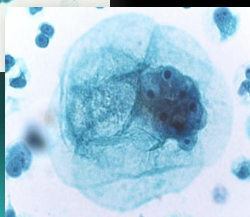
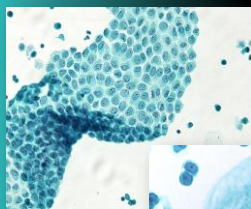




Научный взгляд на жидкостную технологию BD SurePath™ в цитоморфологической диагностике выпотов и смывов

М.В. Савостикова
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, г. Москва



III Ежегодный Конгресс Российского общества онкопатологов - 2018

BD Prep Stain™ Slide Processor



BD SurePath™

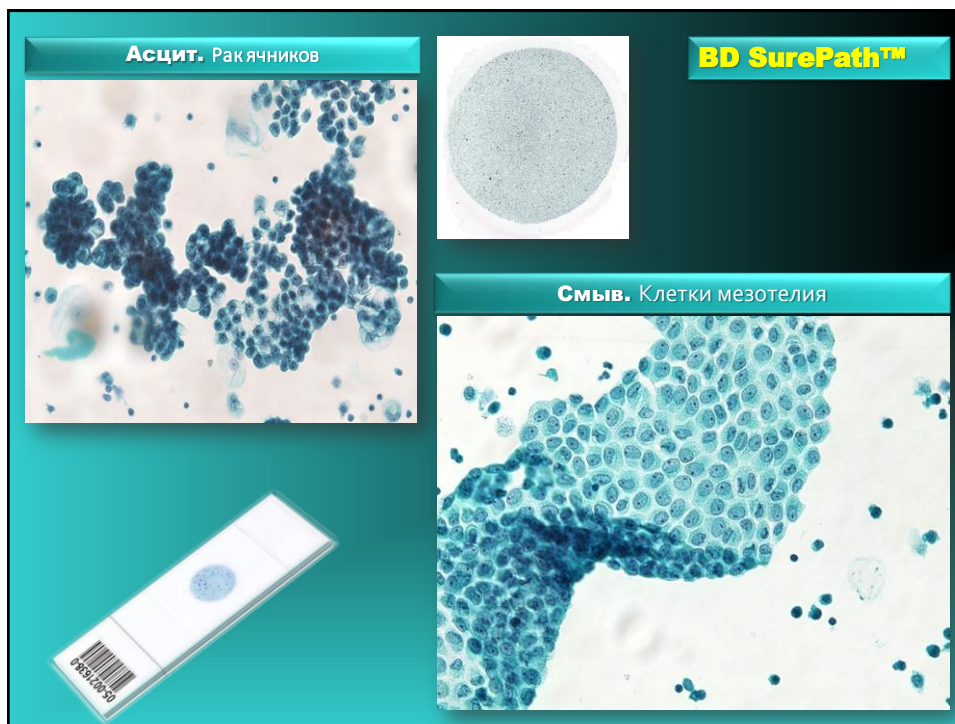


- Huang TW, Lin TS, Lee JS. Sensitivity studies of the AutoPap System Location Guided Screening of Cervical-vaginal cytologic smears (*Acta Cytologica*. 43,363-368, 1999);
- Lee JS, Kuan, Wilbur DC. A feasibility study of the AutoPap System Location Guided Screening (*Acta Cytologica*. 42 (1), 226-6, 1998).

Оборудование TriPath широко представлено во всем мире.

- Технология **BD SurePath™** на основе жидкостного цитологического метода была официально одобрена FDA в США в 1999 году, в 2004 году – NICE (National Institute for Health and Care Excellence, Национальным институтом здоровья и качества медицинской помощи) в Англии и Уэльсе.
- Технология апробирована более чем в 120 научных и клинических исследованиях.
- Составляющие данной технологии защищены более чем 100 патентами.





**Исследование
окрашенных препаратов**

- Точность идентификации клеток цитологом в выпотах составляет в среднем **58%** и зависит от типа опухоли.
- Диагностическая чувствительность выявления опухолевых клеток в окрашенных препаратах при исследовании 200 мл жидкости составляет **70-90%**.
- В патологических условиях при нарастании экссудации число смываемых мезотелиальных клеток увеличивается, а соотношение их с другими видами клеточных элементов зависит от характера патологического процесса, стадии его развития и реактивности организма.

[Ben Davidson. Serous Effusions 2012].



Трудности цитологической интерпретации цитопрепаратов выпотов

- ✓ присутствие в них разнообразных клеточных элементов: мезотелия, макрофагально-гистиоцитарных элементов, лимфоцитов, лейкоцитов и опухолевых клеток;
- ✓ изменениями морфологии клеток, связанными с нахождением в жидкой среде, состояниями пролиферации, репаративными и дистрофическими процессами, образованием пластов, симпластов, железисто- и сосочкоподобных структур, весьма сходных со структурами, образующимися при раке;
- ✓ наличие единичных, немногочисленных клеток опухоли в серозной жидкости;
- ✓ дегенеративные изменения клеток опухоли во время или после проведенного ХТ и лучевого лечения;
- ✓ **качества цитологических препаратов.**



Цель исследования

– определить преимущества и недостатки использования жидкостной технологии **BD SurePath™** в цитологической диагностике биологических жидкостей, оценить морфологические особенности в сравнении с традиционным методом.







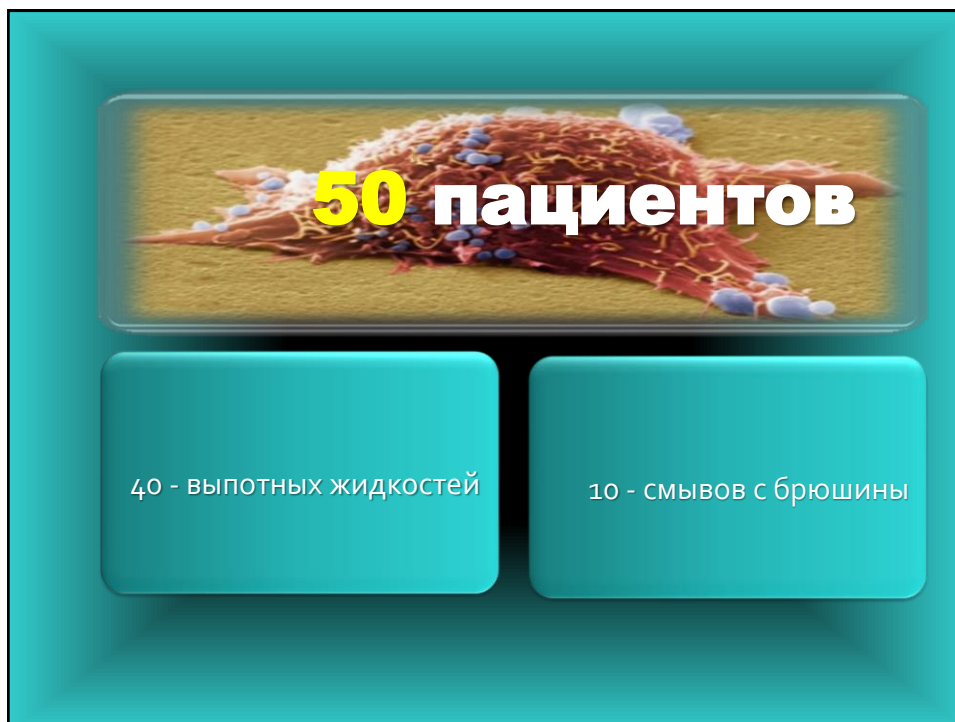

Традиционная цитология:

готовится 7-10 препаратов, материал относительно равномерно распределяется по всему периметру стекла, больше концентрируясь в «щеточке» мазка. Наличие в мазке элементов крови, воспаления, некроза может затруднять цитологическую диагностику, особенно при выявление единичных опухолевых клеток. При этом увеличивается и время просмотра препаратов.



BD SurePath™:

- метод приготовления цитологических монослойных препаратов на предметных стеклах BD
- с использованием аппарата BD PrepStain™ и фиксирующего раствора BD **CytoRich Red**, позволяющего не только фиксировать клеточный материал, но и лизировать эритроциты.
- За 45 минут готовится 48 монослойных препаратов высокого качества,
- За 8-ми часовой рабочий день-288. d мазка=13мм,
- окраска только по Папаниколау, производится автоматически.
- Можно программировать количество окрашенных и не окрашенных мазков.
- Препараты очищены от слизи и крови.



Характеристика материала

Объект исследования	Количество наблюдений (n=50)	Локализация патологии	Количество исследований (n=50)
Плевральный выпот	19	Опухоли яичников	2
		РМЖ	6
		лимфома	4
		БПО	1
		Рак шейки матки	1
		Рак легкого	4
		Мезотелиома	1
Перитонеальный выпот	20	Рак яичников	10
		РМЖ	4
		Рак маточной трубы	1
		Рак и ГИСТ кишки	2
		Рак желудка	2
		Меланома кожи	1
Смыв с брюшины	10	Опухоли яичников	4
		РМЖ	1
		Опухоли тела матки	4
		Рак шейки матки	1
Перикард	1	Перикардит	1

Сравнительная характеристика качества цитологических препаратов смывов с брюшной полости при традиционном и жидкостном методе BD SurePath™ приготовления цитопрепаратов (V = 5 - 15 мл)

