Общество с ограниченной ответственностью МЛТ
Группа компаний ЭМКО

Цикл презентаций
Методические основы цитологического скрининга

3. Основы методики окраски по Папаниколау
Подбор оптимальных режимов, артефакты
МЛТ-СМК-РМП-003.01-18

Составили: Кузнецов М.В. - 5547638@bk.ru,
Сниховская К.В. - k.snihovskaya@gmail.com

papanicolaou.ru ● stainer.ru ● fastainer.com

Группа компаний ЭМКО

ГК ЭМКО: ООО ЭМКО – Москва, ООО МЛТ – ОЭЗ «ДУБНА»
– ведущий производитель коагулометров и автоматов окраски в России

1994 г. - первый российский коагулометр - ЭМКО-02
Сейчас выпускается 7 моделей коагулометров ЭМКО.
Это самые массовые анализаторы показателей гемостаза в России.

2010 г. - первый российский программируемый автомат окраски биологических препаратов (slide stainer) «ЭМКОСТЕЙНЕР»
Сейчас выпускается 5 моделей автоматов окраски, готовятся к выпуску ещё три модели.
Это самые массовые автоматы окраски в России.

Цикл презентаций
Методические основы цитологического скрининга

1. Получение клеточного материала с шейки матки и первичная пробоподготовка (нанесение мазка, фиксация)

2. Основы методики окраски по Папаниколау

3. Основы методики окраски по Папаниколау - подбор оптимальных режимов, артефакты

4. Приборы и реагенты производства ГК ЭМКО для цитологического скрининга

5. Выбор технологии цитологического скрининга: традиционный ПАП-тест, или жидкостная пробоподготовка?

«...Моя мечта – не разбогатеть, даже не прожить счастливо, а работать, действовать и творить, делать то, что достойно человека честного и сильного»

Георгиос Н. Папаниколау (1883-1962 г.)

Георгиос Папаниколау - греческий врач, разработавший методику диагностики рака шейки матки и предраковых состояний. Этот способ диагностики получил названия в честь изобретателя: мазок по Папаниколау, окраска Папаниколау, ПАП-тест, PAP-test. Миллионы женщин были спасены благодаря Папаниколау. При Внедрении скрининга по Папаниколау смертность от рака шейки матки снижается в среднем на 70%.

PAPANICOLAOU.RU

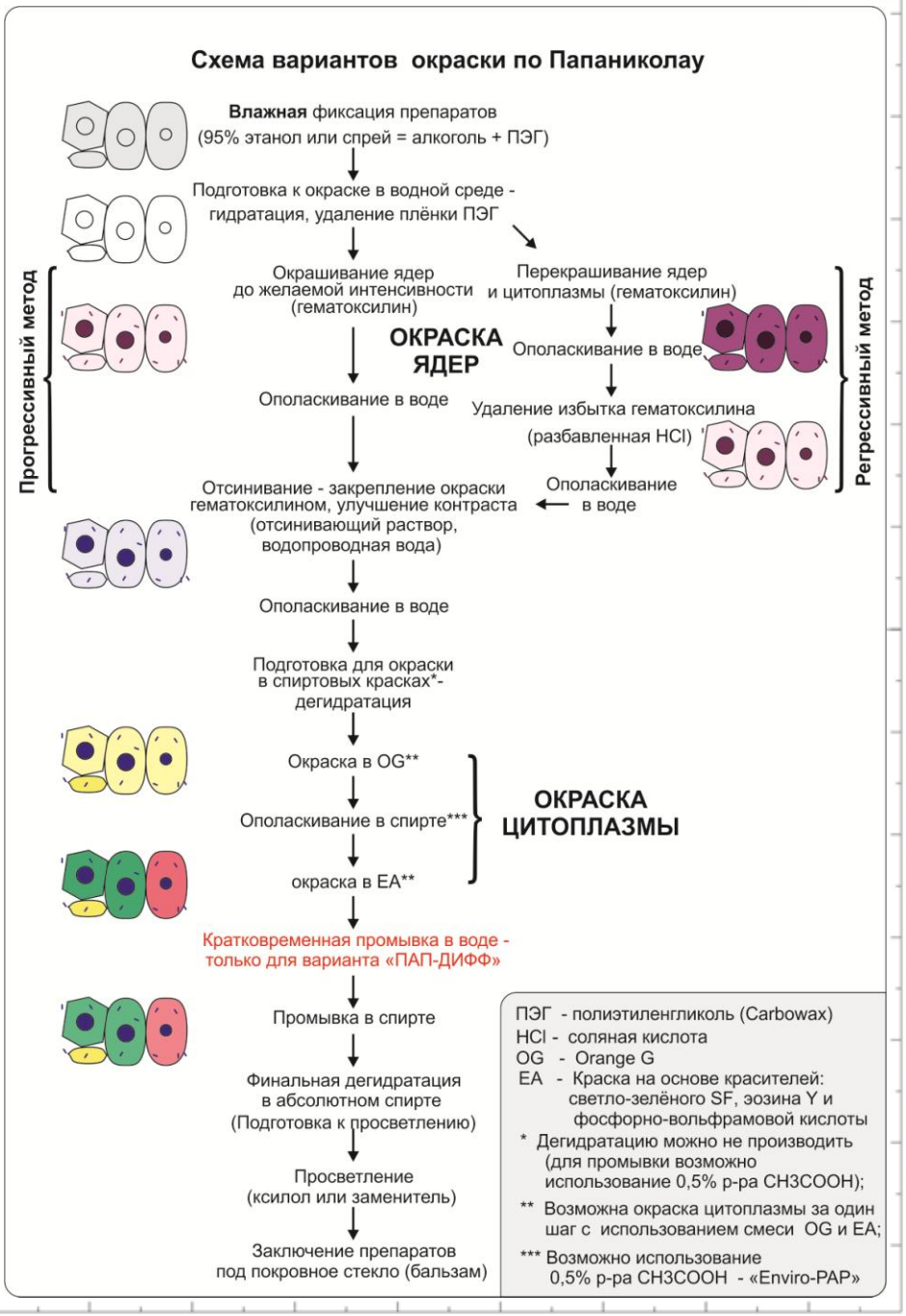
Презентации размещаются на сайте papanicolaou.ru

Окраска по Папаниколау

При окрашивании по Папаниколау последовательно применяются 3 краски: гематоксилин – для окраски ядер, краски OG и EA – для окраски цитоплазмы.

При применении варианта методики «ПАП-ДИФФ», препарат, после окрашивания, кратковременно промывается в водопроводной воде для удаления излишков краски со стекла.

Далее выполняется дегидратация препарата в спирте, просветление (в ксилоле или его заменителе) и заключение под покровное стекло.



Подбор оптимальных режимов окрашивания

Характеристики красок

Осваивая методику, или получив новую партию красок, целесообразно предварительно определить основные характеристики красок:

- **качество окрашивания** – соответствие результатов окрашивания стандартам методики;
- **оптимальную длительность окрашивания** препаратов в каждой краске;
- **рабочий ресурс краски** – число стекол, которое может быть окрашено данным объемом краски, до того как станет заметным ухудшение качества окрашивания.

Определение характеристик целесообразно проводить с применением контрольных препаратов.

Окрашивание контрольных препаратов

Окрашивание контрольных препаратов применяется для определения и контроля характеристик красок, для контроля и обеспечения качества окрашивания в процессе осуществления скрининга.

Контрольный препарат – комбинированный буккальный мазок, содержащий клетки плоского эпителия с внутренней поверхности щеки и кератинизированные клетки с поверхности твёрдого нёба.

Кератинизированные клетки (чешуйки) с поверхности твердого нёба используются для оценки работы краски OG.

Клетки плоского эпителия с внутренней стороны щеки используются для оценки работы гематоксилина и краски EA.

Пробоподготовка контрольного препарата должна максимально совпадать с пробоподготовкой клинического материала, для которого подбирается режим окраски.

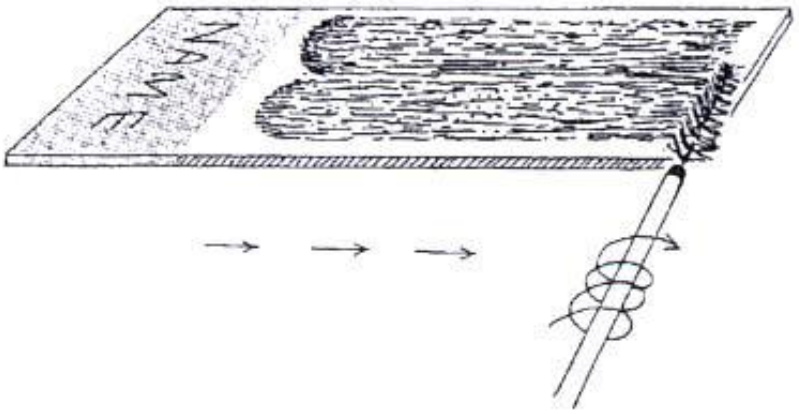
Для каждого типа препаратов необходимо подобрать свои времена окраски.

Техника взятия комбинированного буккального мазка. Традиционный мазок (ТМ)

1. Перед взятием клеток прополощите полость рта чистой водой (нельзя использовать минеральную воду).
2. Заберите клетки с поверхности твердого нёба (аккуратно, с медленным вращением, потрите цервикальной щёткой типа Cytobrash поверхность твердого нёба ~ 5* раз).
3. Аккуратно, с медленным вращением, потрите этой же щёткой эпителий с внутренней стороны щеки ~ 5* раз.
4. Распределите материал на предметном стекле с прокатыванием цитощётки по стеклу (см. следующий слайд). Материал наносится на 2/3 стекла.
5. Немедленно зафиксируйте препарат погружением в жидкий фиксатор (95% спирт), или с помощью фиксатора-спрея.

* Техника взятия материала, в частности, количество движений щёткой, сила нажатия, зависит от состояния эпителия донора.

Необходимо правильно наносить клетки на стекло



Материал со щётки переносится прокатыванием её по слайду, вращая ручку щётки, для обеспечения **тонкого** слоя клеток и слизи. [4].

Техника взятия комбинированного буккального мазка. Жидкостная пробоподготовка (ЖЦ)

1. Перед взятием клеток прополощите полость рта чистой водой (нельзя использовать минеральную воду).
2. Заберите клетки с поверхности твердого нёба (аккуратно, с медленным вращением, потрите к цервикальной щёткой типа Cytobrash поверхность твердого нёба ~ 5 раз *).
3. Аккуратно, с медленным вращением, потрите этой же щёткой эпителий с внутренней стороны щеки ~ 5 раз *.
4. Поместите наконечник щётки в виалу с консервирующей жидкостью. (Для этого нужно отделить ножницами саму щётку с небольшим кусочком нижней части пластиковой ручки от верхней части ручки)
5. Последующая обработка препарата – в соответствии с инструкциями производителя системы жидкостной пробоподготовки.

* Техника взятия материала, в частности, количество движений щёткой, сила нажатия, зависит от состояния эпителия донора.

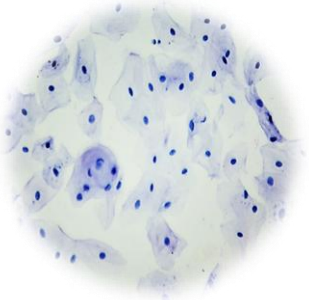
Оценка качества окрашивания и подбор времени окраски

Для оценки качества и подбора времени окраски используется два варианта окрашивания контрольных препаратов:

1. **Окрашивание одной краской** показывает как каждая краска работает по отдельности
   - позволяет понять как работает каждая краска без наложения цвета других красителей;
   - подходит для знакомства с методикой окраски по Папаниколау;
   - подходит для отработки окрашивания на красках нового производителя.
2. **Полное окрашивание** – работа красок и реагентов в совокупности
   - позволяет оценить результат совместной работы всех реагентов, применяемых в методике;
   - подходит для подбора оптимальных времен окрашивания;
   - подходит для быстрой проверки качества окрашивания новой партии красок.

Окрашивание одной краской

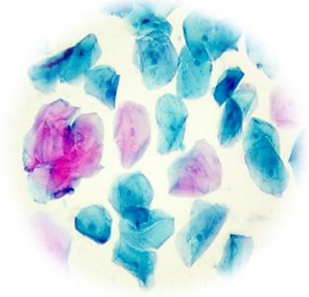
Окрасьте контрольные препараты **отдельно в каждой краске** с удвоением времени выдержки



Гематоксилин – 30 с, 1 мин, 2 мин, 4 мин
Гематоксилин должен давать синий цвет ядра с легким окрашиванием цитоплазмы. Интенсивность окрашивания должна позволять различить структуру хроматина.

(Не допускать перекрашивания).

OG – 15 с, 30 с, 1 мин, 2 мин, 4 мин
Краска OG должна давать желтое или оранжевое окрашивание тонких участков препарата, наслоения – оранжевые.



EA – 15 с, 30 с, 1 мин, 2 мин, 4 мин, 6 мин, 8 мин
Краска EA должна давать отчетливое зеленое и розовое окрашивание.

Оцените препараты и выберите времена окрашивания, соответствующие лучшему результату

Полное окрашивание

Окрасьте контрольные препараты по полной методике (со всеми реагентами), применяемой в лаборатории.

