

LIQUID BASED CYTOLOGY V SKRÍNINGU RAKOVINY KRČKA MATERNICE

Liquid Based Cytology (LBC) in cervical cancer screening started to be used in early 90's of last century. Its aim was to minimize the inadequacies of conventional cytology. Until now, the world developed a number of large studies, which dealt with comparing of those two methodologies. Their conclusions were different, but all noted that the sensitivity and specificity of both methods were approximately equal. Advantages of LBC proved to be the reduced number of non - representative smears, the possibility to use the same material to investigate the presence of HPV, chlamydias, prognostic biological markers such as p16, L1, Ki 67 and the possibility to used so called computer-assisted screening. Since September of this year we have started to use this methodology in labs of MEDIREX GROUP.

Key words: Liquid Based Cytology (LBC), skrining rakoviny krčka maternice, rakovina krčka maternice, konvenčný PAP ster, cytológia

Gynekol. prax 2011; 9 (1): xx-xx

Úvod

Cytologický skrining rakoviny krčka maternice predstavuje jedno z najúspešnejších opatrení v oblasti sekundárnej prevencie tohto ochorenia v histórii medicíny. Konvenčná cytológia v diagnostike rakoviny krčka maternice sa používa viac-menej bez väčších zmien od 40-tych rokov minulého storočia. Túto diagnostickú metódu prvýkrát predniesol Dr. Georgios Papanikolaou na lekárskej konferencii v Battle Creek v štáte Michigan v roku 1928, ale až práca gynekológa Herberta Trauta „Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear“ v roku 1943 odštartovala praktické využitie tejto metodiky. Podľa tvorca tejto myšlienky sa však naďalej používa termín PAP test alebo PAP smear. Pri jeho správnej aplikácii je možné redukovať incidenciu cervikálneho karcinómu až o 80%⁽¹⁾ a úmrtie na toto ochorenie o 99%⁽²⁾. Rakovina krčka maternice na Slovensku predstavuje závažný medicínsky aj sociálno-spoločenský problém. Ide o druhé najčastejšie nádorové ochorenie u žien s incidenciou približne 500 nových prípadov za rok a úmrtnosťou 200 až 220 žien za rok. Tieto zlé čísla sú spôsobené nízkou účasťou žien na cytologickom skríningu tohto ochorenia, a to i napriek jeho už jestvujúceho legislatívneho ako i organizačného zabezpečenia⁽³⁾. Úlohou cytologického skriningu je práve zachytiť včasné štádiá rakoviny krčka maternice, ktoré predstavujú jednotlivé stupne dysplázie alebo tzv. intraepitelových neoplázií, a tak výrazne redukovať počet pokročilých a nevyliciteľných štádií tohto ochorenia. Schopnosť záchytu prekanceróznych lézií (senzitivita) pri jednorazovom konvenčnom cytologickom vyšetrení je okolo 72%, špecificita (stupeň dysplázie, resp. typ karcinómu) je okolo 94%. Opakovania vyšetrenia zvyšujú túto hranicu len obmedzene, keďže inherentné nedostatky tohto vyšetrenia zostávajú nezmenené (závislosť kvality cytologického vyšetrenia od kvality steru, správneho prenesenia materiálu z odberového nástroja na sklíčko, záchyt endocervikálnych lézií). Falošne negatívne nálezy v steroch vyšetovaných pomocou konvenčnej cytologie sú asi z dvoch tretín zapríčinené chybami v technike odberu alebo zlou fixáciou. Zostávajúca tretina falošne negatívnych náterov je spôsobená chybami v laboratórnom skríningu. Nové metódy priniesli rozvoj aj v tejto oblasti a výsledkom je

Liquid Based Cytology (LBC), ktorá sa úspešne používa vo svete od polovice 90-tych rokov minulého storočia. Bola vyvinutá práve s cieľom minimalizácie problémov spojených s konvenčnou cytológiou.

Materiály a metódy

Čo vlastne LBC je, aké výhody má oproti konvenčnej cytológii a aké sú naše prvé skúsenosti s touto metódou v našom laboratóriu.

