

**1 этап – взятие материала в консервирующую среду Цитоскрин**



## 2 этап – встряхивание в шейкере Скринмикс



### **3 этап – фильтрация клеток от слизи и крови**



**4 этап – нанесение клеток на предметные стекла центрифугированием**



**5 этап – окраска микропрепаратов на автомате АФОМК-13**



**6 этап – просмотр и сохранение окрашенных микропрепаратов при помощи микроскопа Микроскрин**



# Плюсы и минусы метода цитоцентрифугирования

- **преимущества**
- простота в освоении и внедрении, возможность изготовления нескольких стекол из одного образца, удобное обслуживание и малозатратность при небольшом потоке исследований.
- **недостатки**
- требуются наработки и навыки от лабораторного сотрудника в приготовлении мазка в зависимости от вида клеточного материала.
- Это полностью ручной способ с низкой производительностью.
- В большинстве случаев необходимо разведение образца при высокой клеточности материала (центрифугирование в обычной центрифуге, разведение осадка в 1000 мкл фиксатора)
- отсутствуют стадии очищения образца,
- центрифугирование может приводить к разрушению клеточных комплексов, мультинаслаиванию.

# Фильтрация (ThinPrep). Плюсы и минусы метода

- **Преимущества:**
- Автоматическое перемешивание, фильтрация вакуумом и перенос клеток методом отпечатков с соблюдением стандартов и контроля качества;
- Высокая степень автоматизации (до 70%);
- Имеется система автоматизированного предпросмотра. Минимальное количество расходных материалов;
- Простая система расчета стоимости исследования.
  
- **Недостатки:**
- Большой риск повреждения клеток, особенно разрушения комплексов

# Клеточное обогащение на градиенте плотности (SurePath). Плюсы и минусы.

- **Преимущества:**
- «золотой стандарт» качества
- Все стадии процесса можно наблюдать и прервать/вмешаться в любой момент
- **Недостатки:**
- Несколько этапов центрифугирования может приводить к разрушению клеточных комплексов, деформации клеточных структур.
- Низкая степень автоматизации, соответственно, большой объем ручного труда – до 50% времени.
- Существенный объем специальных расходных материалов (большое количество скрытых трат)

# На какой технологии остановить выбор?

- ▶ Для целей первичного внедрения в условиях крайне ограниченных ресурсов более всего подходит метод цитоцентрифугирования.
- ▶ Для целей рутинной скрининговой и клинической, а также научной практики более всего подходит технология ThinPred.
- ▶ Для целей научного поиска в цитологической практике служит система клеточного обогащения (SurePath), зарекомендовавшая себя как золотой стандарт качества (при условии наличия персонала для обеспечения функционирования).

**Благодарю за внимание!**