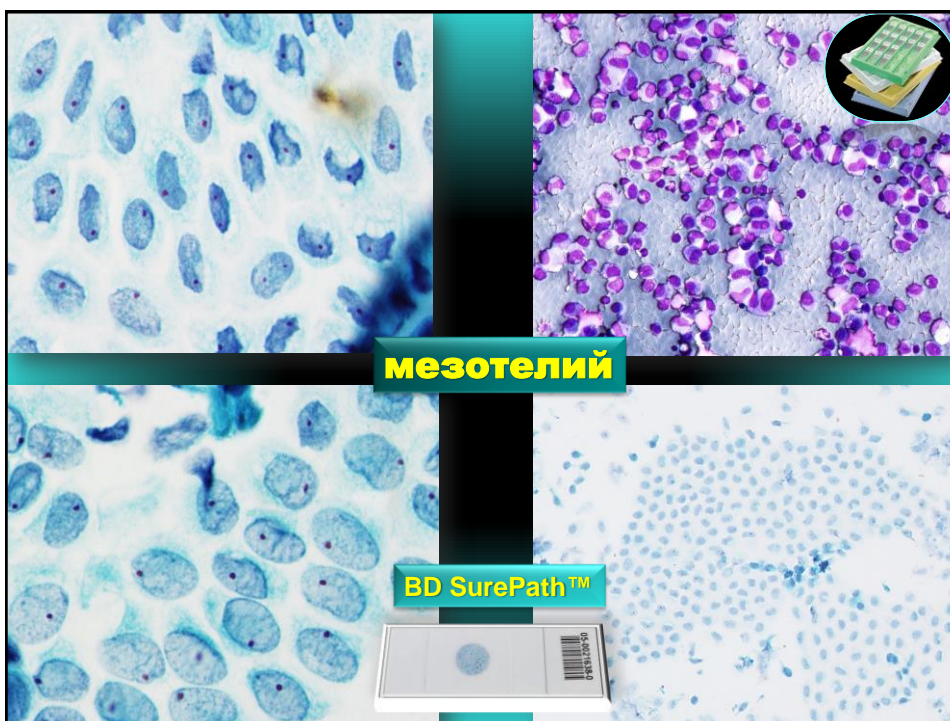
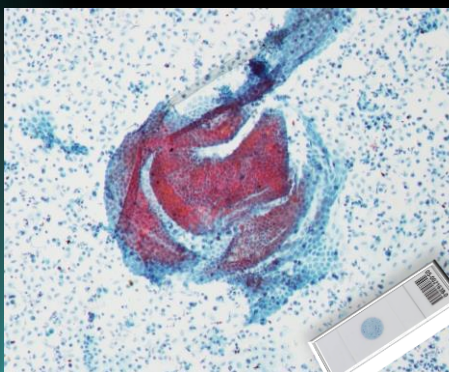
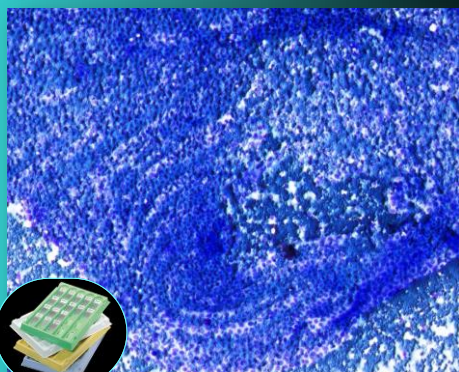
Показатели	Традиционный метод (n=10)	BD SurePath™ (n=10)
Материал скудный	5/10	5/10
Материал густой	2/10	-
Значительная примесь крови	7/10	-
Лизис части клеток мезотелия	8/10	6/10
Неравномерное распределение клеток на стекле, скудность	5/10	-

При цитологическом анализе классических и жидкостных цитопрепаратов BD SurePath™ смывов с брюшины получены следующие результаты:

- 70% традиционных препаратов отмечалась значительная примесь крови и полностью отсутствовала в BD-мазках;

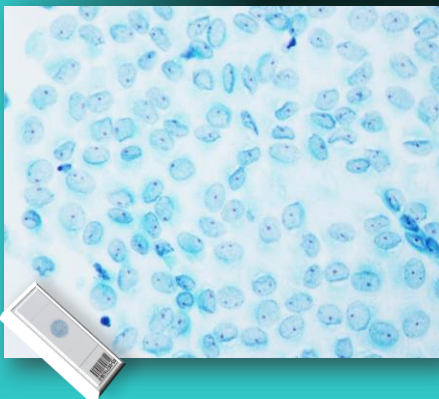
традиционный препарат

BD SurePath™

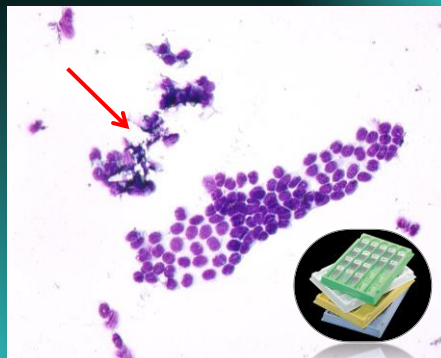


- поскольку для смыва используют физиологический раствор, большая часть клеток лизируется, этот недостаток наблюдался практически во всех типах мазков (в 60-80%);

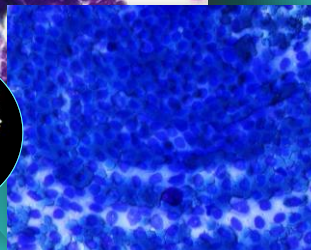
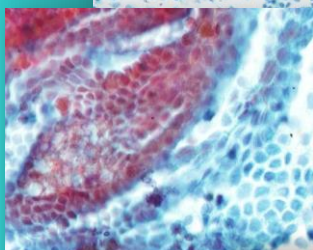
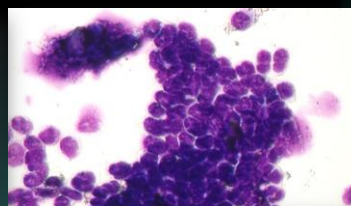
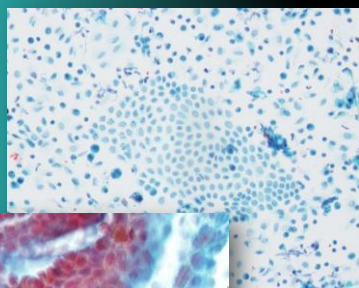
BD SurePath™



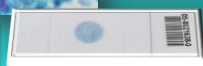
традиционный препарат



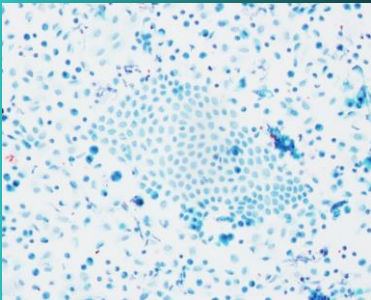
- независимо от способа приготовления препаратов, скудность клеточного материала отмечена в половине исследований, тогда как густые мазки наблюдались в 20% традиционных;



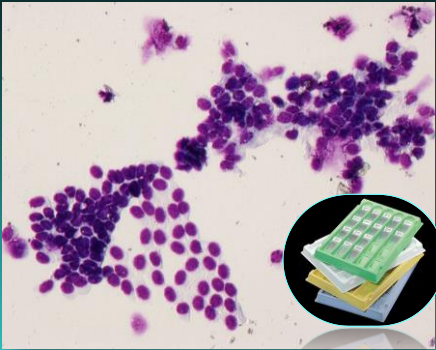
BD SurePath™




традиционный препарат



- **монослой, равномерное распределение клеток в мазке отмечены во всех BD препаратах и в половине традиционных мазков.**



традиционный препарат

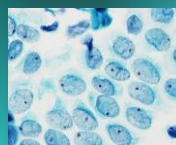
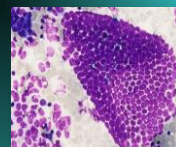


Цитологические заключения при анализе цитопрепаратов смывов с брюшной полости (n=10)

Варианты цитологических заключения	Традиционный метод, (n=10)	BD SurePath™, (n=10)	Гистологическое заключение, (n=10)
Реактивные изменения мезотелия	9	8	9
Специфический характер процесса – наличие клеток рака	1	1	1
Подозрение на наличие клеток рака	-	1	-

Интраоперационный смыв с брюшины производят при отсутствии патологической жидкости в брюшной полости, что чаще всего наблюдают при доброкачественных процессах или когда пациентке уже провели соответствующее лечение, либо когда стадия злокачественного новообразования еще низкая (I-II), что подтверждается и в наших цитологических и ИЦХ исследованиях (V = 5 - 15 мл):

- в 90% классических препаратах, в 80% мазков BD отмечались отдельные или в скоплениях, либо пластах клетки мезотелия, в других наблюдениях материал был представлен единичными, либо немногочисленными клетками мезотелия;
- в одном случае в препаратах BD было выявлено и заподозрено в принадлежности к опухолевым клеткам единичное небольшое скопление, однако при ИЦХ исследовании с антителами к BerEr4, реакция была отрицательной;
- в 1 наблюдении во всех типах мазков выявлены комплексы клеток серозной папиллярной аденокарциномы яичника.