В качестве исходных используйте времена, рекомендованные производителем или определенные при индивидуальном окрашивании.

При необходимости скорректируйте времена выдержки в красках и выберите времена окрашивания, соответствующие лучшему результату.

Результат окраски должен иметь вид:

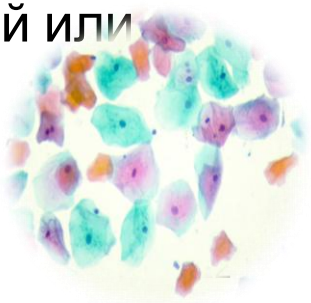
Ядра – синий цвет.

Цитоплазма в зависимости от степени зрелости плоского эпителия окрашена:

- в красный или розовый цвет в зрелых клетках плоского эпителия,
- в оранжевый цвет в клетках с ороговением (чешуйки),
- цитоплазма остальных клеток окрашена в светло-зелёный или сине-зеленый в незрелых клетках.

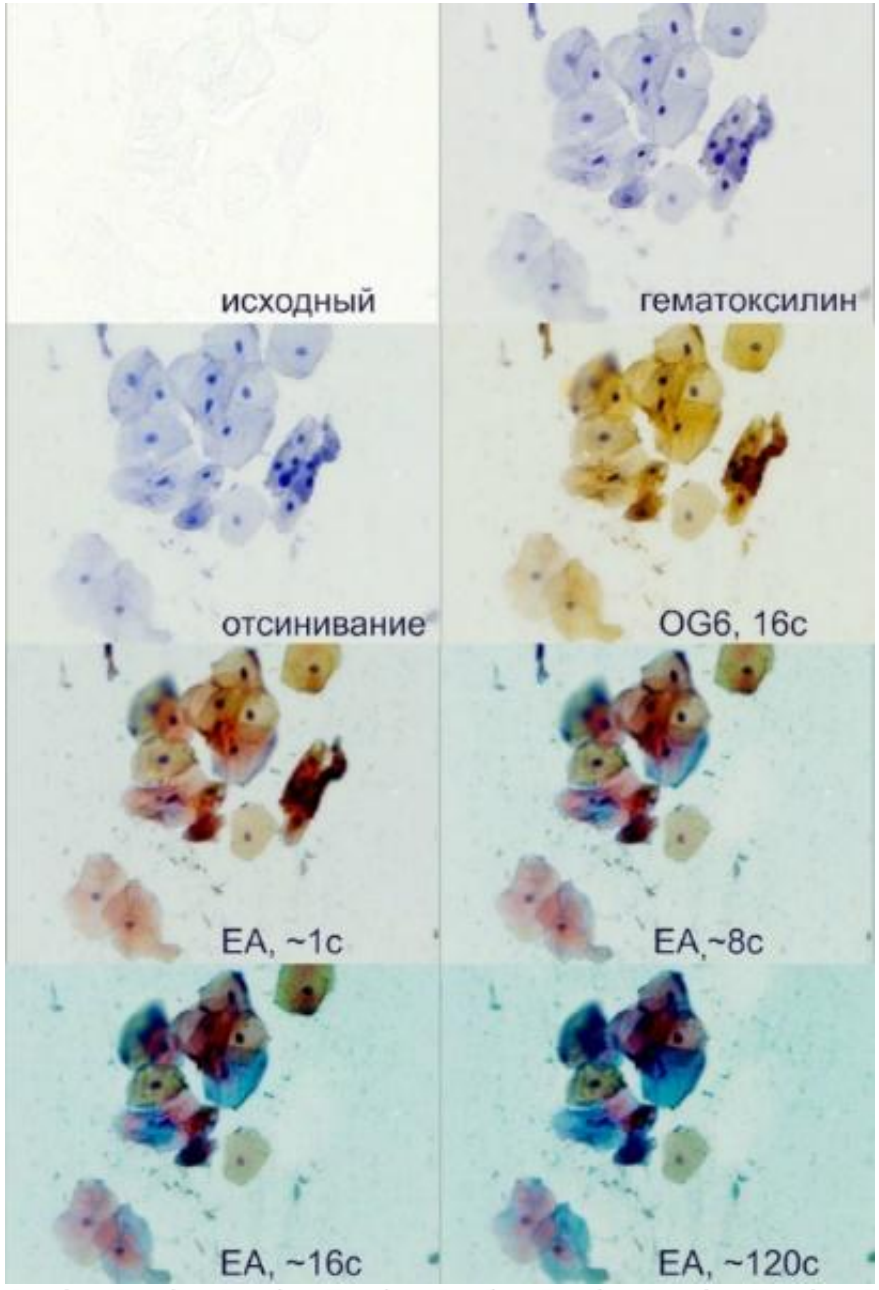
Эритроциты (при наличии) – красный или розовый цвет.

Лейкоциты (при наличии) – синий цвет.

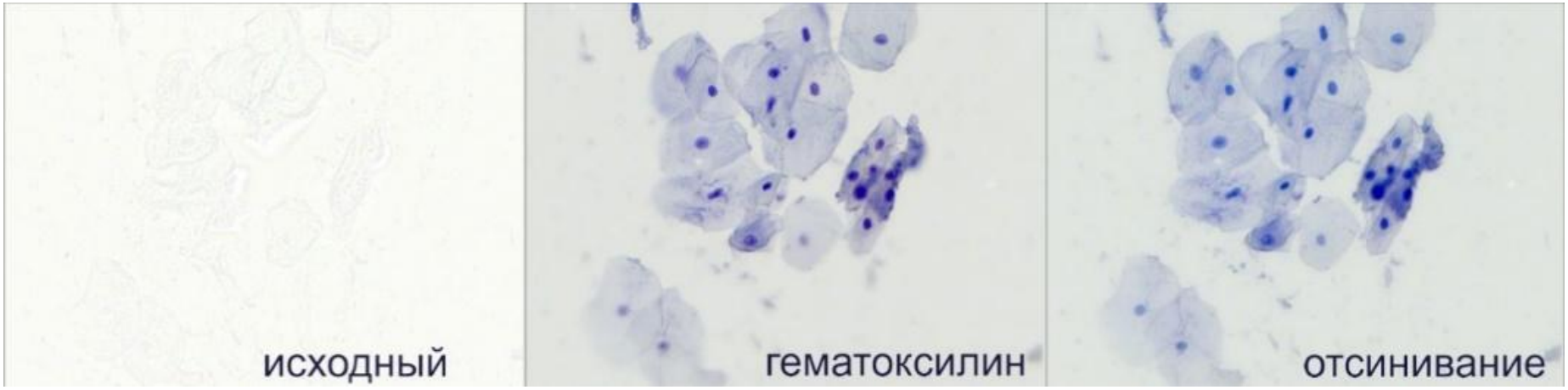


Формирование цвета

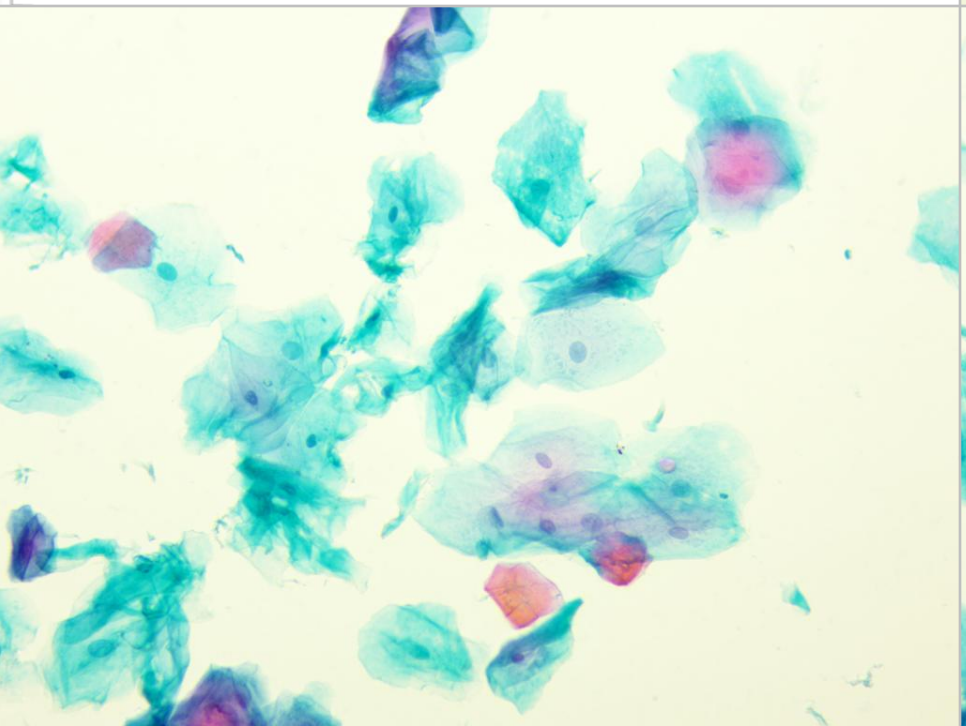
Результат окраски по Папаниколау структурных элементов клетки следует рассматривать, как наложение вкладов различных красителей. Результирующий цвет зависит от соотношения количества молекул разных красителей в цитоплазме клеток. Это необходимо учитывать при интерпретации микрофотографий и подборе режимов окраски.



Вклад красителей в формирование цвета: гематоксилин

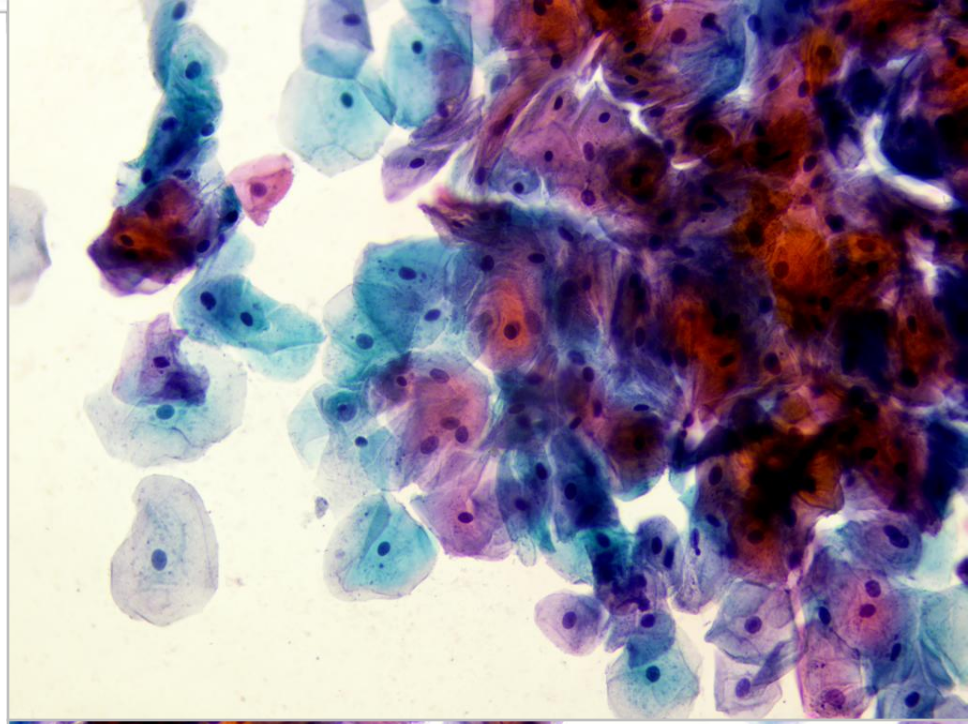


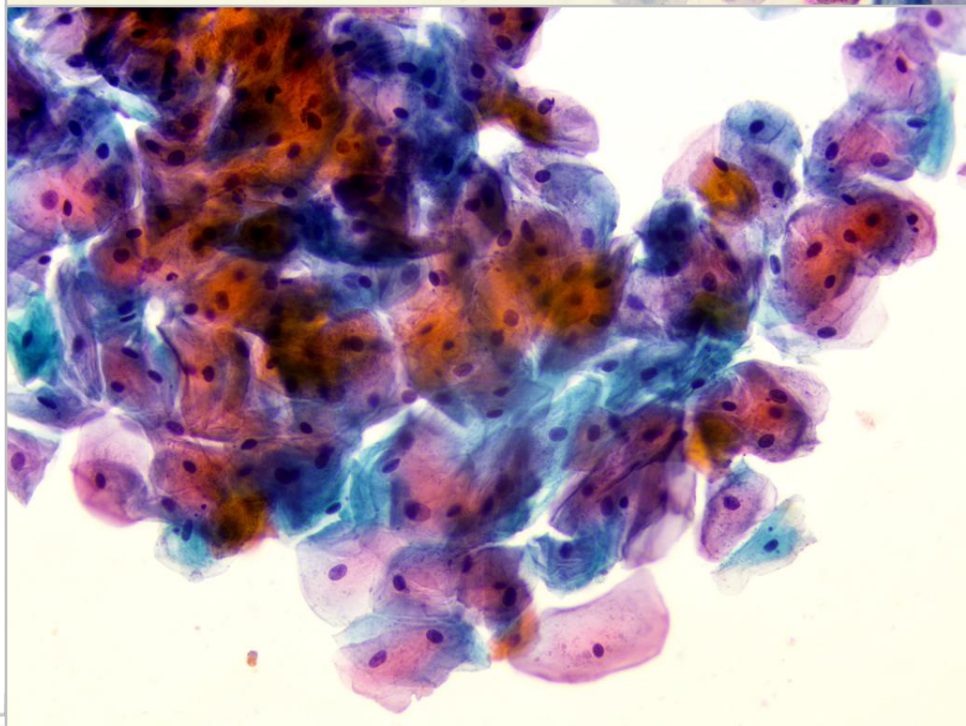
При недостаточном окрашивании в гематоксилине ядра бледные, структура трудноразличима