Liquid Based Cytology alebo tiež tenkovrstvová cytológia predstavuje novú technológiu, v ktorej sa bunky odobraté z krčka maternice pomocou plastickej špachtle a endocervikálneho brushu ihneď uložia do tekutého média (na báze etanolu alebo metanolu) v špeciálnej nádobke tzv. vialke. Tým sa zabezpečí ich fixácia a zabráni sa ich mechanickému poškodeniu. Takto uložené bunky možno uchovávať pri izbovej teplote po dobu 5-tich až 6-tich týždňov. Podľa toho, akým spôsobom sa bunky z vialky dostanú na sklíčko preparátu, existujú dva systémy. Prvý používa filtráciu s využitím podtlaku a rotácie a volá sa ThinPrep, druhý využíva gravitačnú sedimentáciu a volá sa SurePath. Obidva systémy koncentrujú epiteliálne bunky, oddeľujú ich od krvi, hlienu, zápalových buniek a iných nežiaducich prímiesí, ktoré sťažujú mikroskopické hodnotenie. Bunky sú následne uložené v tenkej vrstve na sklíčko na okrúhlym poli s priemerom 20mm (ThinPrep) alebo 13mm (SurePath). Celý proces separácie buniek, ich transport cez polykarbonátovú filtračnú membránu a umiestnenie na sklíčko preparátu automaticky riadi procesor a jeho výsledkom je preparát, ktorý sa vo farbiacom automate farbí ako konvenčný cytologický náter podľa Papanicolaoua alebo sa použije na imunocytochemickú detekciu expresie onkoproteínov, resp. prognostických biomarkerov (p16, L1, Ki67). Metódou LBC môžeme jedným vyšetrením analyzovať približne 50 000 až 75 000 buniek, čo je menej ako pri konvenčnom cytologickom nátere, kde je prítomných od 50 000 až do 300 000 a viac buniek.

Základná cytomorfológia LBC je v zásade podobná konvenčnému PAP steru. V **tabuľke 1** sú uvedené rozdiely medzi konvenčným PAS sterom a LCB⁽⁴⁾:

Tabuľka 1.

Konvenčný PAP ster	Liquid Based Cytology
<ul style="list-style-type: none">bunky nie sú randomizovane distribuovanéprítomné sú hrubé a tenké oblastibunky sú rozložené po celom sklíčkuprítomné sú artefakty spôsobené vzduchom resp. vysušením	<ul style="list-style-type: none">bunky sú distribuované randomizovanebunky sú rozložené v tenkej vrstvebunky sú koncentrované do malej areyiný typ artefaktov ako napr. rozrušenie okrajov

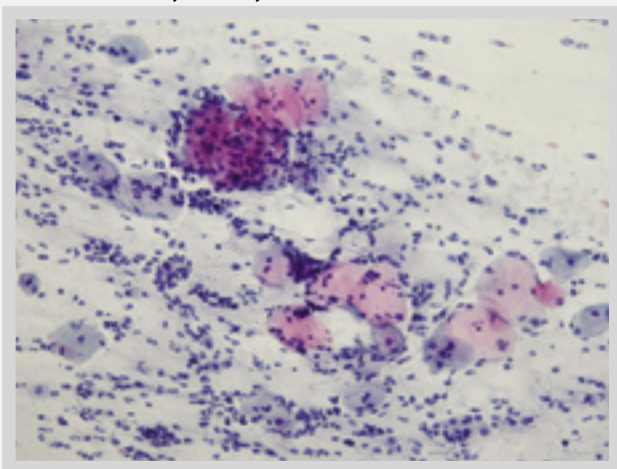
Aj samotné bunky v LBC vykazujú určité odlišnosti oproti konvenčnému PAP steru⁽⁵⁾, a to:

- bunky si zachovávajú v tekutine okrúhly tvar
- ich jadrá sa farbja menej intenzívne
- jadierka sú nápadnejšie
- bunky sú disagregované (viac samostatných buniek)
- nie sú prítomné sterové zhluky
- zhluky tvorené bunkami sú ťažšie hodnotiteľné
- abnormálne bunky sú prítomné v menšom počte, ale na číslom pozadí sú ľahšie viditeľné