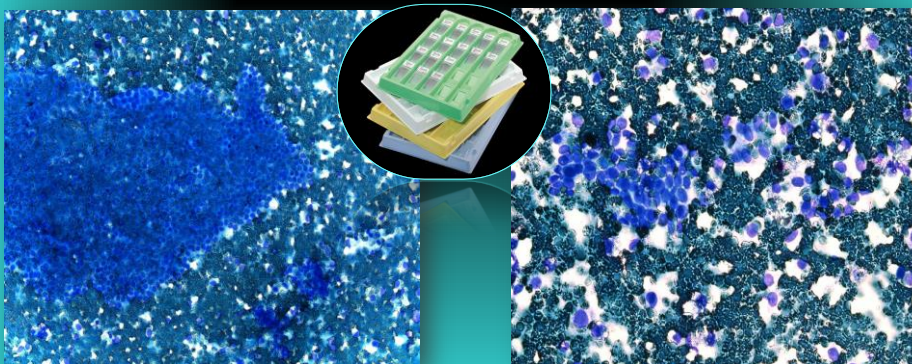


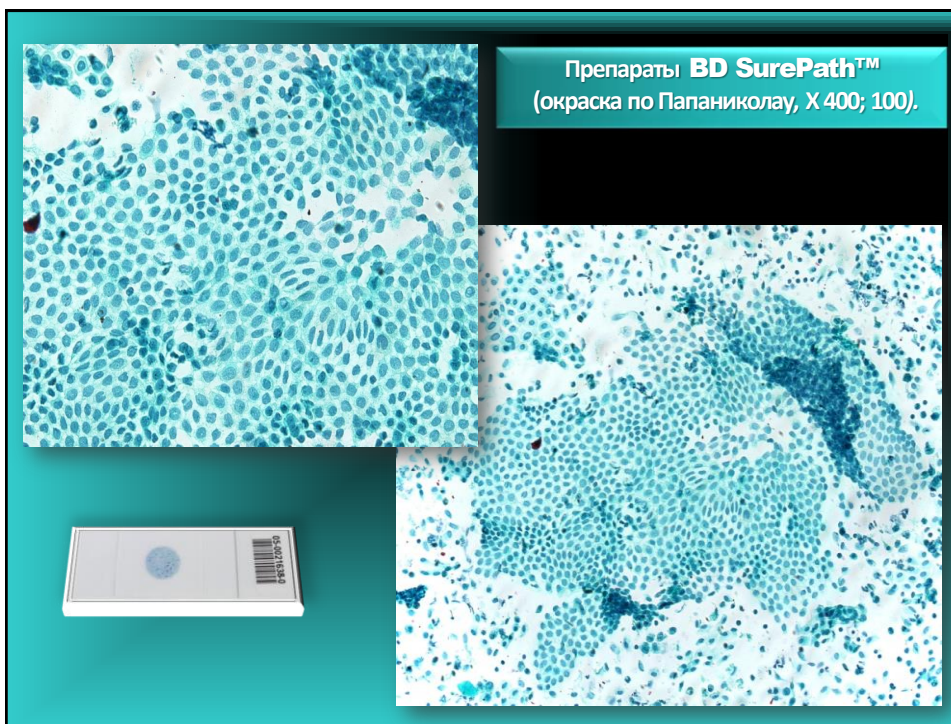
Клиническое наблюдение: пациентка Ц., 34 года.

Клинический диагноз: рак шейки матки. Дермоидная киста правого яичника (гистологически зрелая тератома). Смыв из брюшной полости в V=14мл, жидкость мутная, с примесью крови.

Цитологическое заключение: клеточный состав представлен множеством отдельных клеток и пластов мезотелия.

Традиционные мазки (окраска по Лейшману, X100; 200).





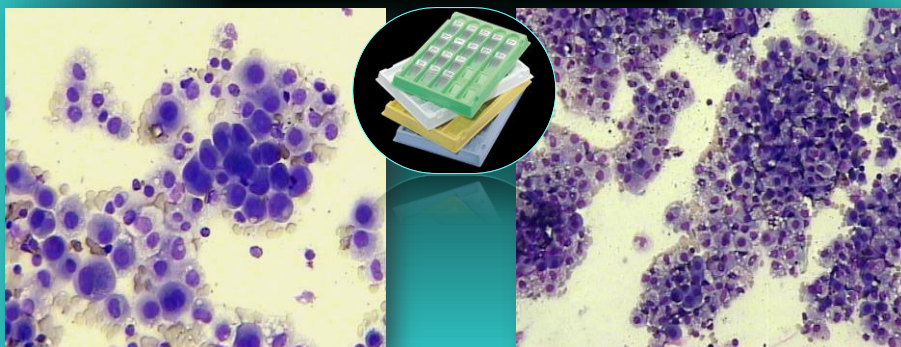
Клиническое наблюдение: пациентка Ф., 61 год.

Клинический диагноз: рак тела матки IIIA ст. Смыв из брюшной полости в V=10мл, жидкость мутная, бесцветная.

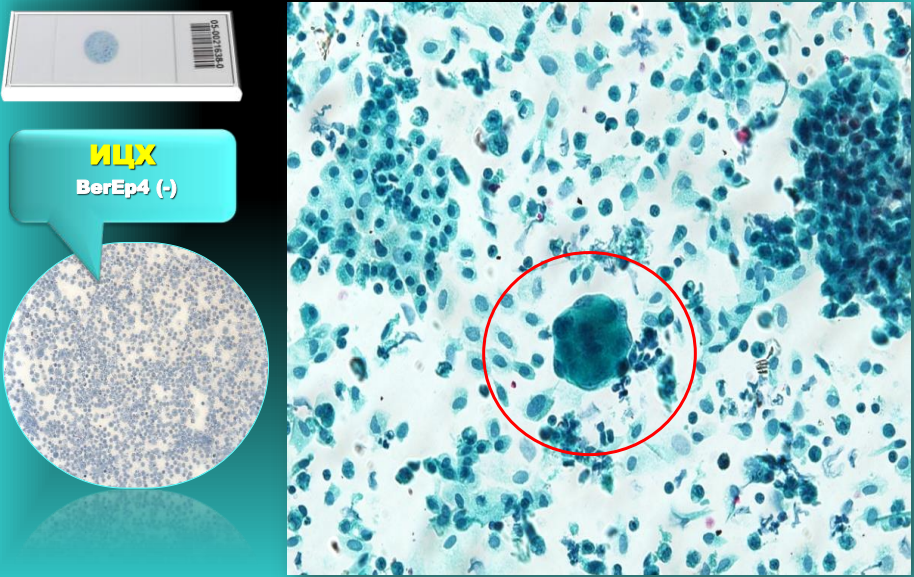
Гистологическое заключение: умеренно дифференцированная эндометриоидная аденокарцинома

Цитологическое заключение: клеточный состав представлен множеством скоплений клеток мезотелия.


Традиционные мазки (окраска по Лейшману, X 400; 100).



Препараты BD SurePath™
(окраска по Папаниколу, X 400).



ИЦХ
VerEp4 (-)



BD SurePath™, окраска по Папаниколу

Железистоподобные структуры

Cytospin препарат, окраска по Лейшману

В просвете железистоподобных структур мезотелия может присутствовать розоватое гомогенное вещество, что увеличивает сходство этих клеток с секретирующими эпителиальными элементами.

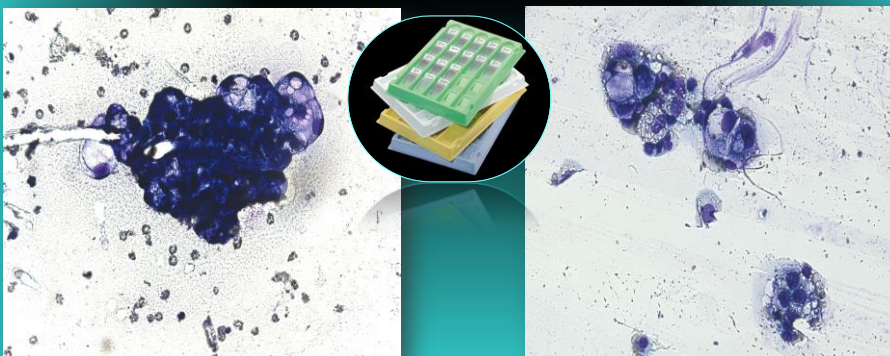
Клиническое наблюдение: пациентка С., 72 года.

Клинический диагноз: рак яичников III ст. Состояние после комбинированного лечения (операция + 7 курсов ПХТ). Рецидив? Смыв с брюшной полости V=15 мл.

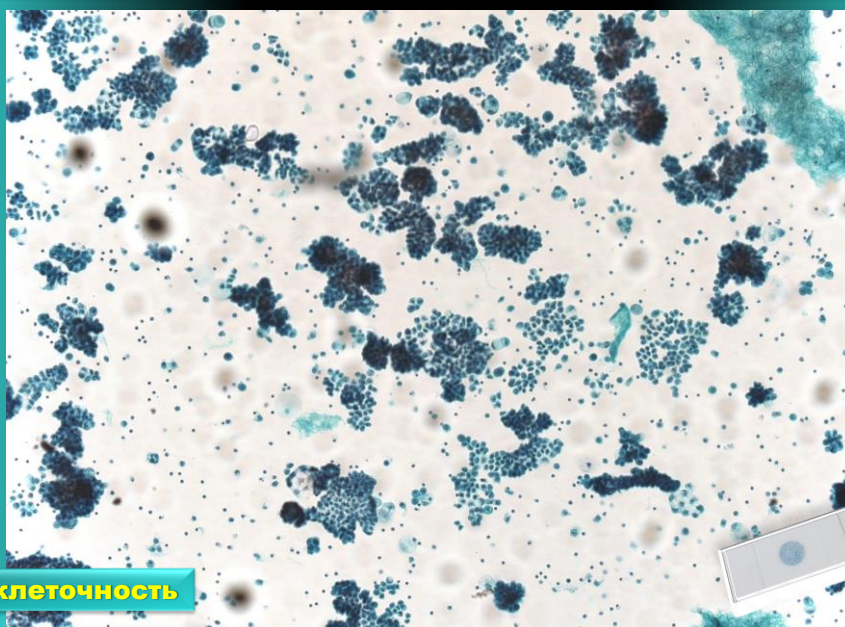
Гистологическое заключение: серозная папиллярная цистаденокарцинома.

Цитологическое заключение: в цитограмме определяются комплексы клеток аденокарциномы папиллярного строения.

Традиционные мазки (окраска по Лейшману, X 400).



Препараты **BD SurePath™** (окраска по Папаниколу, X100).