При перекрашивании в гематоксилине может быть несколько эффектов:

1. Гиперхромные ядра, структура трудноразличима
2. Гематоксилин закрашивает цитоплазму клеток, розовый и зеленый приобретают синеватый оттенок, препарат становится больше похож на таковой при окраске по Романовскому или Гематоксилином-Эозином
3. Интенсивность окрашивания нормальная, ядра не перекрашены, никаких изменений для препарата нет

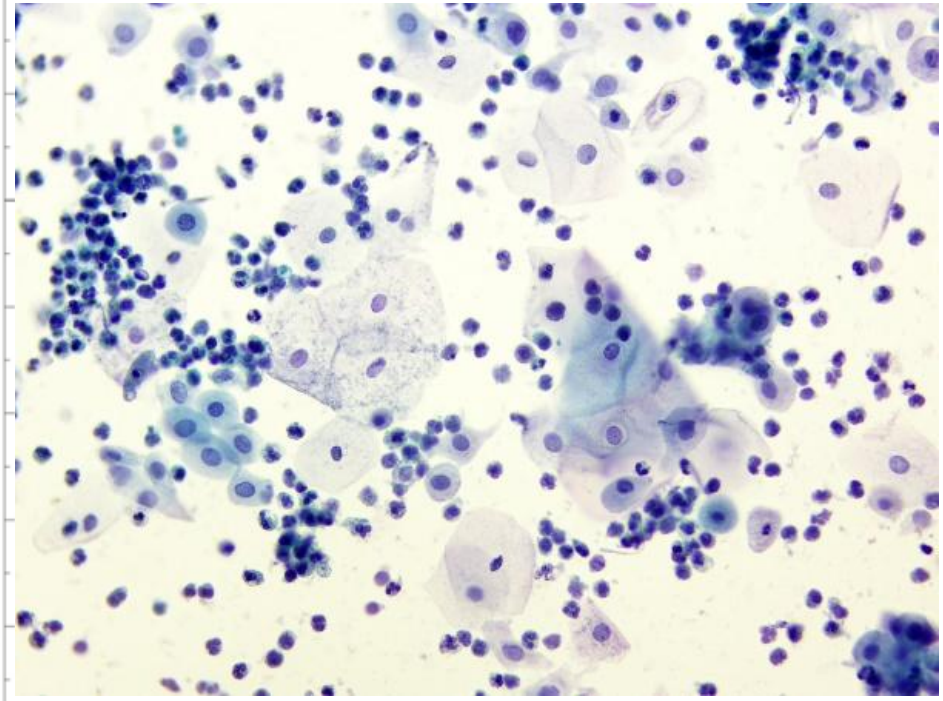




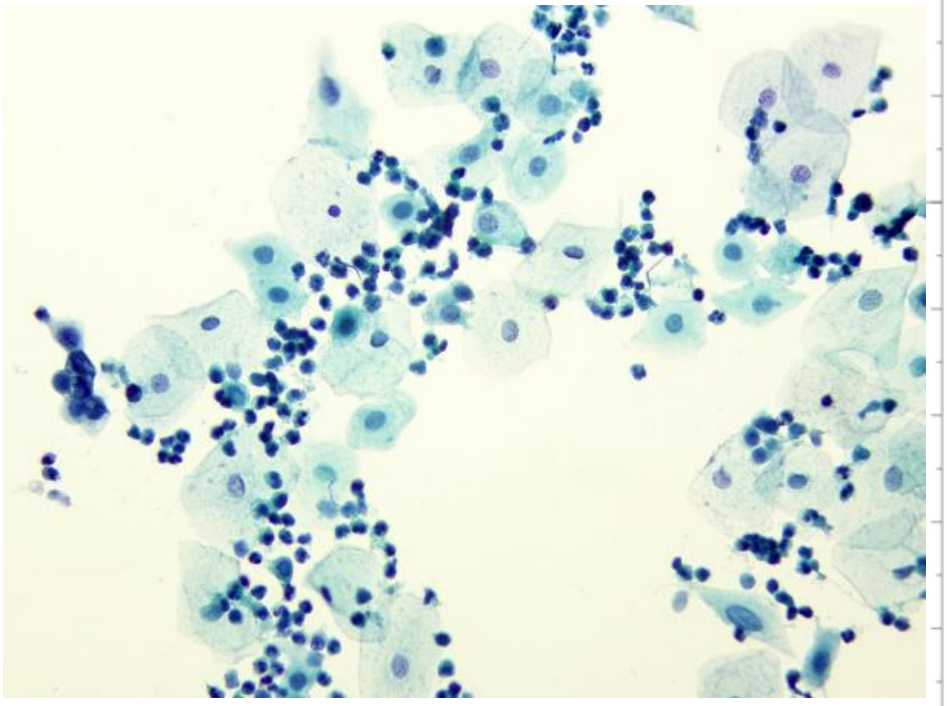
Результат окраски зависит от типа используемого гематоксилина.

При использовании гематоксилина с высокой концентрацией красителя препарат может выглядеть перекрашенным даже при небольших временах окрашивания (1-2 мин).

Гематоксилин Гарриса

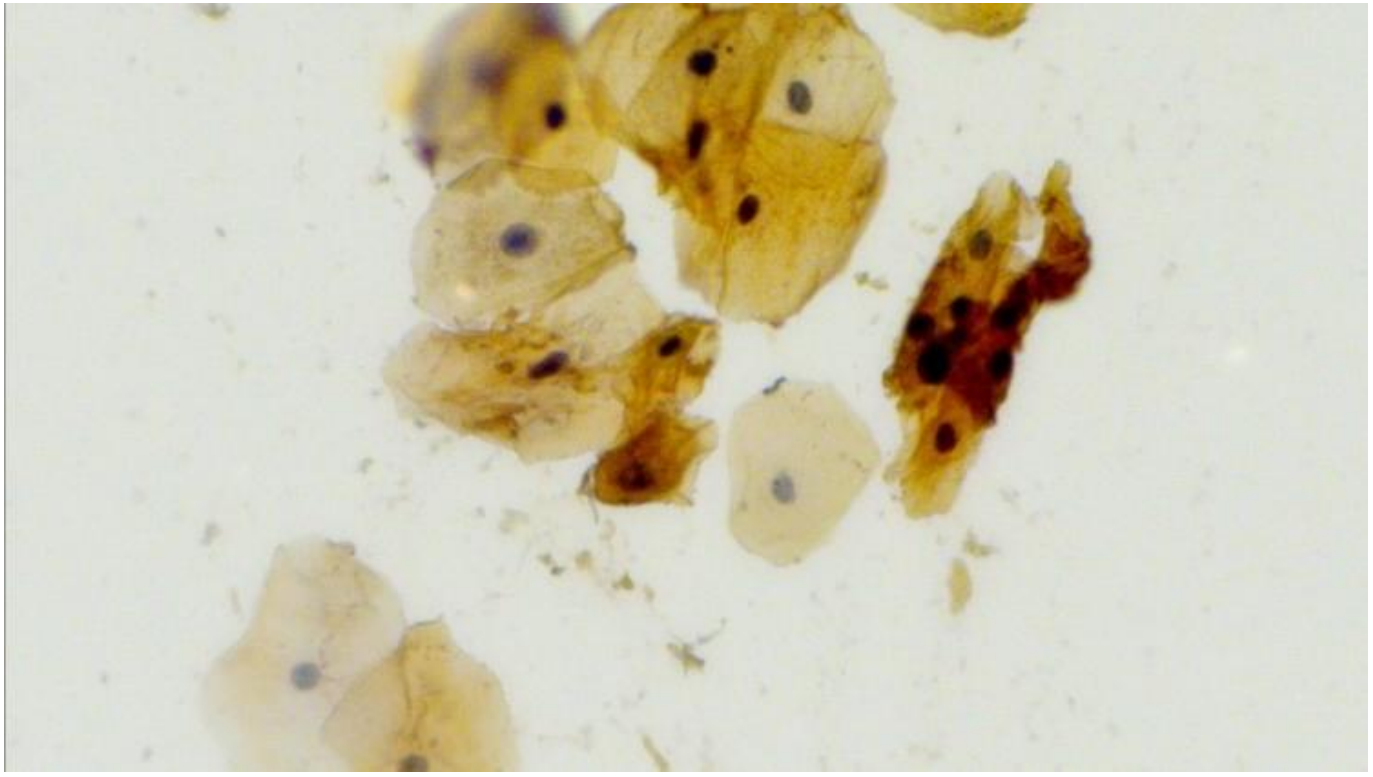


Гематоксилин Гилла II



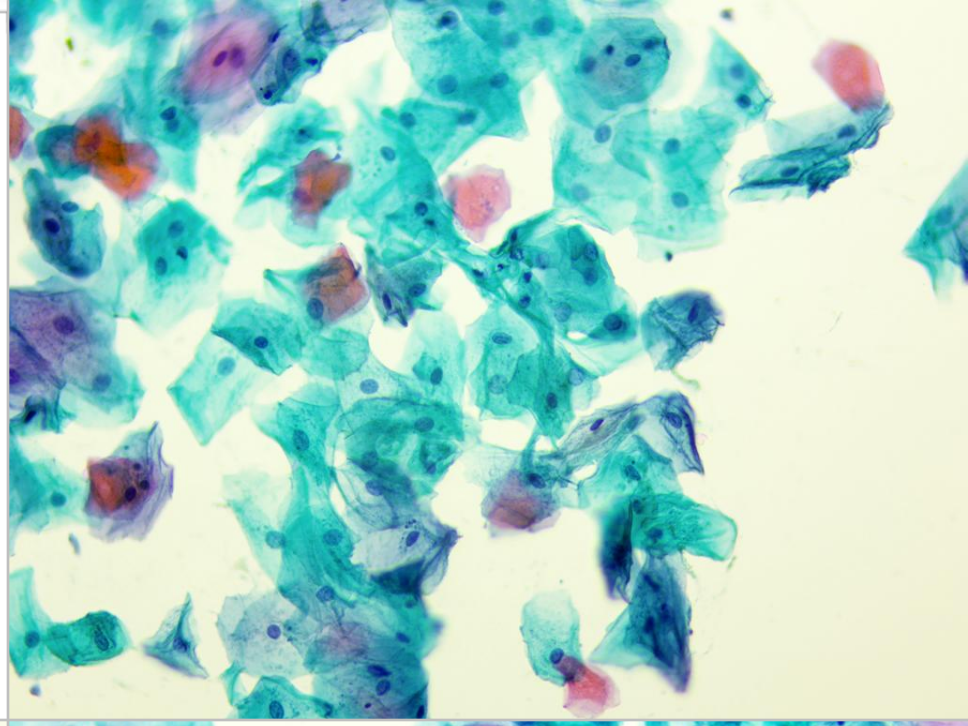
Полная окраска по Папаниколау, время выдержки в гематоксилине 2 минуты

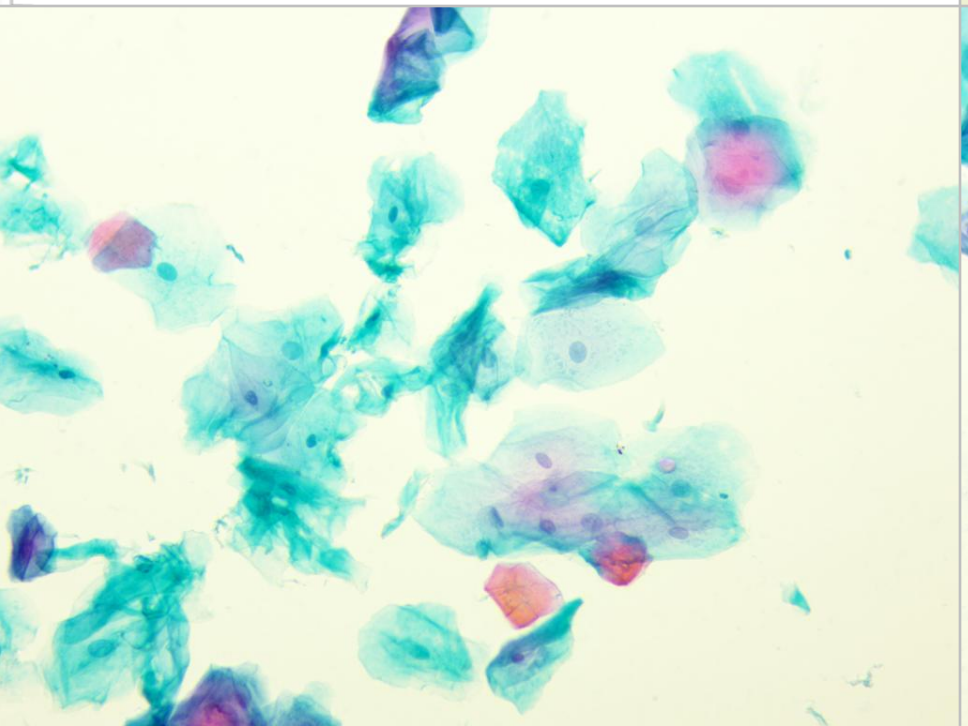
Вклад красителей в формирование цвета: окраска в OG