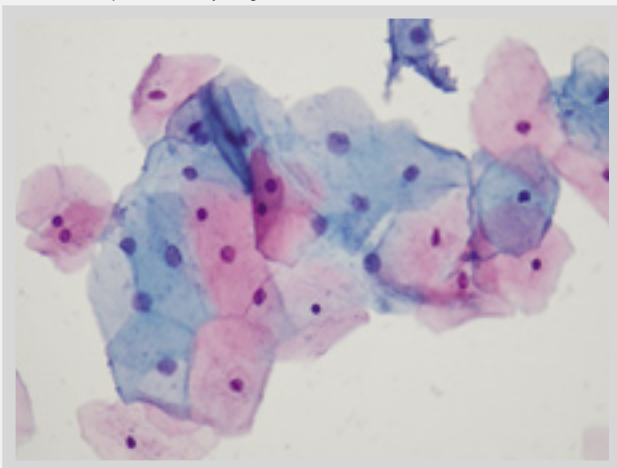
Senzitivita LBC sa pohybuje od 61 % do 66% , špecificita od 82 % do 91 % . Niektoré, ale nie všetky štúdie opisujú zvýšenie senzitivity pri léziách typu ASCUS alebo LSIL, pri léziách typu HSIL je približne rovnaká ako v konvenčnom PAP stere. LBC znižuje výskyt nereprezentatívnych sterov z 4,1 % na 2,6%⁽⁶⁾. Cytologický preparát získaný LBC poskytuje jasný a čistý obraz buniek, a tým aj presnejšiu interpretáciu výsledku.

LBC umožňuje vyšetriť prítomné dysplastické bunky imunocytochemickými metódami na prítomnosť onkoproteínu p16, ktorého zvýšená expresia v skorom štádiu transformácie je ideálnym biomarkerom HPV transformovaných buniek. Spolu s imunocytochemickým vyšetrením kapsidového proteínu HPV L1 umožňuje stanoviť pravdepodobnosť progresie ochorenia (karcinogenézy). Dajú sa vyšetriť aj iné biomarkery ako Ki67, PCNA a iné.

Obrázok 1. Konvenčný cervikálny náter



Obrázok 2. Liquid-Based Cytológia



LBC umožňuje z jednej vzorky vyšetriť HR HPV metódou HCII, prítomnosť chlamýdií metódou PCR a iných živých agens.

LBC možno spojiť s tzv. počítačom asistovaným skríningom, ktorý urýchľuje a skvalitňuje diagnostický proces, eliminuje chyby vzniknuté ľudským faktorom (únava, nepozornosť a pod.).

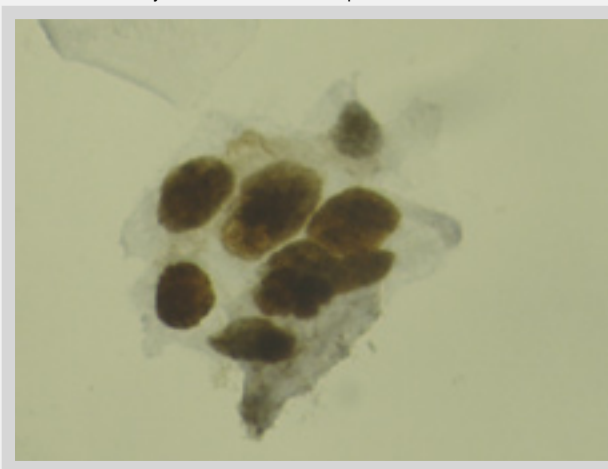
V súčasnosti možno konštatovať, že LBC sa stala minimálne rovnocennou metódou voči konvenčnému PAP steru. Dôkazom toho je prudký nárast využívania LBC v skríningu rakoviny krčka maternice v USA, Veľkej Británii, Škótsku, Francúzsku, Švédsku, Nemecku, ako aj v Austrálii. V USA túto metódu využíva až 80 % gynekológov. Validitu LBC, konkrétne ThinPrep, potvrdil a schválil aj americký Úrad pre potraviny a lieky (FDA).

Zavádzanie moderných technológií a techniky v laboratórnej diagnostike je jednou z hlavných charakteristík spoločnosti **ME-DIREX GROUP**. Preto sme začiatkom júla tohto roka pristúpili k pilotnému testovaniu tejto metódy v našich podmienkach. Testovali sme dva prístroje, každý pracoval na inom princípe (ThinPrep a Surepath, viď vyššie). Po dôkladnej analýze sme sa rozhodli pre ThinPrep. Od júla 2010 až do apríla 2011 sme touto metódou vyšetřili celkovo 6 470 žien.