клеточность

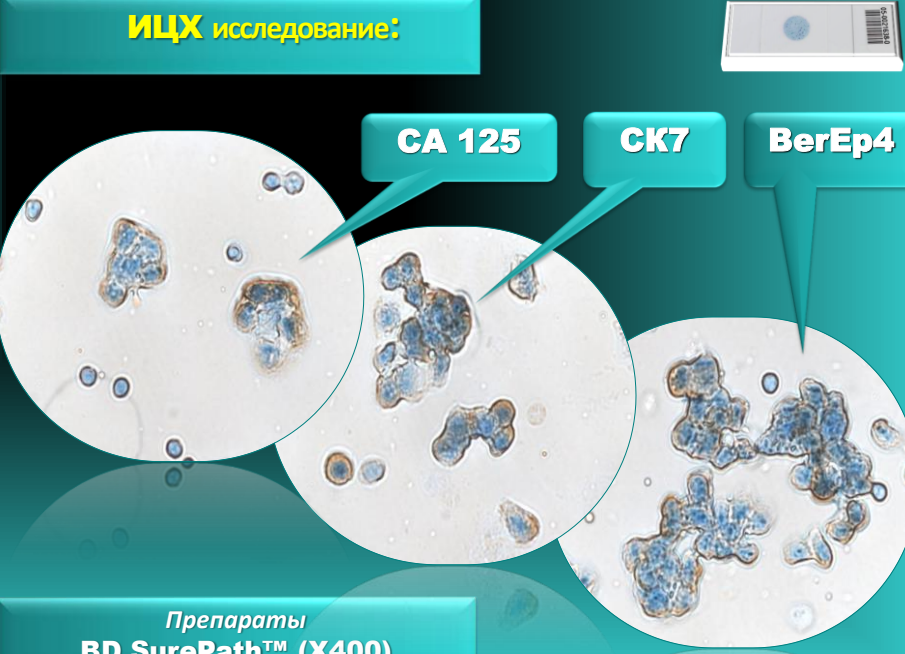
Препараты **BD SurePath™** (окраска по Папаниколау, X200)



Микропапиллярные структуры

This slide displays the BD SurePath™ product and microscopic images of micro-papillary structures. The top left shows the product packaging. The main area contains two panels of microscopic images showing clusters of cells with a characteristic papillary arrangement, stained with Papanicolaou stain. The caption below the images reads "Микропапиллярные структуры".

ИЦХ исследование:



CA 125 **CK7** **BerEp4**

Препараты **BD SurePath™** (X400)

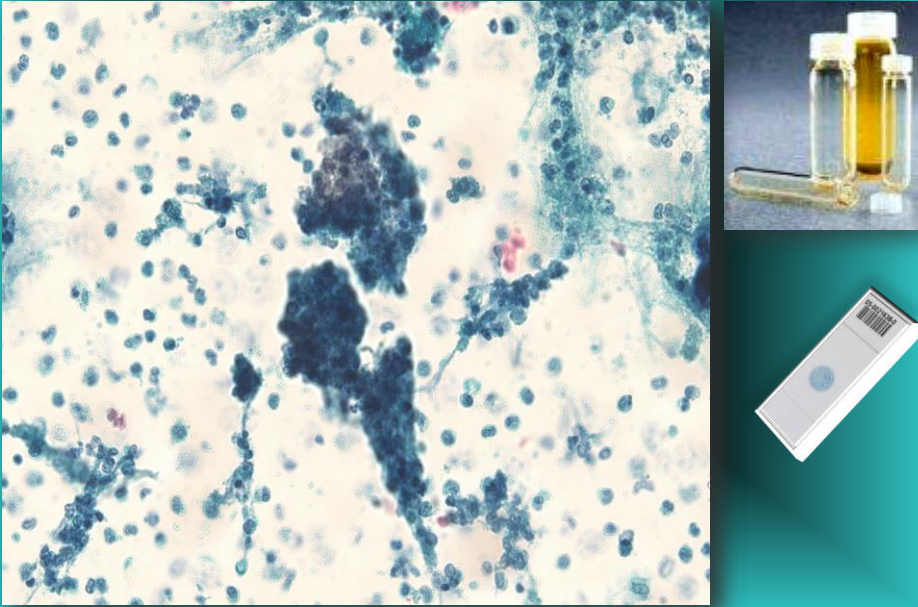
This slide illustrates immunocytochemical (IHC) testing on BD SurePath™ slides. It features a product image in the top right and three circular microscopic views of cells stained for different markers. Callout boxes identify the markers: CA 125, CK7, and BerEp4. The caption at the bottom identifies the product as "Препараты BD SurePath™ (X400)".

**Жидкость из перикарда-
1 исследование**



Традиционные мазки (окраска по Лейшману, X 100).

Препараты BD SurePath™ (окраска по Папаниколау, X100; X400).



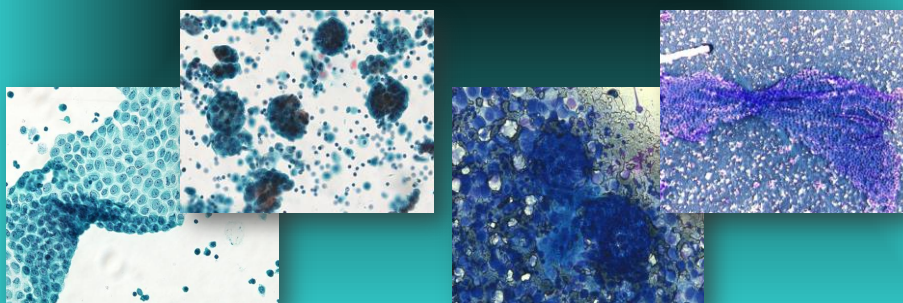
16

**Сравнительная характеристика качества цитологических препаратов
выпотных жидкостей (n=40)
при традиционном и жидкостном методе BD SurePath™ приготовления
мазков (V = 20 - 1300 мл)**

Показатели	Традиционный метод, (n=40)	BD SurePath™, (n=40)
Материал скудный	7/40	3/40
Материал густой	6/40	3/40
Значительная примесь крови	7/40	-
Лизис части клеток, признаки дистрофии и репарации	4/40	4/40
Неравномерное распределение клеток на стекле, скученность элементов	8/40	1/40

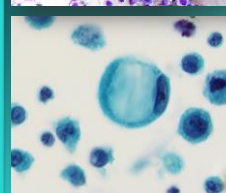
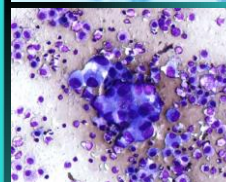
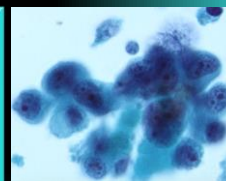
При оценке качества и адекватности цитологического материала в традиционных и жидкостных BD SurePath™ цитопрепаратах выпотных жидкостей получены следующие

- **17,5%** традиционных препаратов отмечалась значительная примесь крови и не наблюдалась в BD-препаратах;
- лизис части клеток, признаки дистрофии и репарации отмечались в **10%** всех типов мазков - и классических и жидкостных, что характерно для реактивно-воспалительных и специфических экссудатов и не зависят от способа приготовления препаратов;

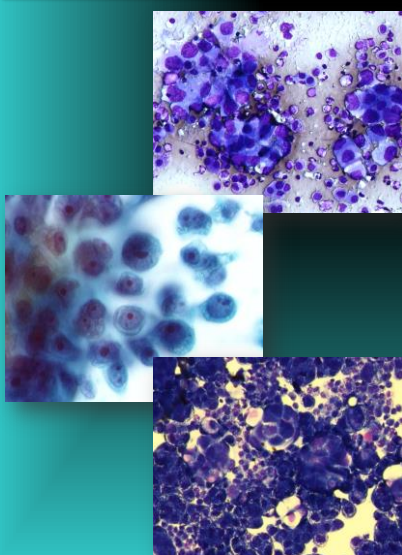


При оценке качества и адекватности цитологического материала в традиционных и жидкостных BD SurePath™ цитопрепаратах выпотных жидкостей получены следующие

накопление жидкости в полости, как правило, сочетается с высокой клеточностью – это элементы воспаления, макрофагально-гистиоцитарные элементы, клетки опухоли и т.д., в связи с чем, скудность клеточного материала если и бывает, то связана либо с неправильным забором материала, либо неправильным его приготовлением. При цитологическом анализе материала наблюдалось следующее: в трех наблюдениях было доставлено немного жидкости ($V=7; 9; 15\text{мл}$) и во всех типах мазков отмечалось скудное количество клеток, а вот в 3 других вариантах – при адекватности жидкостных препаратов, в традиционном - клетки были единичными. Возможно, это связано с концентрацией клеток на стекле в одном «окошке», тогда как в классических мазках материал «размазывают» на 7-10 стеклах;



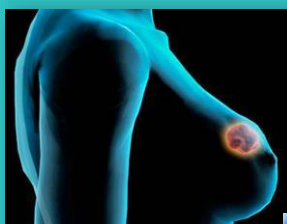
При оценке качества и адекватности цитологического материала в традиционных и жидкостных BD SurePath™ цитопрепаратах выпотных жидкостей получены следующие



- говоря о густоте мазков, необходимо отметить, тот факт, что при приготовлении BD препаратов на последней стадии происходит смыв спиртовым раствором с мазка излишков материала, в результате чего если материал и густой (**7,5%**), излишки - удаляются, что не происходит в классической (**15%**) технологии;
- монослой, равномерное распределение клеток в мазке выявлены в **97,5%** BD – препаратов и в **80%** в традиционных мазках.

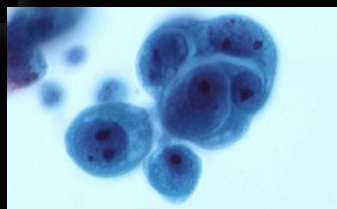
**Цитологические заключения при анализе цитопрепаратов
выпотных жидкостей (n=40)
при традиционном и жидкостном BD SurePath™ методах**

Варианты цитологического заключения	Традиционный метод, (n=40)	BD SurePath™, (n=40)	Подтверждено ИЦХ/гистологически, (n=40)
Реактивные изменения мезотелия	3	5	6
Реактивно-воспалительный экссудат	7	6	8
Подозрение на наличие клеток рака	5	3	-
Специфический выпот – наличие клеток рака	25	26	26



Рак молочной железы (РМЖ) – самая распространенная злокачественная опухоль у женщин (**23% от всех ЗНО**).

[Pokieser W. Breast Cancer Res Treat 2004;83:139-412].



Метастатический РМЖ является самым частым (**37,4%**) вариантом заключения в исследовании 584 образцов плевральных выпотов [Johnston WW. Cancer. 1985;56:905-909].