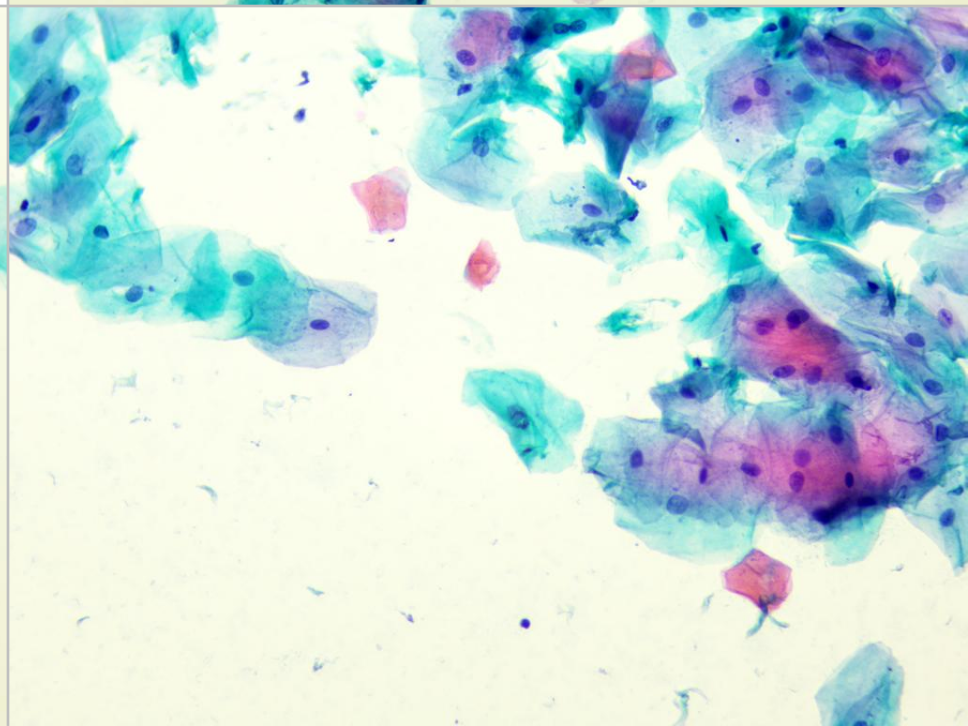


Краска OG быстро окрашивает цитоплазму всех клеток

При недостаточном окрашивании в OG, или чрезмерном вымывании красителя из клеток, чешуйки становятся двухцветными (в центре оранжевый по краям розовый) или розовыми полностью

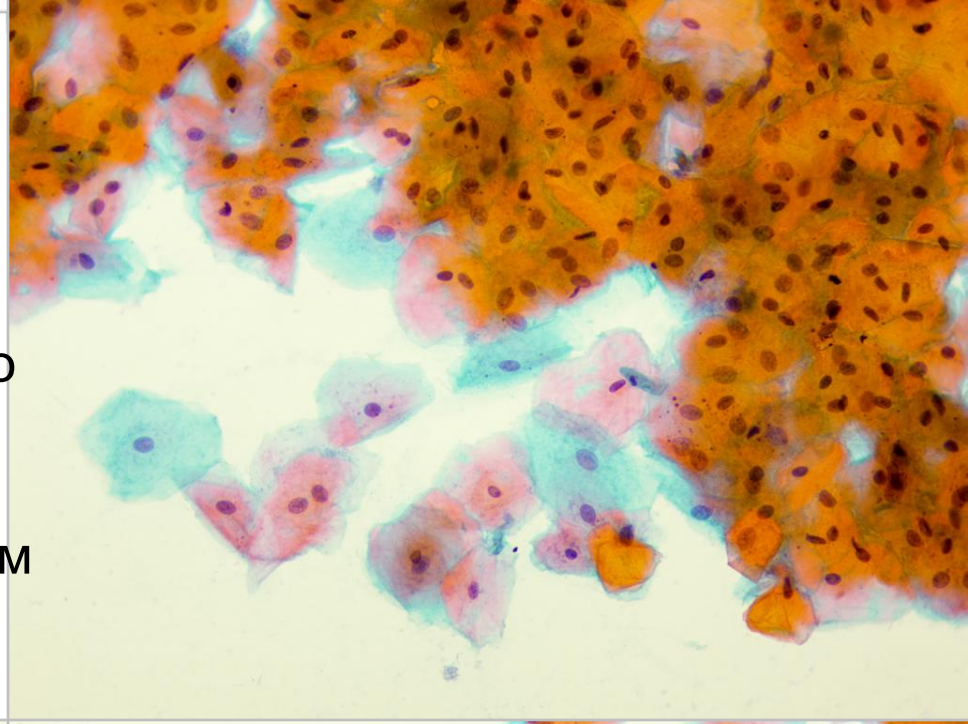


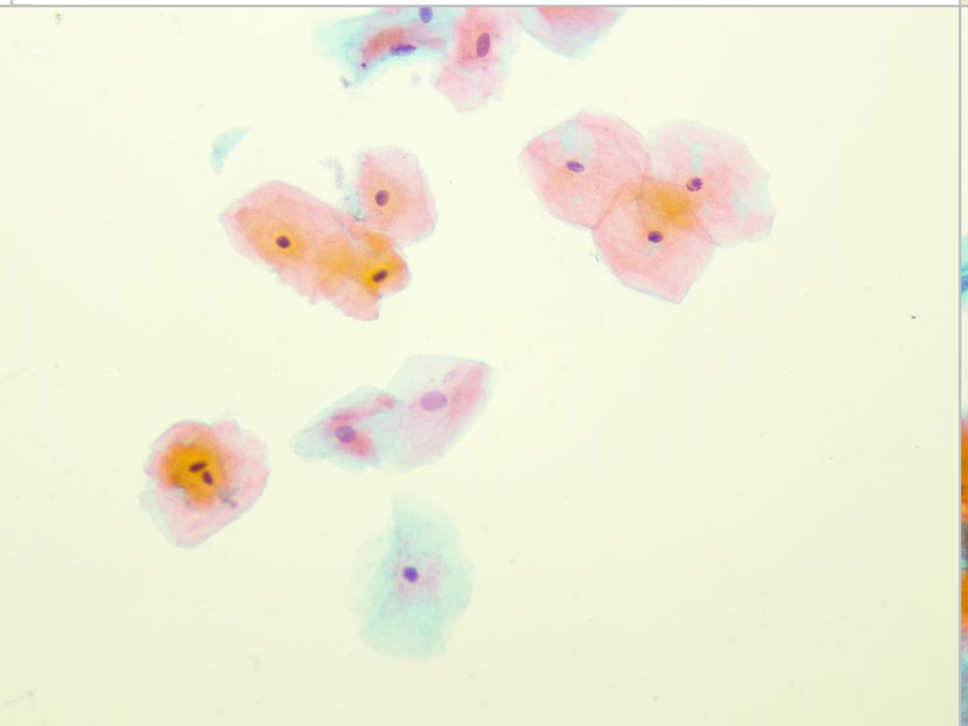


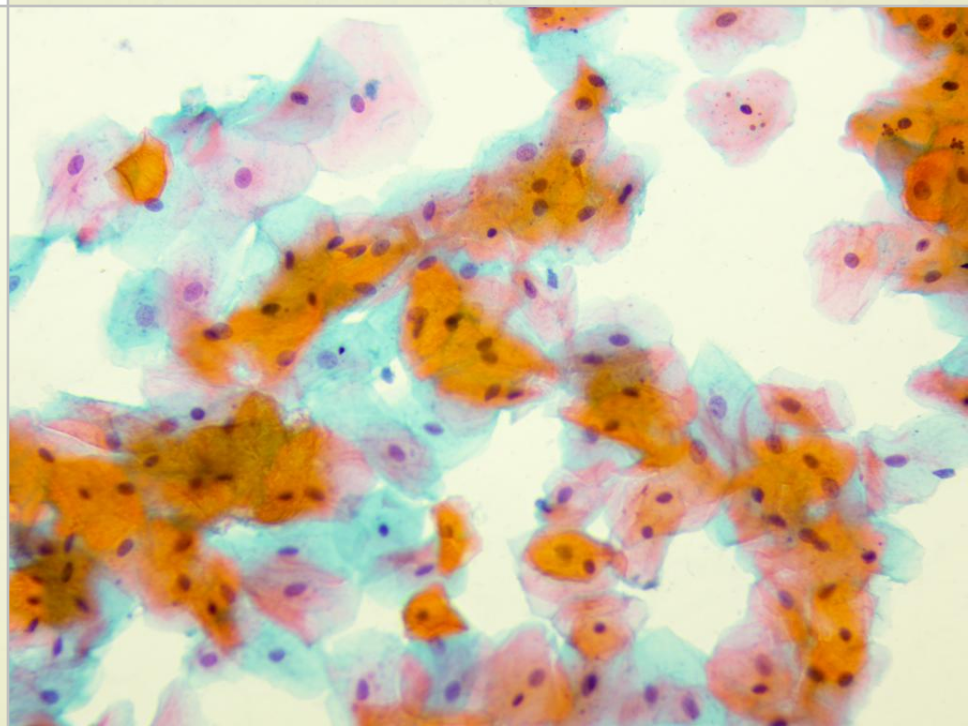


При перекрашивании в OG краситель оранжевый Ж:

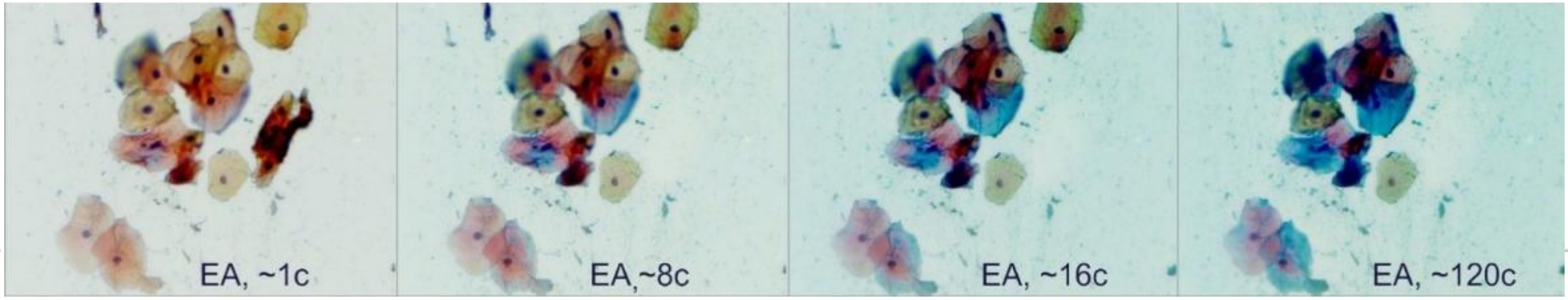
1. проникает в наслоения в больших количествах, наслоения ярко оранжевые,
2. закрашивает цитоплазму отдельно лежащих клеток и розовые клетки приобретают оранжевый оттенок. Часто клетки окрашены оранжевым в центре (вокруг ядра) и розово-оранжевым по краям







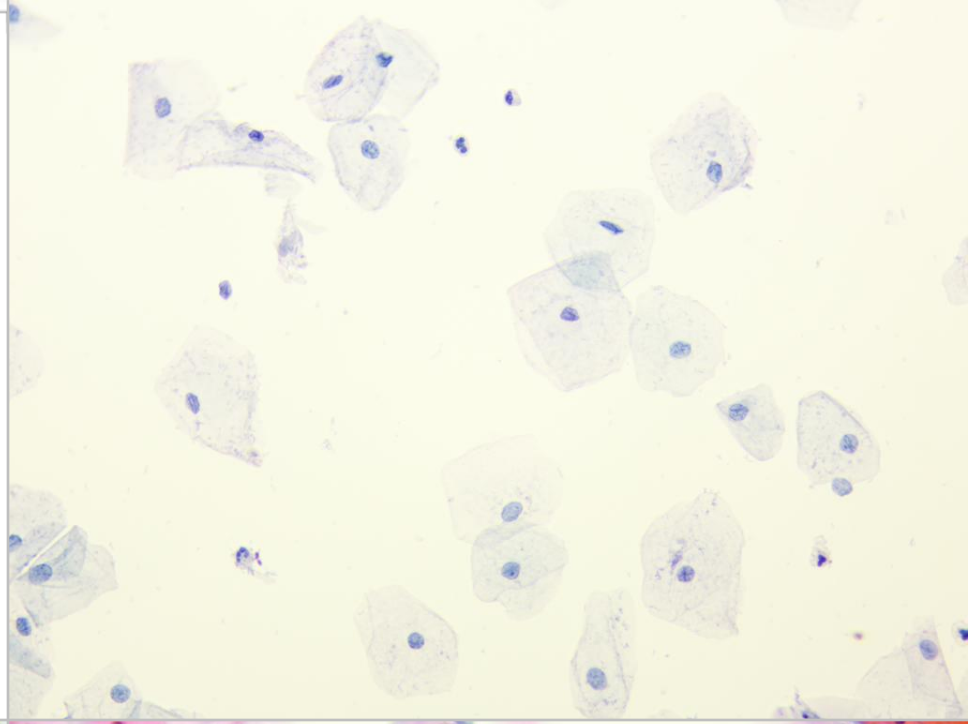
Вклад красителей в формирование цвета при окраске в ЕА