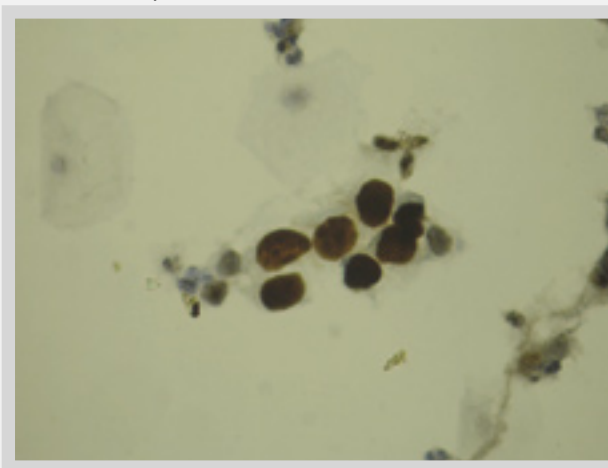
V tabuľke 2 sú zachytené počty a percentuálne zastúpenie vyšetření priradené k jednotlivým diagnostickým zaradeniam podľa Bethesda systému.

Z tabuľky vyplýva, že percentuálne zastúpenie jednotlivých stupňov dysplázie je v zásade rovnaké ako pri konvenčnom

Obrázok 3. Imunocytochemické farbenie na p16



Obrázok 4. Imunocytochemické farbenie na Ki67



Tabuľka 2.

Diagnóza	Popis	Počet	V %
C53	Zhubný nádor krčka maternice	1	0,02
N86	Erózia a ektropium krčka maternice	5 617	86,82
N87.0	Ľahká cervikálna dysplázia	311	4,81
N87.1	Stredná cervikálna dysplázia	83	1,28
N87.2	Ťažká cervikálna dysplázia, nezatriedená inde	14	0,22
N87.9	Nešpecifikovaná dysplázia krčka maternice	443	6,85

PAP stere. Validitu našich výsledkov budeme môcť vyhodnotiť až porovnaním s biopsickými vyšetreniami (u dysplázií CIN 2 a vyšších), čo je našou úlohou do budúcnosti.

Diskusia

Vo svete vzniklo veľa štúdií, ktoré si dali za cieľ odpovedať na otázku, čo je lepšie: konvenčný PAP ster alebo Liquid Based Cytology? Boli to randomizované štúdie na desiatkach tisíc žien, vykonané renomovanými gynekológmi a cytológmi, resp. patológmi zo západnej Európy i USA. Treba skonštatovať, že odpovede boli nejednoznačné - od záporného stanoviska k LBC až po jeho jednoznačné uprednostnenie. V senzitivite a špecificite LBC výraznejším spôsobom nenahrádza konvenčný PAP ster. LBC je ekonomicky voči zdravotným poisťovniam nákladnejšia a spravidla musia na nej finančne participovať i pacientky. Ďalej však už prevažujú iba benefity: **1.** LBC znižuje percento nereprezentatívnych náterov, čo uvítajú najmä pacientky, pretože sa nemusia podrobiť opakovanému vyšetreniu. **2.** Z jedného vyšetrenia (vialky) možno urobiť ďalšie molekulárne vyšetrenia ako dôkaz HR HPV, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae a i.

3. Umožňuje vyšetrenie prognostických markerov imunocytochemickými metodikami ako p16, L1, Ki67 a stanoviť tak prognózu ochorenia. **4.** Spolu s tzv. počítačom asistovaným skríningom výrazne zefektívňuje diagnostický proces: skracuje čas jedného vyšetrenia, šetrí pracovnú silu, znižuje chybovosť skríningu spôsobenú ľudským faktorom (únava a pod.).

Na Slovensku má v súčasnosti každá žena možnosť slobodne sa rozhodnúť, akým spôsobom absolvuje cytologický skríning krčka maternice. Všetky potrebné informácie môže získať u svojho gynekológa alebo na webovej stránke www.cytologia.sk.

Adresa pre korešpondenciu

MUDr. Peter Vereš, Medicyt, s. r. o., člen skupiny **MEDIREX GROUP**
MUDr. Andrea Jašková, Medicyt, s. r. o., člen skupiny **MEDIREX GROUP**

Literatúra

1. Arbyn, M. et. al. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second Edition. Annals of Oncology, 2010, 21(3): 448-458.
2. Demay, M. Practical principles of cytopathology. Revised edition. Chicago, IL: American society for clinical Pathology Press, 2007.
3. Zákon č. 661/2007 Z.z z 5. decembra 2007.

4. Mac Demay, Richard, MD. The PAP test, 2005, (p. 214).

5. Mac Demay, Richard, MD. The PAP test, 2005, (p. 215).

6. Ronco, G. - Cuzick, J. - Pierotti, P. et. al. Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening randomised controlled trial. 2007. BMJ 56 335 (7609): 28).