Структурные признаки метастатического РМЖ в выпотных жидкостях:

BD SurePath™

- Трехмерные округлые/сферические скопления с четкими контурами
- Ацинарные/железистые структуры
- Клетки опухоли в рядах и цепочках



Клеточные признаки:

Мишеневидное включение/
интрацитоплазматическая вакуоль

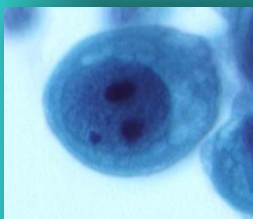
Перстневидные клетки

BD SurePath™

Мелкие одиночные клетки
(дольковый РМЖ)

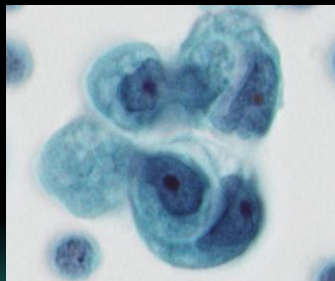
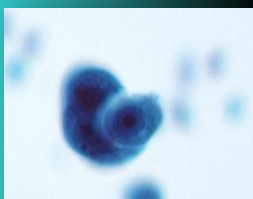


Другие важные цитологические признаки РМЖ:



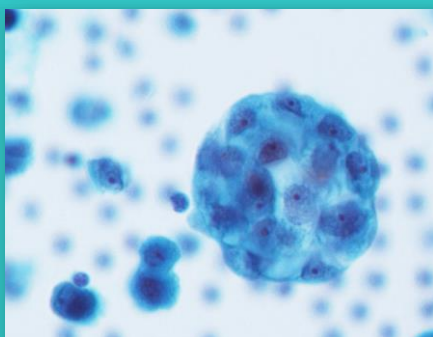
- увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения;

BD SurePath™



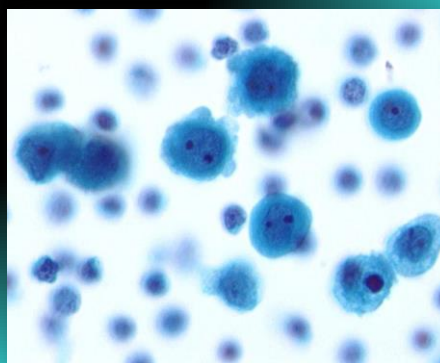
- ядра клеток в структурах перекрываются, наслаиваются друг на друга;

- клеточный каннибализм



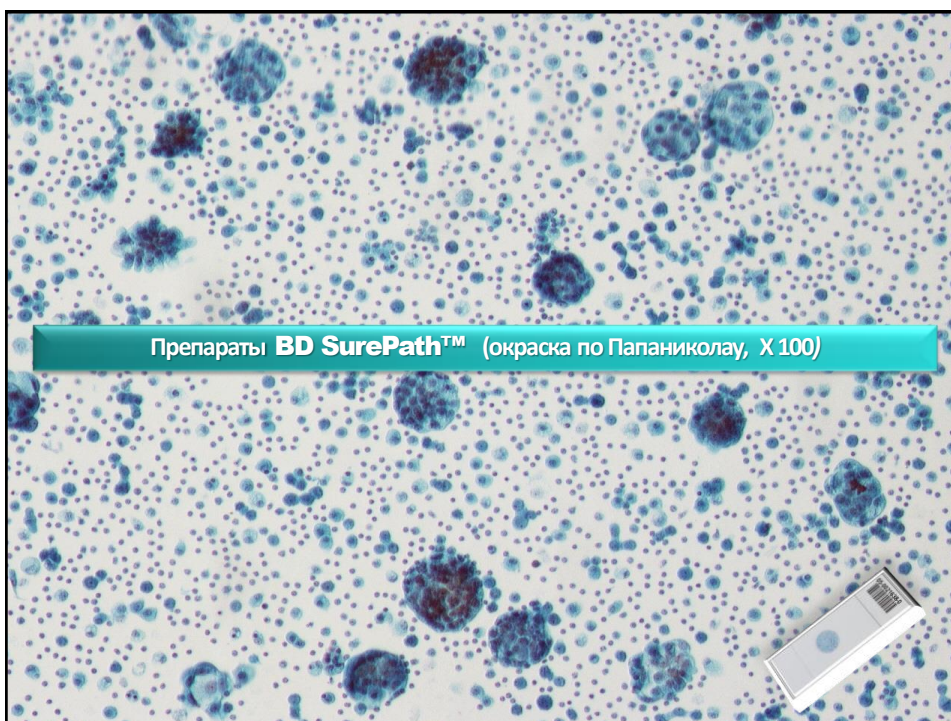
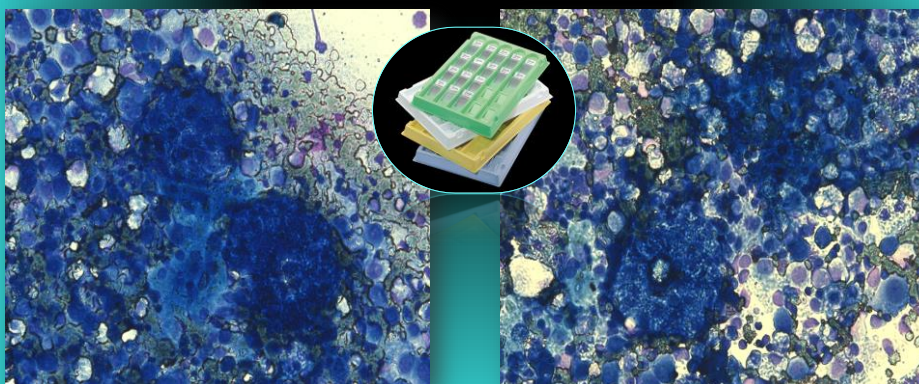
Шаровидные скопления с ровными контурами, эксцентрично расположенными ядрами, высоким ЯЦО и неровным контуром ядерной мембраны более характерны для протокового РМЖ.

Цепочки из опухолевых клеток, одиночные клетки рака, интрацитоплазматические включения позволяют заподозрить дольковый рак. Также для дРМЖ характерна мономорфность опухолевых клеток и ядер.

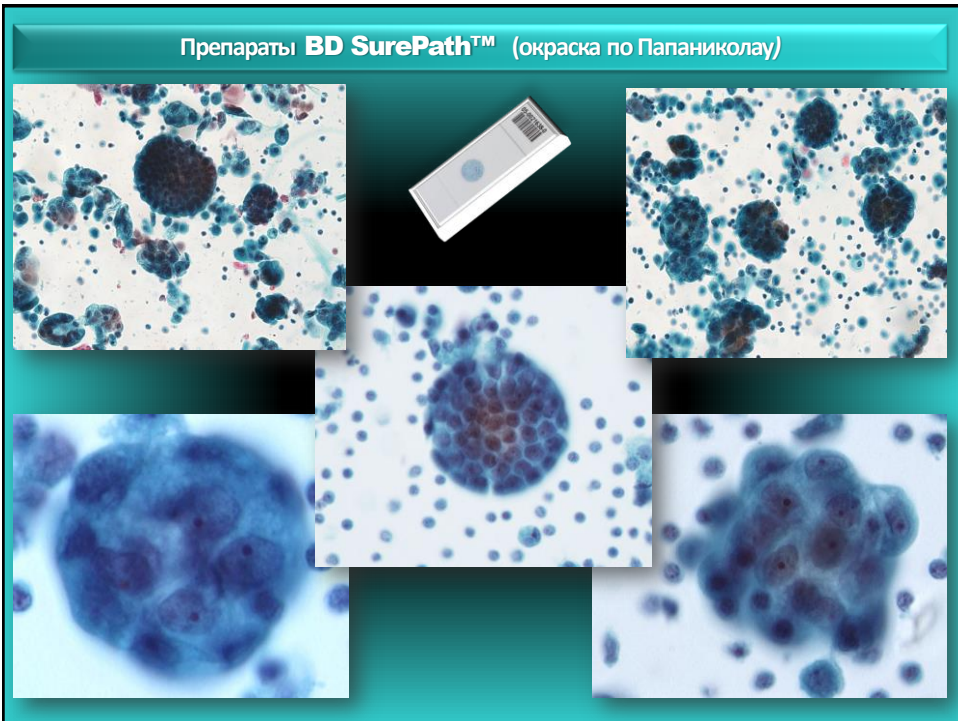
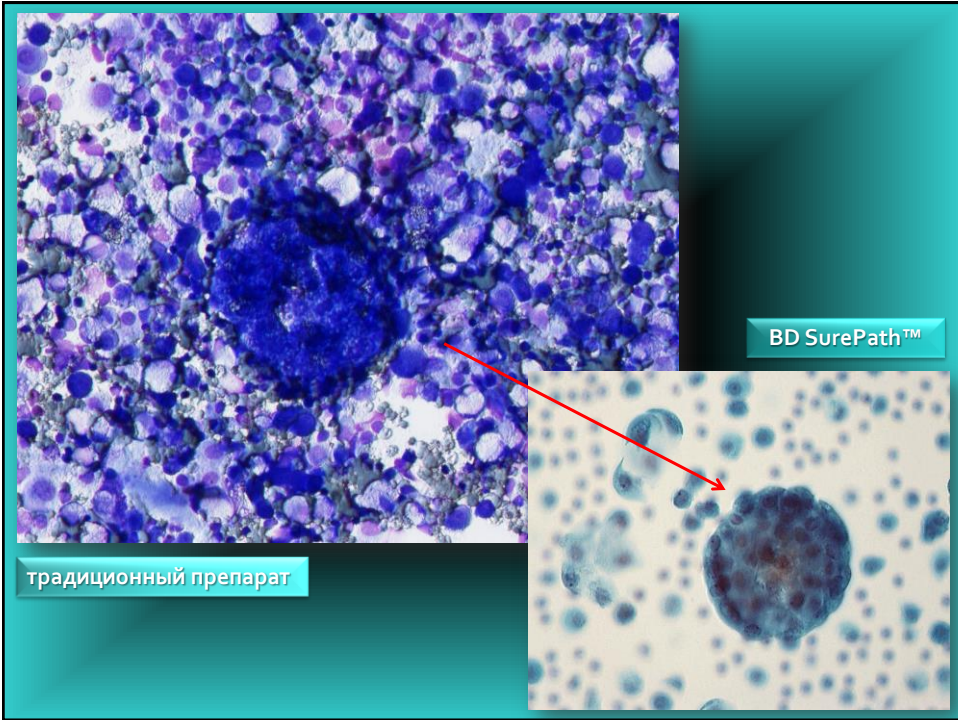


Клиническое наблюдение: пациентка К., 61 год.
Клинический диагноз: РМЖ IV ст, метастаз в плевру. Жидкость из плевральной полости в V=300мл.
Цитологическое заключение: специфический экссудат с наличием комплексов клеток карциномы МЖ.