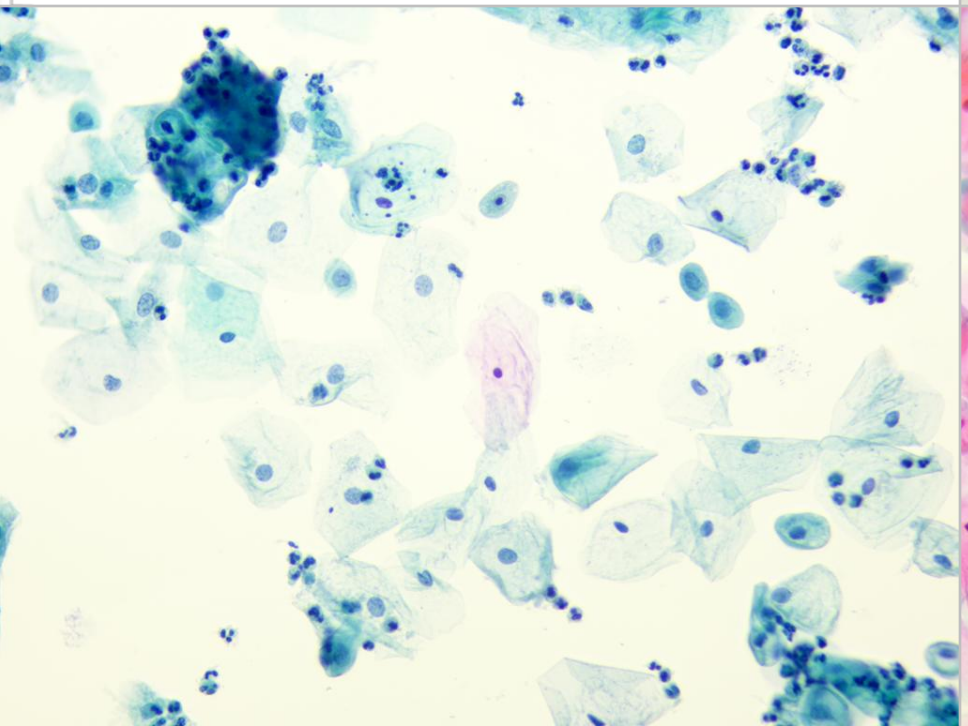


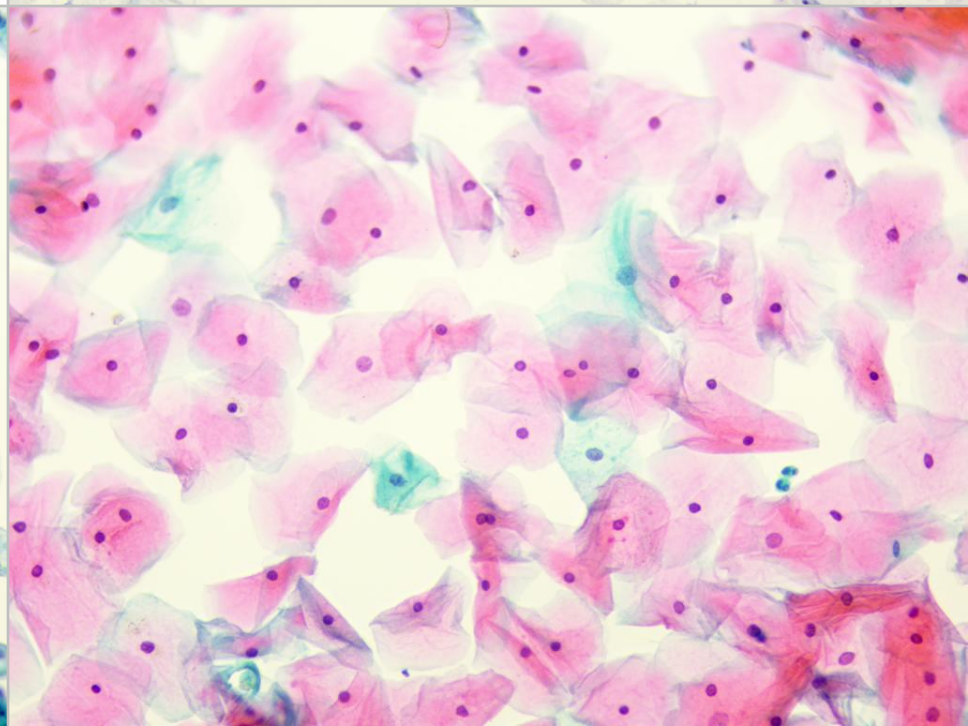
Быстрая окраска эозином цитоплазмы всех клеток (кроме кератинизированных) в розовый цвет, при последующей выдержке часть клеток окрашиваются зелёным красителем

При недостаточном окрашивании в ЕА клетки могут быть:

1. Бледными и окрашенными недифференцировано или в бледно-розовый, бледно-зеленый цвета.
2. Клетки могут приобретать оранжевый оттенок
3. Преобладают розовые клетки, много клеток с двойной окраской (не успели докраситься)

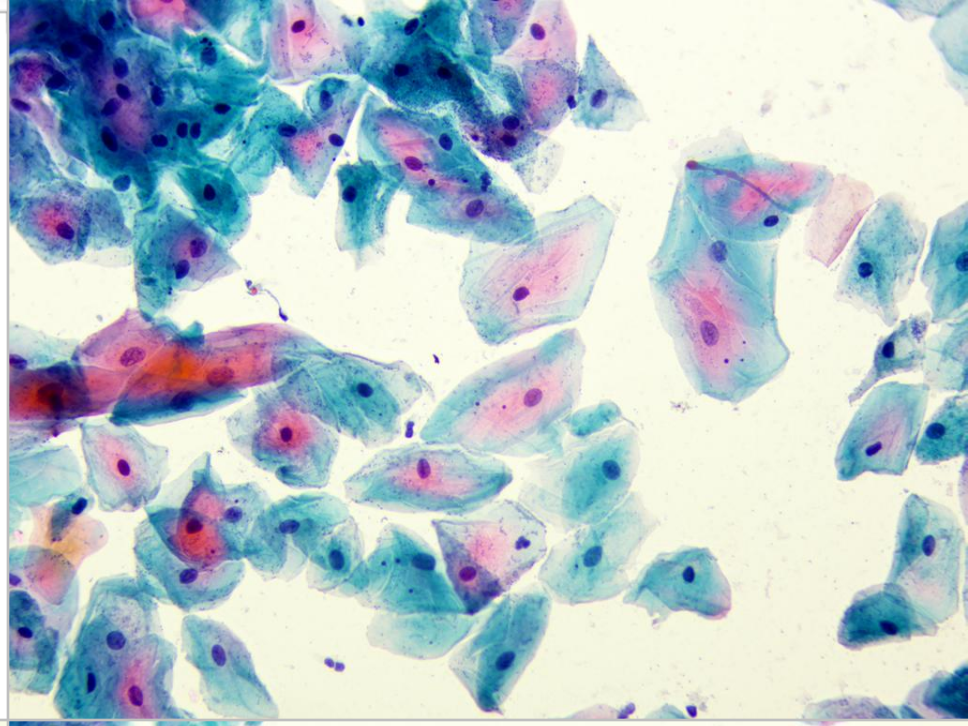


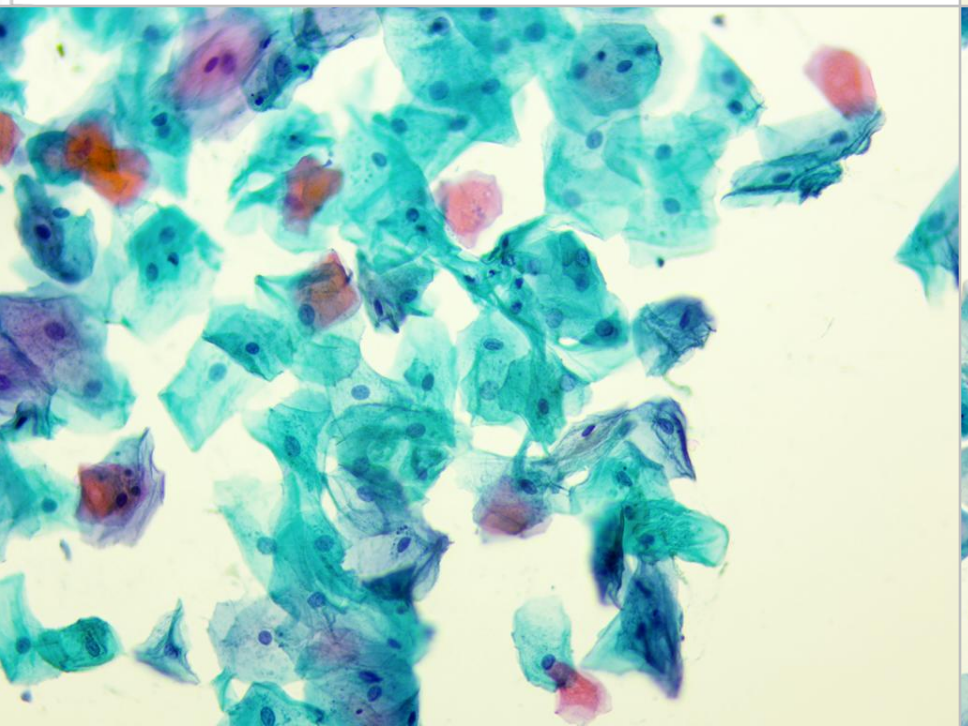


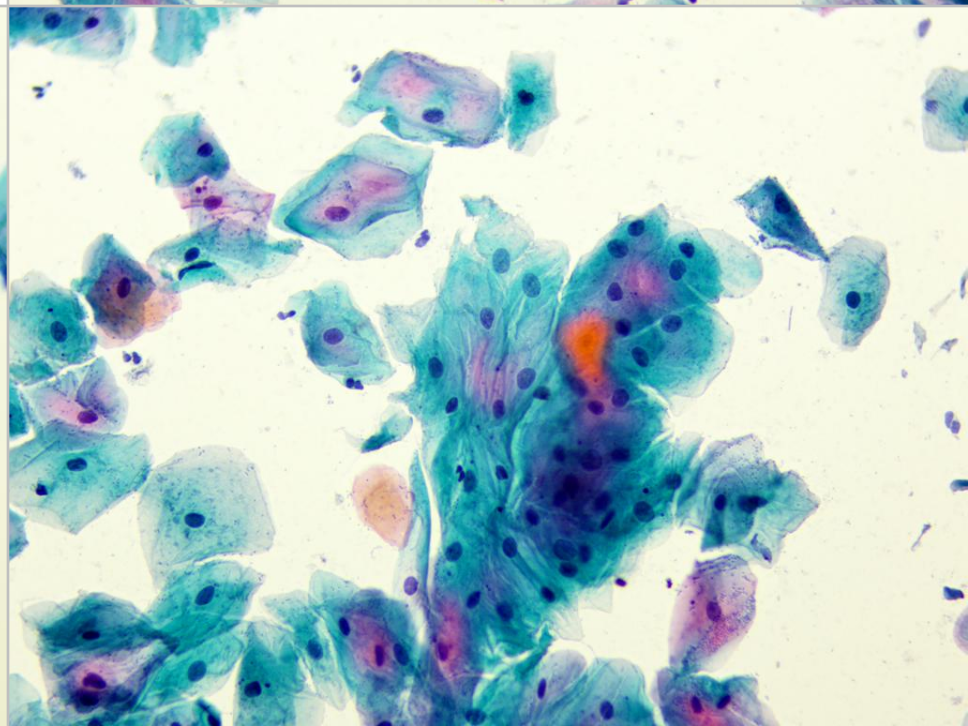


При перекрашивании в ЕА:

1. Большинство клеток зеленые, розовый имеет фиолетовый оттенок, чешуйки полностью розовые, либо розовые с оранжевым в центре
2. Много много клеток с двойной окраской – розовые в центре с зеленой каемкой, в наслоениях почти нет оранжевого