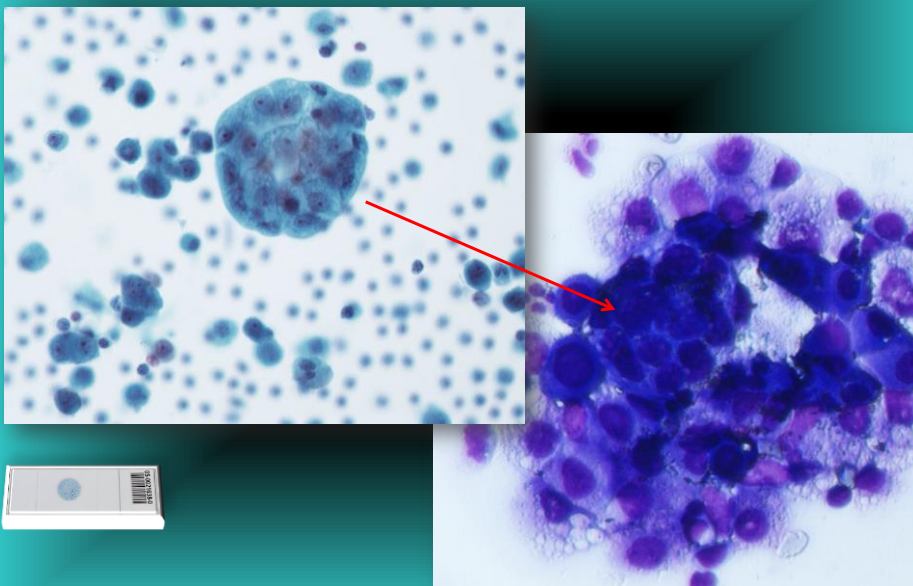
Традиционные мазки (окраска по Лейшману, X 200)



Препараты BD SurePath™ (окраска по Папаниколау, X 100)

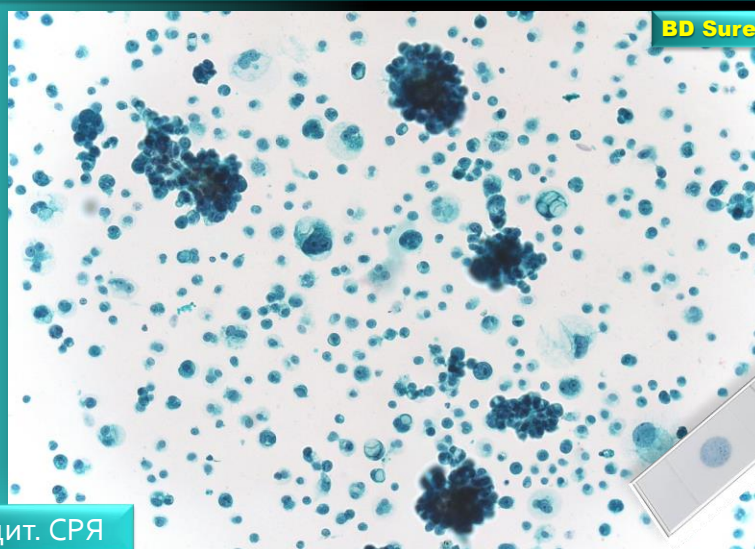


Препараты **BD SurePath™** (окраска по Папаниколу, X 400)



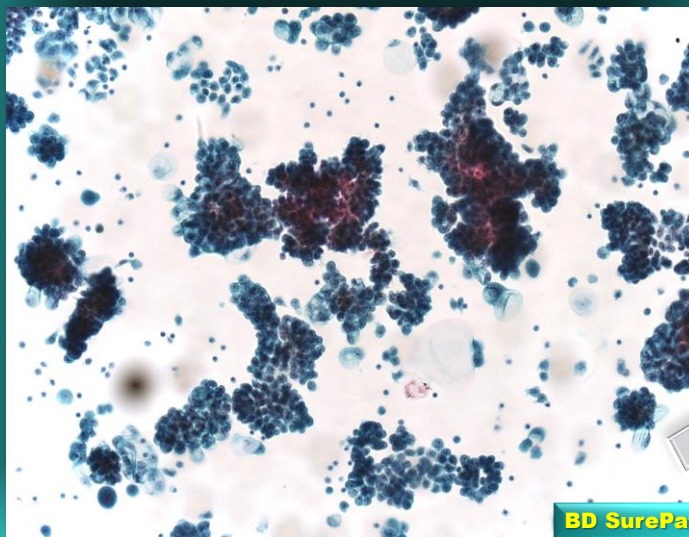
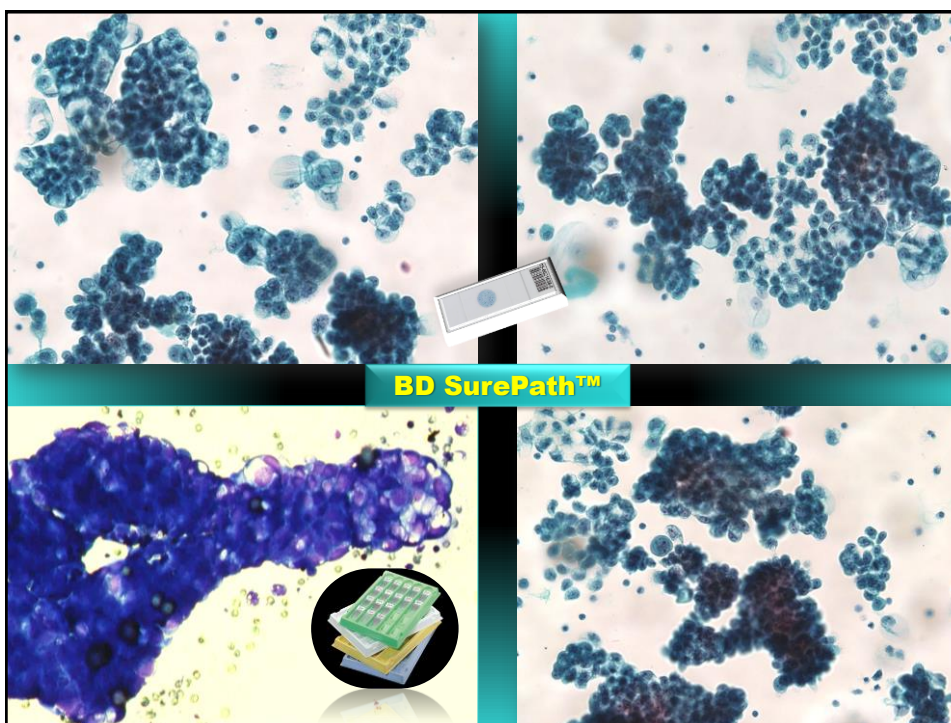
Серозный рак является самым частым гистологическим типом РЯ, составляя 80-85% опухолей яичников.

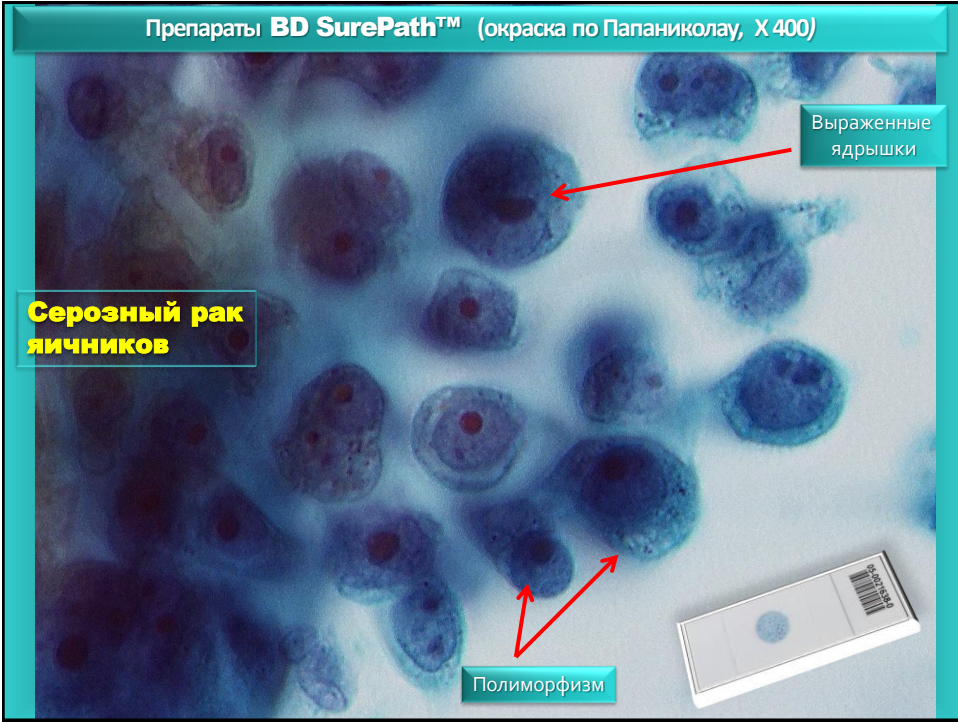
[*Soslow RA. Int J Gynecol Pathol. 2008;27:161-174*].