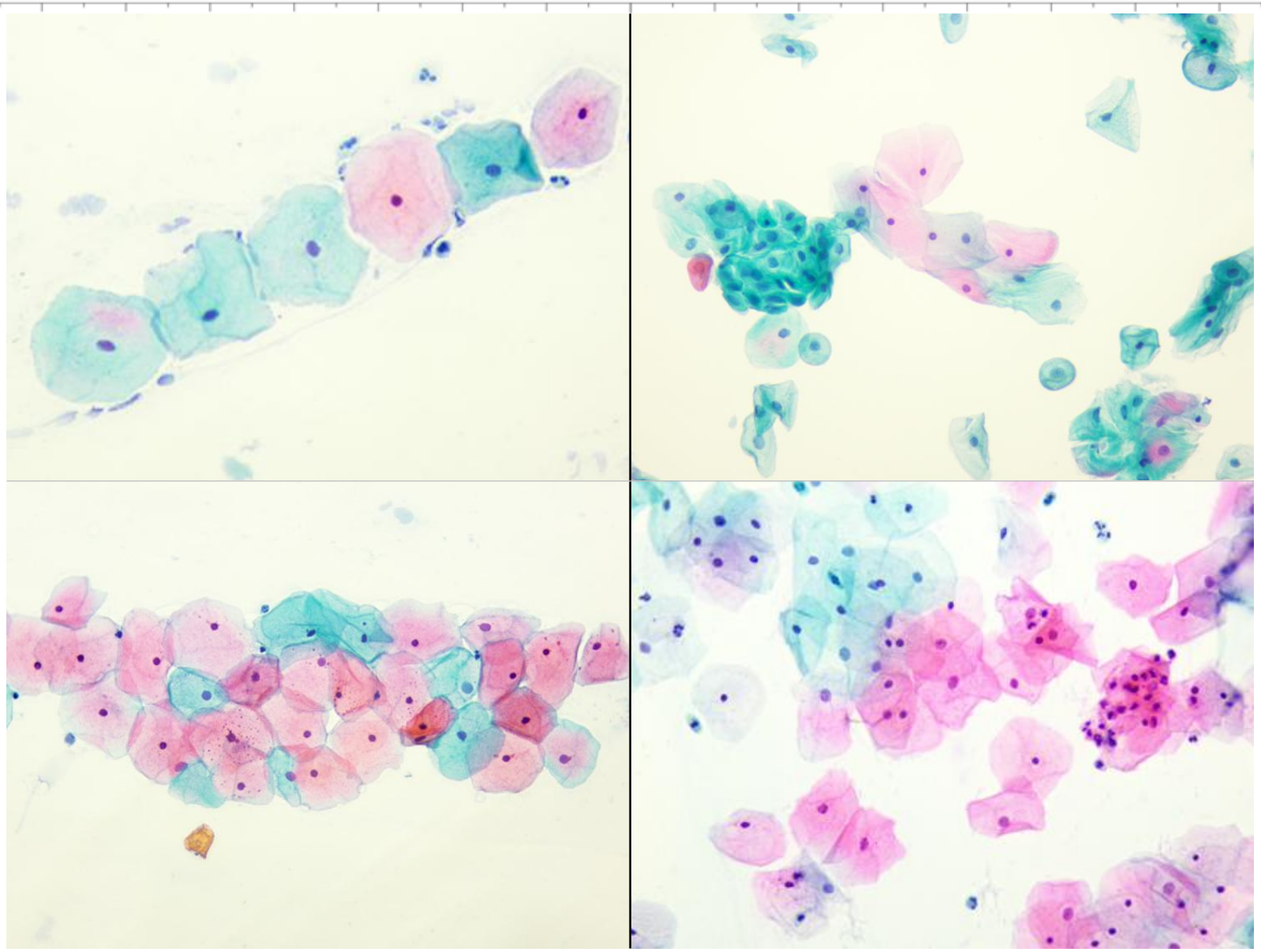


Окрашивание клинического материала

После подбора времени окраски на контрольных препаратах можно переходить к окрашиванию клинического материала. Следует учитывать, что может потребоваться корректировка времен.

Результат окрашивания препаратов, полученных от разных пациентов, может варьировать. Остановитесь на временах, при которых окраска большинства препаратов удовлетворительная.

Для разных типов препаратов необходимо подобрать свои времена окраски.



Традиционный мазок (ТМ)
Г 2 мин, OG 15 с, EA 3 мин

Жидкостная цитология (ЖЦ)
Г 4 мин, OG 15 с, EA 8 мин

Для каждого типа препаратов – свои времена окраски

Характеристики реагентов. Ресурс реагентов

После оценки качества окраски и подбора оптимальных времен окрашивания необходимо определить ресурс реагентов

Ресурс краски – число стекол, которое может быть окрашено данным объемом краски, до того как станет заметным ухудшение качества окрашивания.

Ресурс красок зависит от:

- концентрации красящих веществ и состава реагентов (летучесть реагентов);
- методики окрашивания (длительность окраски, количество и чистота промывочных растворов);
- условий хранения и эксплуатации (простой рабочих красок между окрашиваниями, температура в лаборатории, качество воды);
- типа окрашиваемого препарата (ТМ, состав консервирующей среды ЖЦ).

Рабочий ресурс краски

По литературным данным и по нашему опыту 1 мл каждой краски при окраске по Папаниколау может окрасить 1-2 стекла.

У реагентов, использующихся при окраске по Папаниколау, может быть разный ресурс, т.е. растворы необходимо будет менять в разное время.

Интервалы замены каждого раствора в каждой лаборатории устанавливаются эмпирическим путем.

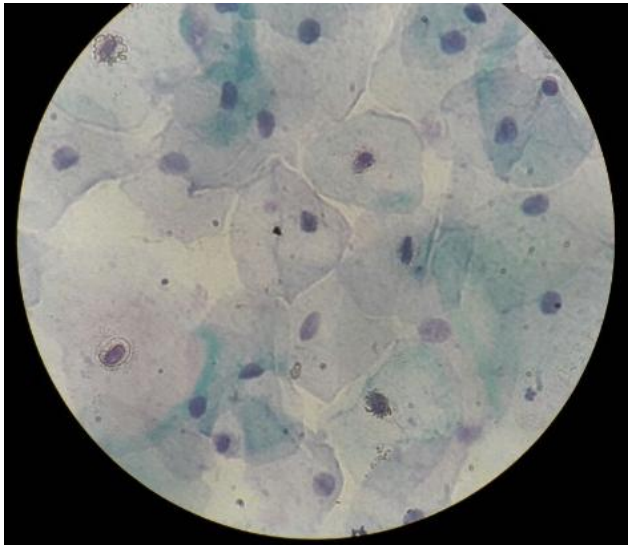
Внимательно следите за количеством окрашенных препаратов.

Перед работой окрасьте контрольные препараты, особенно если в работе был перерыв и рабочие растворы красок долго простаивали.

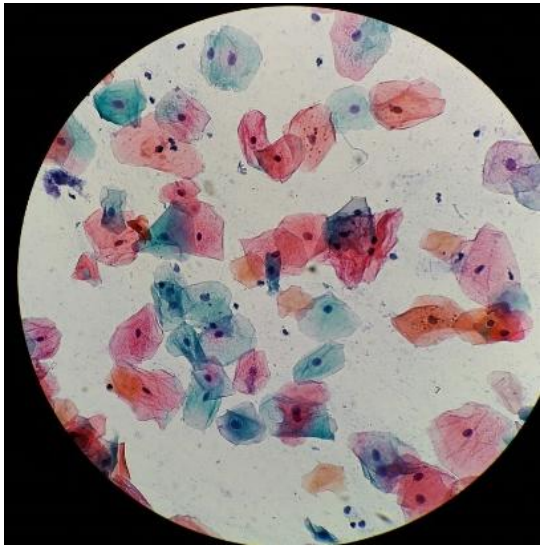
Не следует работать на красках «до последнего».
При неудовлетворительном окрашивании препаратов их придется перекрашивать или, в худшем случае, потребуется повторное взятие материала.

При неудовлетворительном качестве препарата увеличивается нагрузка на врача-цитолога.

Окрашивание контрольных препаратов позволит сохранить клинический материал, например, при возобновлении окраски после простоя рабочих растворов красок



Результат окрашивания клинического материала после длительного перерыва в работе



Результат окрашивания контрольного препарата после замены красок

Рекомендации по работе с красками

1. Минимизируйте испарение реагентов:
   - храните бутылки с реагентами герметично закрытыми;
   - в перерывах между окраской закрывайте емкости с рабочими растворами крышками;
   - соблюдайте температурный режим при окраске (при повышении температуры испарение ускоряется);
2. Уменьшите загрязнение реагентов:
   - используйте дистиллированную воду или 0,5% раствор уксусной кислоты перед гематоксилином;
   - используйте салфетку для удаления излишков реагентов;
   - следите за чистотой и уровнем промывочных растворов;
3. Следите за количеством окрашенных препаратов.
4. Полностью заменяйте краски, а не доливайте в старые краски свежие.

Промывочные растворы

В ходе окрашивания используется несколько емкостей со спиртом - изопропанолом или этанолом.

Длительность промывки зависит от используемого спирта (этанол быстрее вымывает цитоплазматические красители из клеток).

Промывку после окрашивания в краске ЕА лучше всего выполнять трехкратно, поочередно погружая стекла в каждую из трех ванн с промывочным раствором.

Спирт, предшествующий просветлителю, должен иметь самый высокий уровень и быть чистым (не загрязненным краской).

Растворы следует ротировать после появления окраски жидкости в 3-й ванне. При этом 3-я ванна перемещается на место 2-й, 2-я на место 1-й, а жидкость в 1-й ванне обновляется и перемещается на место 3-й.

Кратковременное дифференцирование в воде после краски ЕА позволит получить чистый фон препарата и снизить расход спирта.

Основные проблемы при окрашивании

Основные проблемы, возникающие при окрашивании, их возможные причины и способы решения представлены в таблице на слайдах 32-34.

Условные обозначения:

↑ - увеличить время выдержки в реагенте

↓ - уменьшить время выдержки в реагенте

Проблема	Возможные причины	Гематоксилин	OG	EA	Дифференцирование	Промывка
Ядра бледные	Недостаточное время окрашивания	↑				
	Ресурс гематоксилина израсходован	Заменить				
Ядра темные	Перекрашивание в гематоксилине	↓				
	Концентрированный гематоксилин	Замените на другой тип				
	Перекрашивание в EA			↓		
Цитоплазма синяя	Пленка от фиксатора-спрея плохо смыта в воде					↑
	Перекрашивание в гематоксилине	↓				
	Концентрированный гематоксилин	Замените на другой тип				
	Недостаточное время окрашивания в EA			↑		
	Особенности конкретной краски EA			Замените на другую		

Проблема	Возможные причины	Гематоксилин	OG	EA	Дифференцирование	Промывка
Нет оранжевого	Недостаточное время окрашивания в OG		↑			
	Ресурс OG израсходован		Заменить			
	Перекрашивание в EA			↓		
	Длительное дифференцирование				↓	
	Длительная промывка в спирте после OG					↓
Много оранжевого	Перекрашивание в OG		↓			
	Недостаточное время окрашивания в EA			↑		
	Недостаточная промывка в спирте после OG					↑

Проблема	Возможные причины	Гематоксилин	OG	EA	Дифференцирование	Промывка
Цитоплазма окрашена бледно	Недостаточное время окрашивания в EA			↑		
	Ресурс EA израсходован			Замените		
	Длительное дифференцирование				↓	
	Длительная промывка в спирте					↓
Мало зеленого	Недостаточное время окрашивания в EA			↑		
	Ресурс EA израсходован			Замените		
Мало розового	Перекрашивание в EA			↓		
	Ресурс EA израсходован			Замените		

Артефакты

Артефакт - от латинского *artefactum* - искусственно сделанное.

В случае микроскопии артефакт это участок изображения, не связанный с естественным строением исследуемого объекта, возникший при пробоподготовке, либо в результате других неучтённых, возможно, случайных, факторов.

Артефакты могут затруднять просмотр препарата и постановку диагноза.

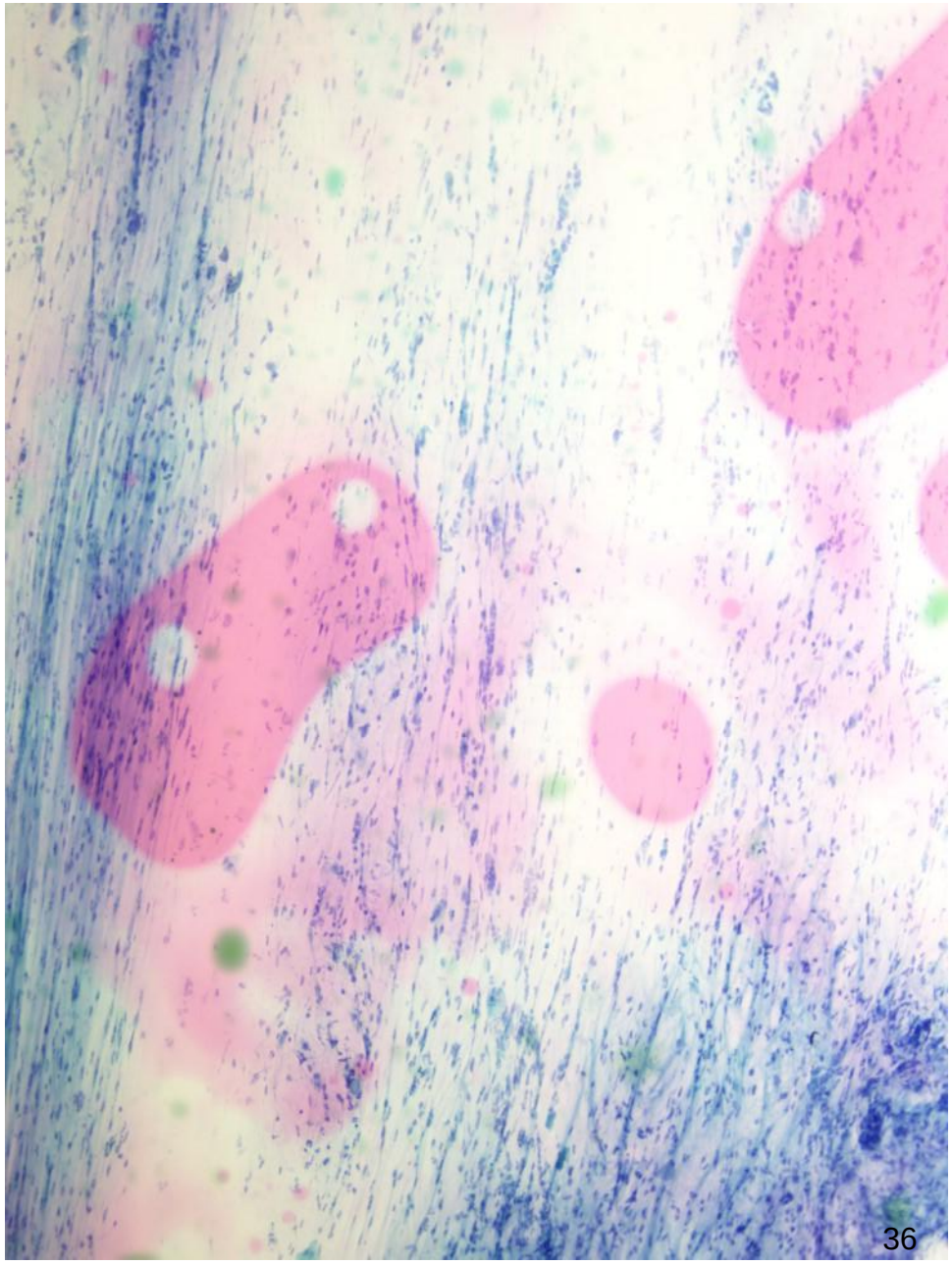
К артефактам, в частности, можно отнести:

- капли воды;
- капли краски;
- пузыри воздуха;
- коричневые артефакты или «кукурузные хлопья».

Капли воды

Возникают из-за недостаточной дегидратации препарата в спиртах после дифференцирования в воде, вследствие чего вода попадает в просветлитель. Такой просветлитель вымывает красители из цитоплазмы, а капли воды попадают под покровное стекло.

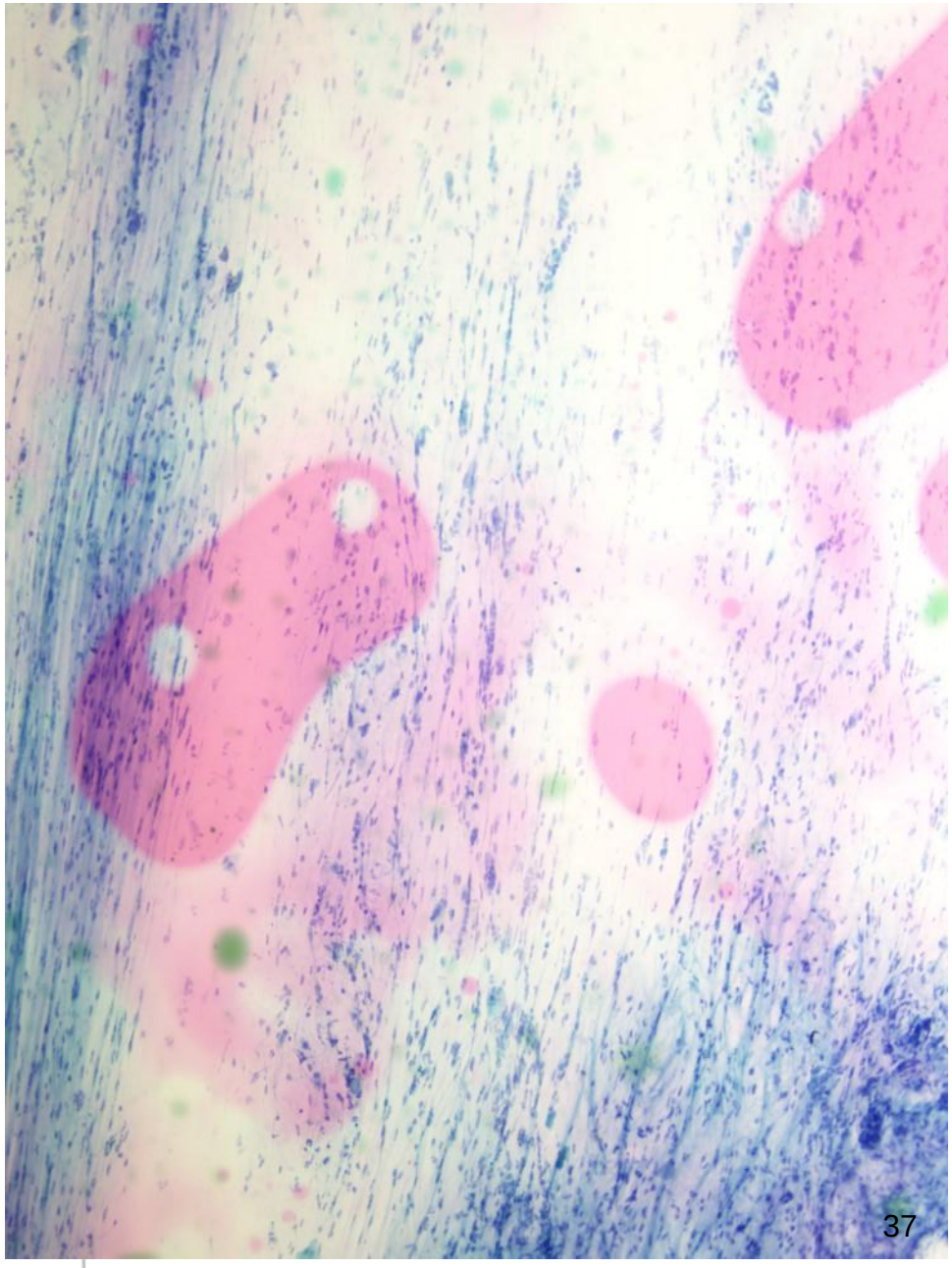
Ксилол, загрязненный водой



Капли воды

Микропрепараты содержащие капли воды, нестабильны и недолговечны. С них следует снять покровные стекла, повторно провести через ксилол и спирты, просветлить.

Для предотвращения попадания воды в просветлитель во время окрашивания следите за чистотой и уровнем промывочных растворов. Спирт, предшествующий просветлителю, должен иметь самый высокий уровень.

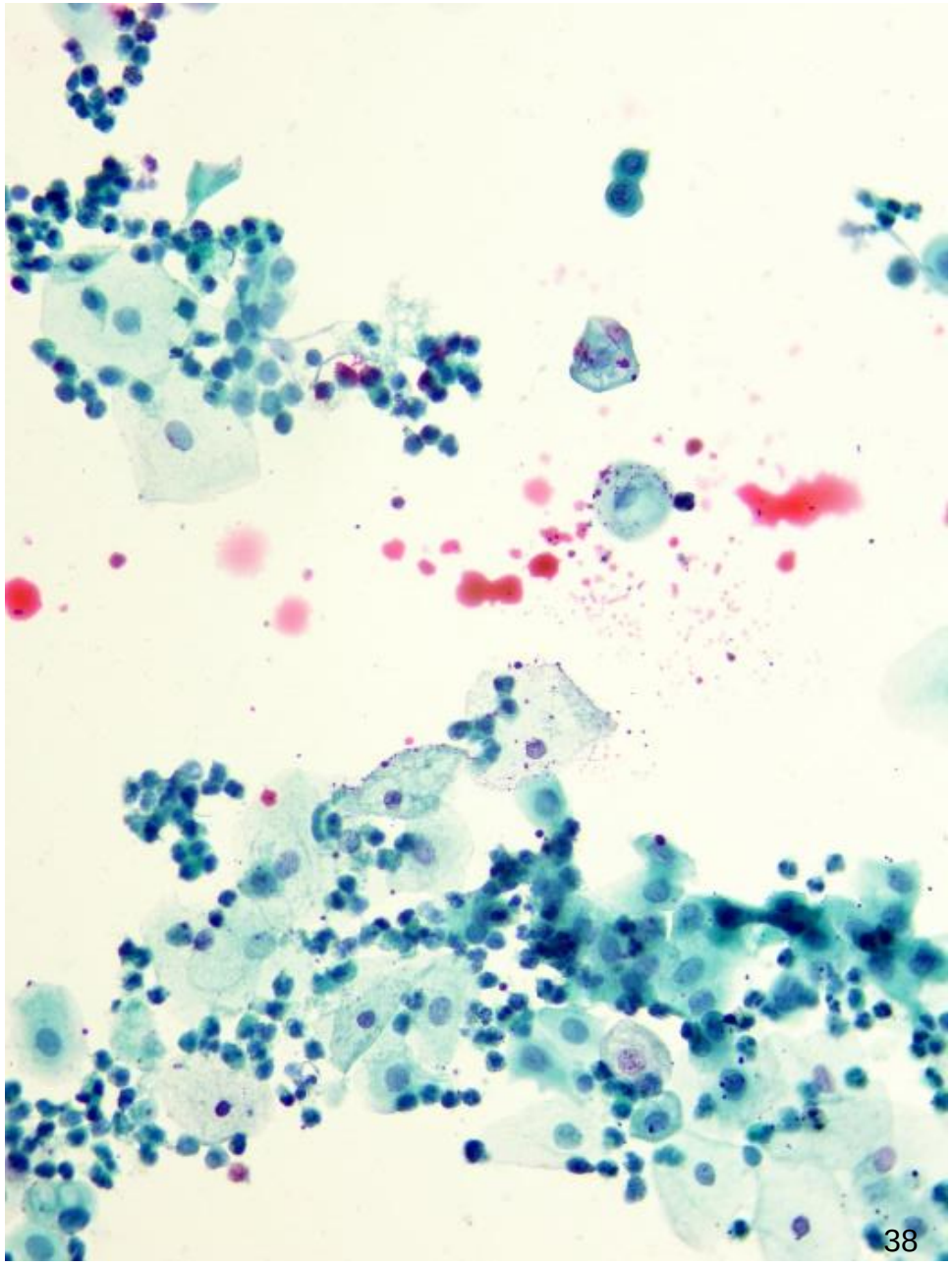


Капли краски

Капли краски обычно находятся ближе к верхнему краю (зоне маркировки) препарата.

Возникают из-за недостаточной промывки после краски ЕА в воде и спиртах. От капель воды отличаются интенсивностью окраски.

Спирт, предшествующий просветлителю, должен иметь самый высокий уровень.



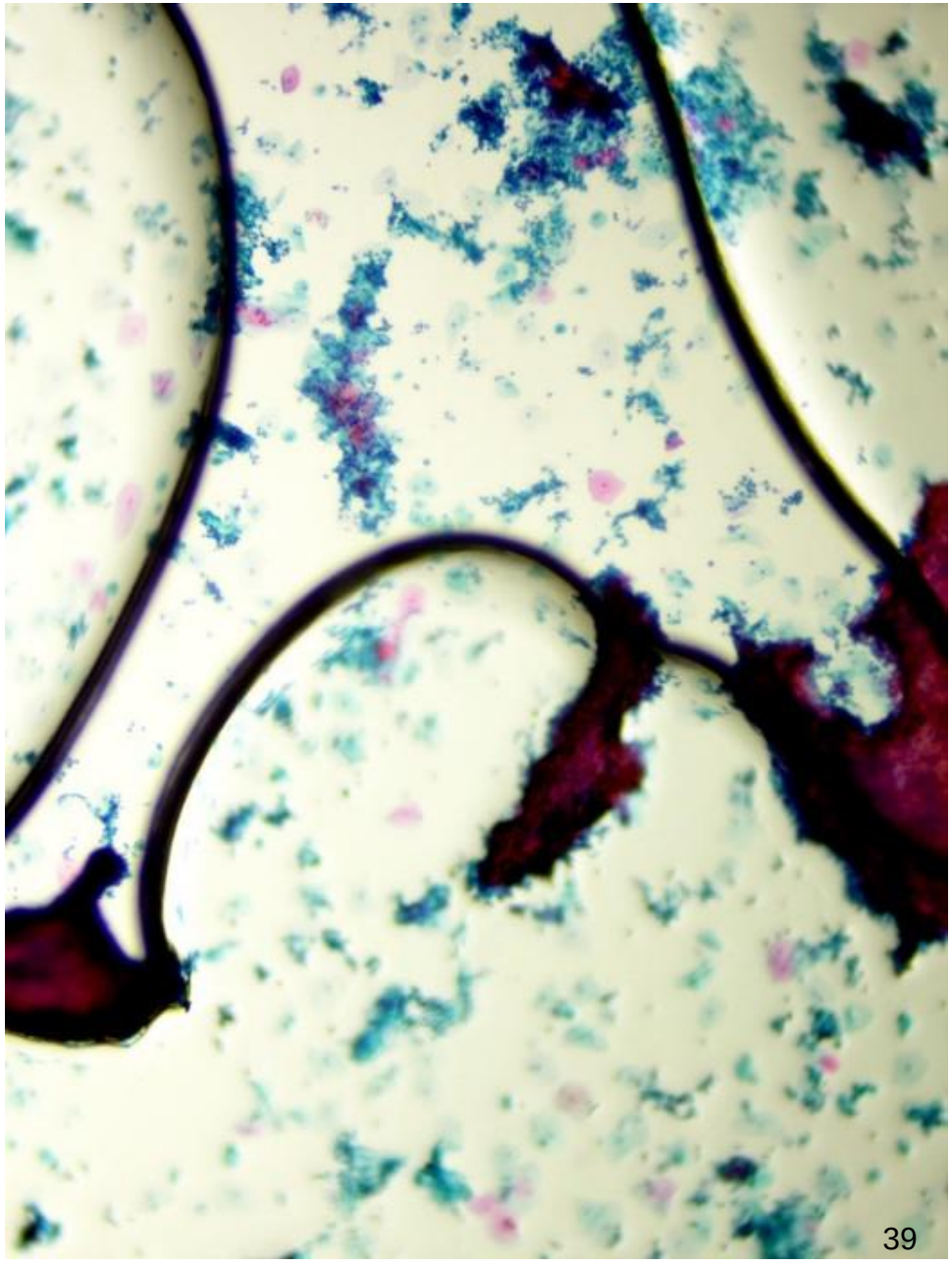
Пузыри воздуха

Отхождение покровного стекла может затруднить просмотр препарата, т.к. качество изображения ухудшается.