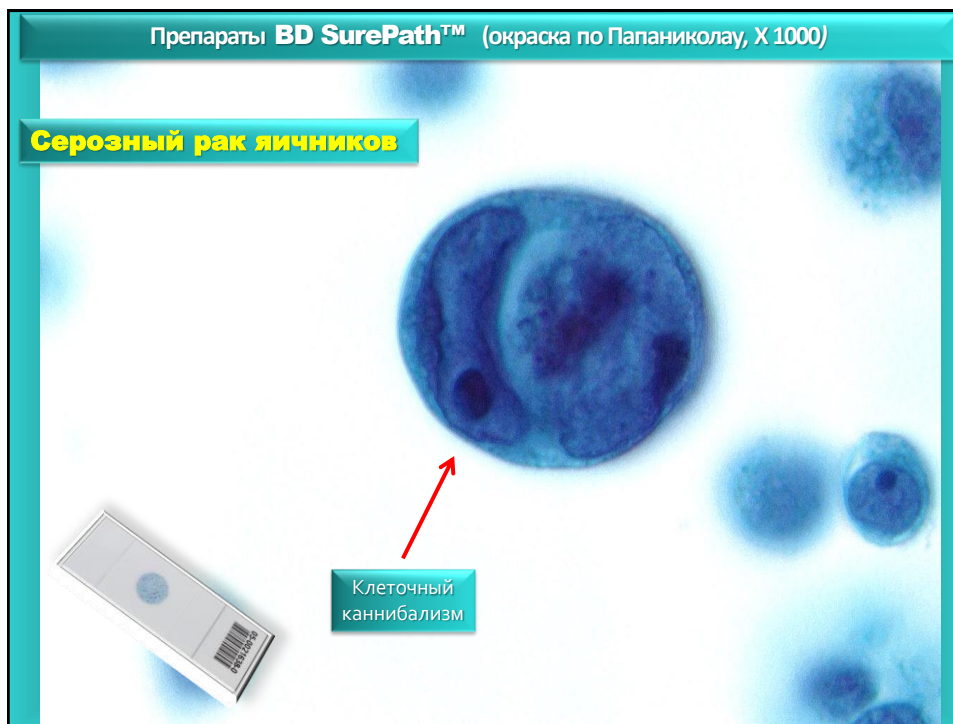


Асцит. СРЯ

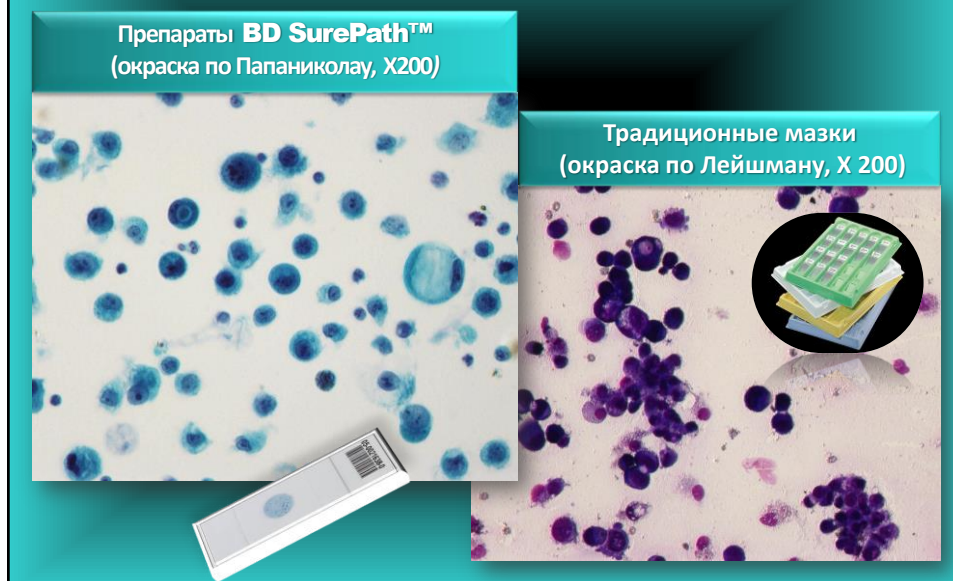
При цитологическом исследовании препаратов выпотных жидкостей хорошо определяются папиллярные структуры опухоли. Выражена атипия клеток. Часто отмечается наличие вакуолизации, из-за чего СРЯ необходимо дифференцировать с муцинозным раком.

**BD SurePath™****BD SurePath™**



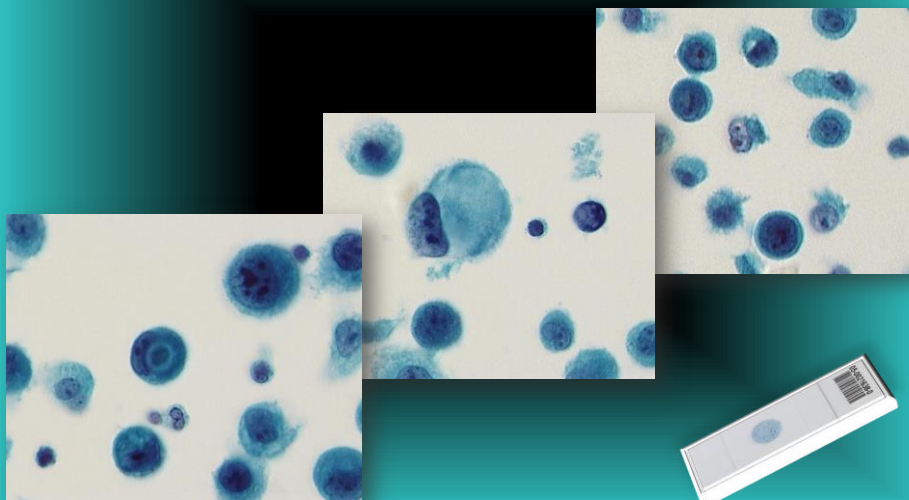


Выпоты при **раке желудка** обычно очень клеточные. Клетки чаще всего располагаются разрозненно, но могут формировать и плотные ацинарные структуры.

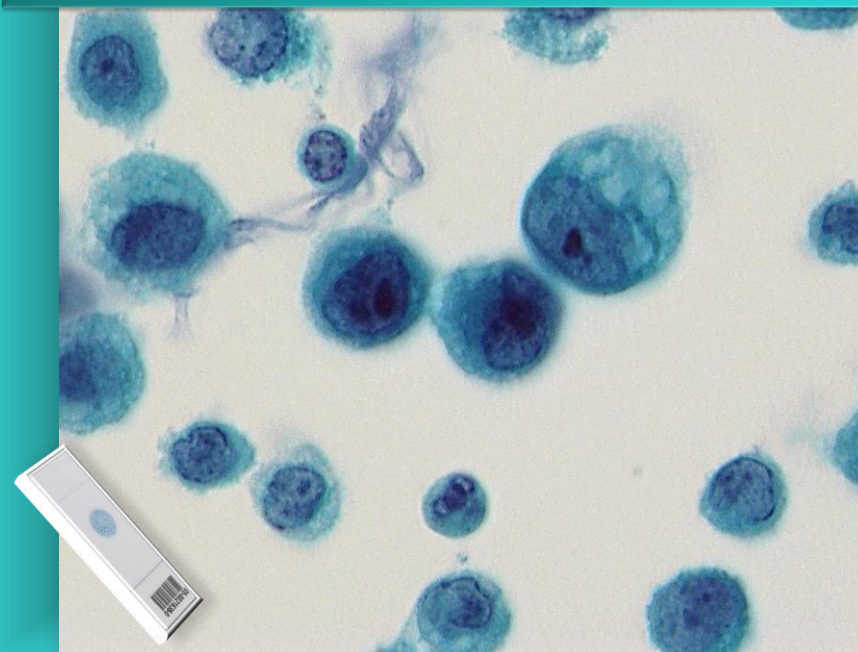


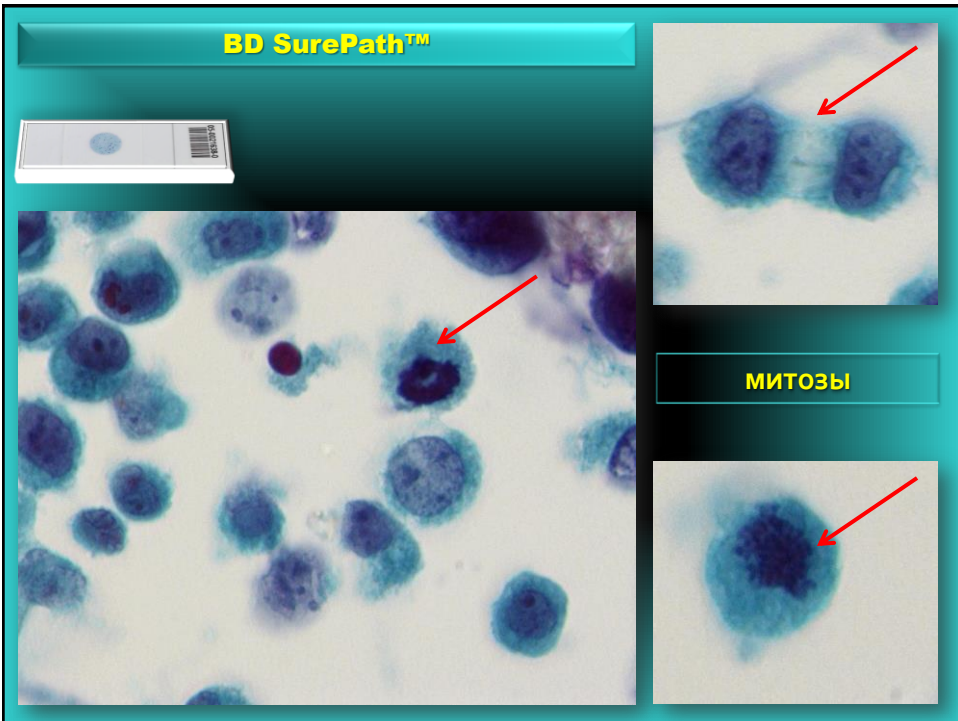
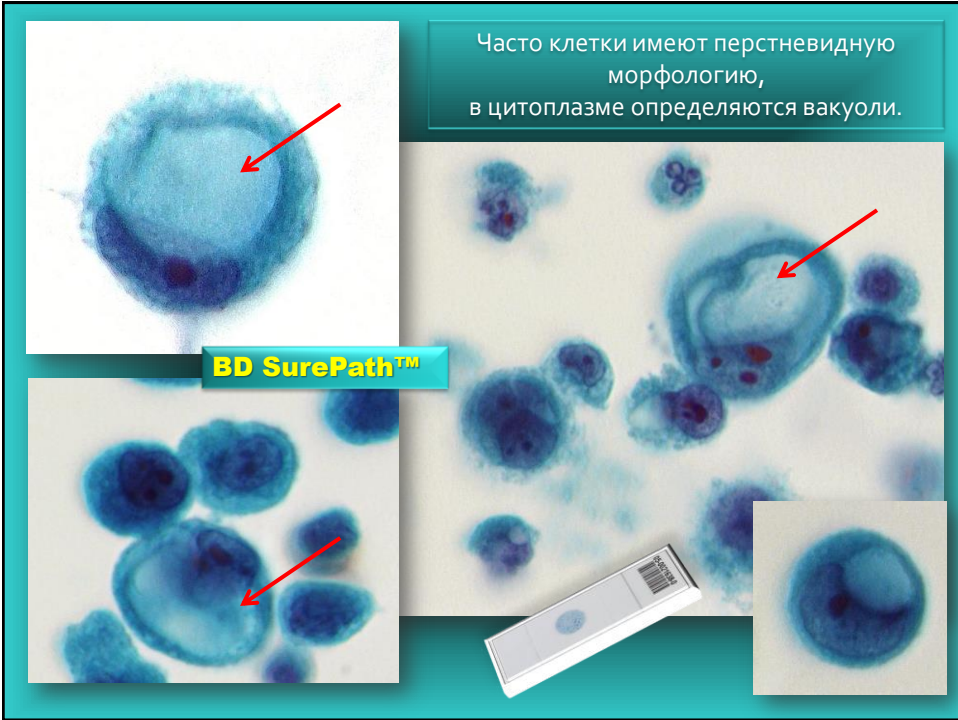
Размеры опухолевых клеток средние, ядерно/цитоплазматическое соотношение - высокое, ядра с выраженной атипией, грубым хроматином, видны ядрышки.

Препараты **BD SurePath™** (окраска по Папаниколау, X 400)



Препараты **BD SurePath™** (окраска по Папаниколау, X 400)





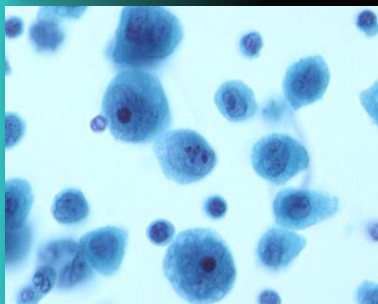


Выпоты при меланоме

Меланома в выпотах встречается редко, но все же не исключительно редко, поскольку эта опухоль отличается крайне агрессивным поведением. По данным Johnston меланома была выявлена в 10 случаях из 472 метастатических выпотов, по другим данным она была выявлена в 17/812 и в 7/423 злокачественных плевральных и перитонеальных выпотах соответственно. Чаще всего первичный очаг меланомы обнаруживается в коже, но описаны и единичные случаи опухоли в вульве. Метастазы в выпотах могут быть пигментными и беспигментными.

[Johnston WW. Cancer.1985; 56;905-909].

[Sears D. Acta Cytol.1987; 31;85-97].



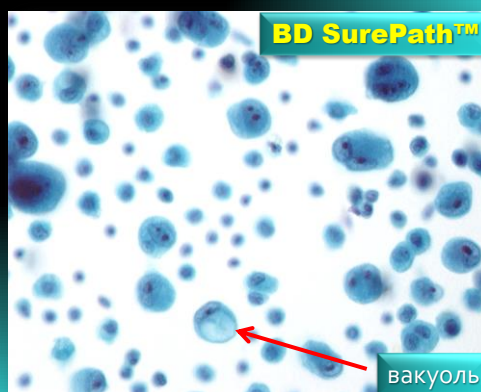
BD SurePath™

Основные цитоморфологические признаки метастатической меланомы в выпотах:

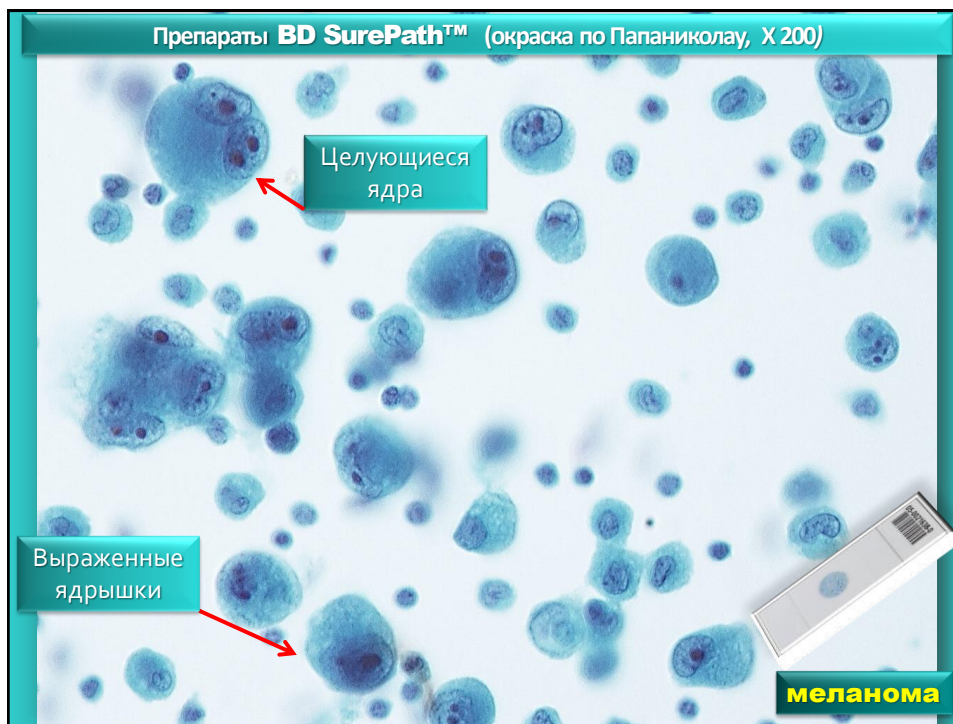
- разрозненно лежащие клетки,
- пигмент в цитоплазме,
- клеточный каннибализм,
- перинуклеарная зона просветления,
- атипические митозы,
- многоядерность,
- выделяющиеся ядрышки. Также сообщается о перстневидноклеточной морфологии клеток меланомы в отдельных случаях.



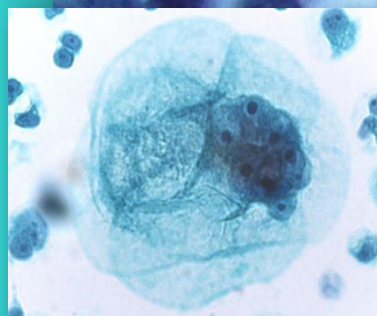
Клеточный каннибализм

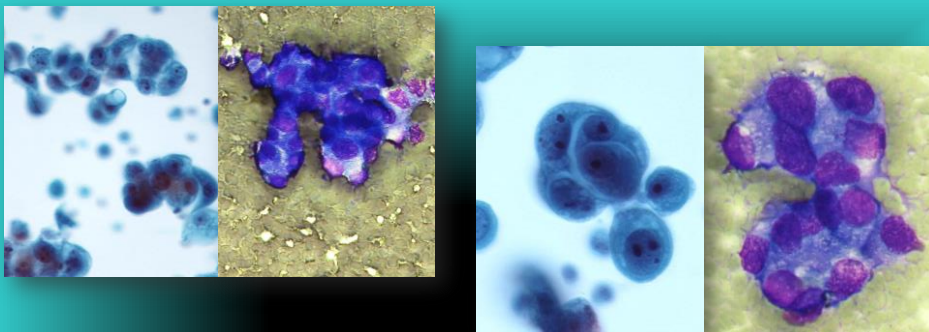


вакуоль



В препаратах **PrepStain BD** **особено** хорошо визуализируются нуклеолы ядер, структуры скоплений сохранны, слегка усилены и отмечается их трехмерность. Время просмотра стандартных **PrepStain BD** препаратов уменьшается в 10 раз, появляется возможность проведения дополнительных ИЦХ исследований.





	Традиционный метод (n=50)	BD SurePath™ (n=50)
Чувствительность	96,2%	100%
Специфичность	82,6%	82,6%

Выводы:

- ❑ Совместное применение жидкостной и традиционной цитологии позволяет повысить эффективность цитологической диагностики биологических жидкостей и смывов с брюшной полости за счет снижения процента неудачно взятого материала.
- ❑ Морфология клеток в препаратах **BD SurePath™** - клетки слегка уменьшены в размерах, хорошо видны нуклеолы ядер, структуры скоплений сохранены и акцентированы, отмечается трехмерность скоплений.
- ❑ В жидкостных препаратах **BD SurePath™** клетки сконцентрированы локально на стекле, образуя монослой, что облегчает просмотр мазка и экономит время исследования.
- ❑ Жидкостная технология **BD SurePath™** позволяет стандартизировать препараты и проводить иммуноцитохимические, цитогенетические, морфометрические исследования клеток биологических жидкостей.
- ❑ Возможность хранения, транспортировки и архивирования материала в стабилизирующем растворе.