Могут «отклеиваться» значительные участки покровного стекла.

Основные причины возникновения:

- заключение препарата с использованием недостаточного количества бальзама;
- слишком толстый препарат;
- заключение высохшего препарата.



При отхождении больших участков покровного стекла можно повторно заключить препарат

1. **Снимите покровное стекло одним из следующих способов:**

- Удерживая стекло под наклоном, покрытой стороной вниз, погрузите его в сосуд с ксилолом. Вымачивайте его до тех пор, пока от него не отделится и не отпадет покровное стекло (на это может потребоваться несколько часов).
- Кратковременно разогрейте стекло, поместив его на разогретую до 120°С плитку, покрытую фольгой, в результате чего заключающая среда практически сразу станет мягкой. Снимите покровное стекло пинцетом и погрузите остывшее стекло в ксилол.
- Положите стекло на металлическую пластину для стекол и на непродолжительное время оставьте в морозильнике.
- В результате охлаждения покровное стекло «отскочит» от стекла.

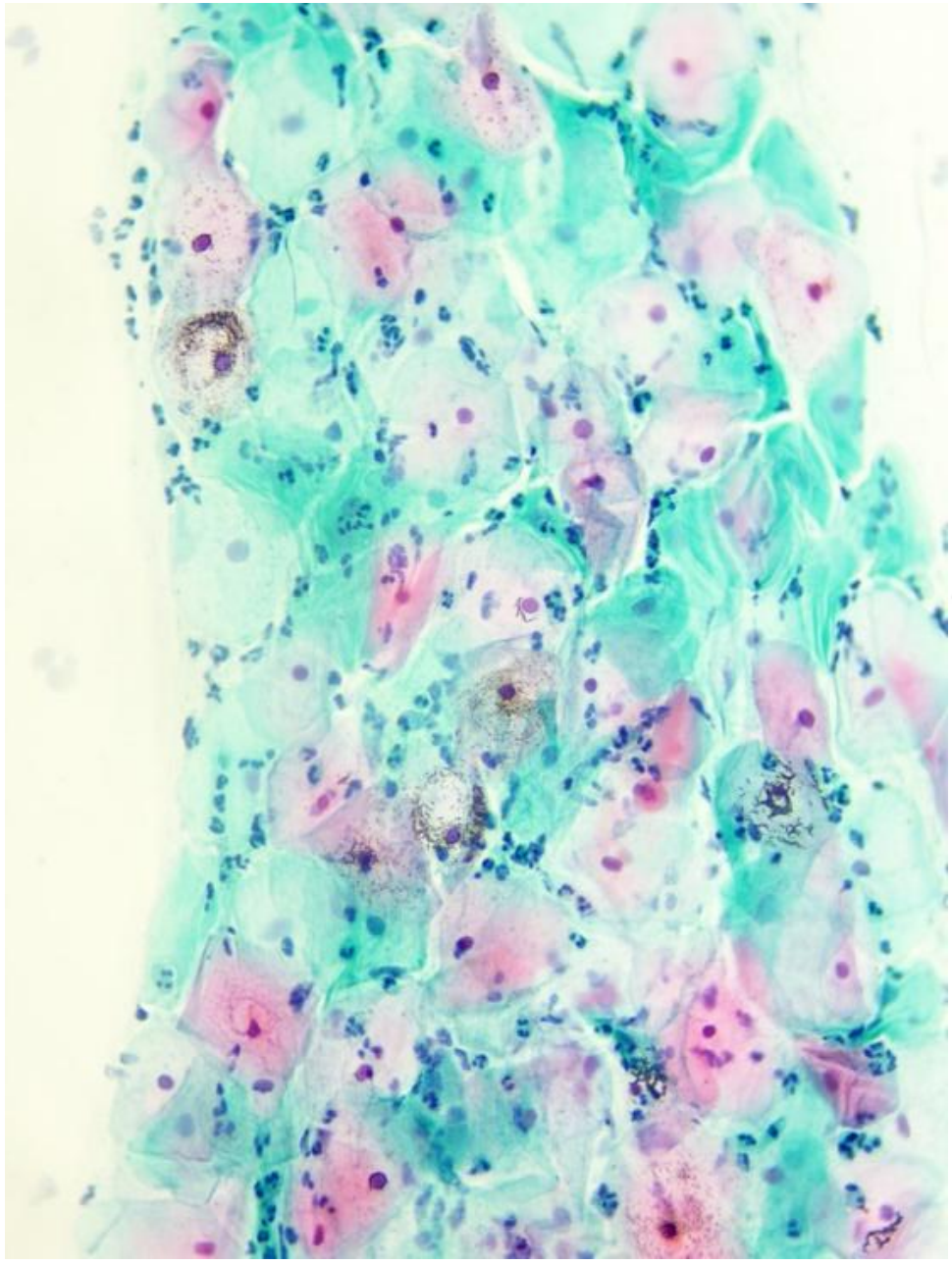
2. **Промойте препарат в растворе ксилола**, чтобы удалить заключающую среду (3 ванны, по 10 погружений в каждую)
3. **Заключите влажный препарат.**

Коричневые артефакты или «кукурузные хлопья»

Т.н. коричневые артефакты чаще возникают в препаратах с традиционным мазком.

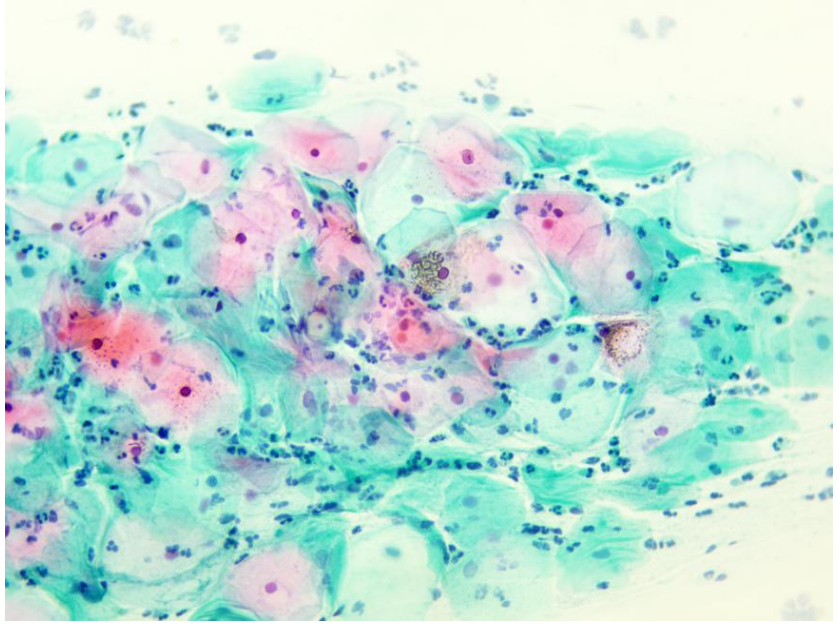
Основная причина возникновения этого типа артефактов, по-видимому, связана с высыханием препарата перед просветлением и заключением под покровное стекло.

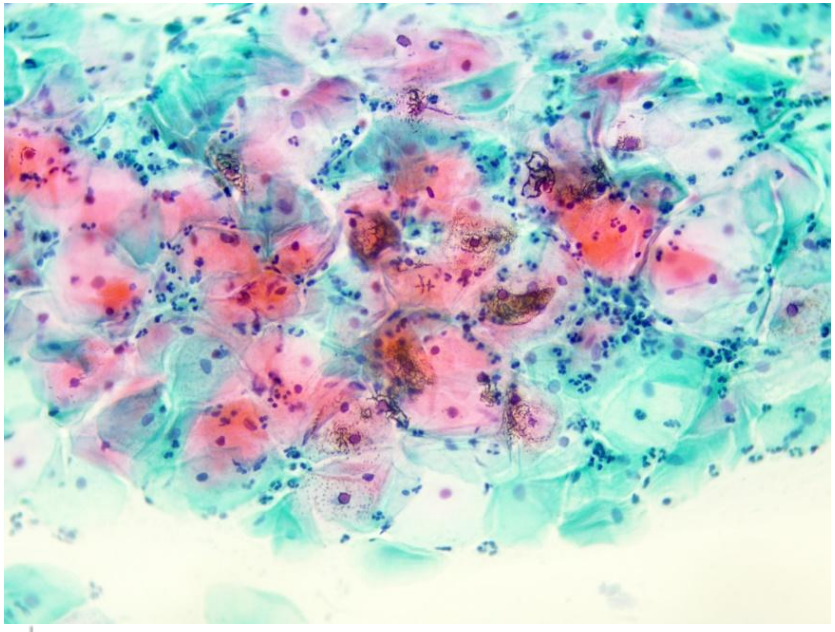
(В этом случае возможно перераспределение по поверхности препарата веществ, которые были растворены в спирте и ксилоле.)



Коричневые артефакты или «кукурузные хлопья»

Единичные артефакты практически не заметны, однако при большом их количестве, создаются помехи при просмотре препарата, могут перекрываться значительные области, в которых могут находиться атипичные клетки.





Для предотвращения появления коричневых артефактов не допускайте высыхания стекол

При выполнении методики ограничьте время нахождения препарата на воздухе (время между погружениями стекла в реагенты должно быть не более 10 секунд).

Сохраняйте препараты влажными (не вынимайте из просветлителя) до тех пор, пока они не будут готовы к заключению.

Используйте заменитель ксилола, т.к. он медленнее испаряется с поверхности препаратов.

Выводы

Приступая к работе с набором реагентов необходимо понять как красит каждая краска, сколько времени необходимо окрашивать для получения качественного результата и какой у красок ресурс.

Окрашивание комбинированных буккальных мазков позволяет подобрать оптимальные режимы окраски и сохранить клинический материал от некачественной окраски.

Понимание принципов формирования цвета при окрашивании по Папаниколау дает возможность получить стабильные качественные результаты окраски независимо от того, реагенты какого производителя используются в вашей лаборатории.

Соблюдение рекомендаций по работе с красками и отслеживание количества окрашенных препаратов позволит избежать некачественного окрашивания и сохранить клинический материал.

Артефакты, которые могут возникнуть при окрашивании, затрудняют просмотр и интерпретацию, могут негативно повлиять на сохранность препаратов. Предотвратить их появление легче, чем устранить с готового препарата.

В презентации использованы материалы из следующих источников:

1. **Клиническая цитология. Теория и практика цитотехнологии/** Г.У. Гилл; пер. с англ. Под ред. А.В. Безрукова, К.Т. Касоян. - М.: Практическая медицина 2015 г. ISBN 978-5-98811-345-4, 978-1-4614-4932-4.
2. **Схема методики окраски по Папаниколау, модификация «ПАП-ДИФФ»** https://www.papanicolaou.ru/shema-metodiki-okraski-po-papanikolau-modifikaciya-pap-diff
3. **К вопросу о формировании цвета цитоплазмы клеток в процессе окраски по Папаниколау** А.В. Безруков, М.В. Кузнецов, ООО ЭМКО (Москва) https://www.papanicolaou.ru/methodics/k-voprosu-o-formirovanii-cveta#blog_body
4. **GP15-A3** Vol. 28 No. 28 **Cervicovaginal Cytology Based on the Papanicolaou Technique; Approved Guideline**—Third Edition (Clinical and Laboratory Standards Institute) https://clsi.org/media/1383/gp15a3_sample.pdf

Набор реагентов «МЛТ-ПАП-ДИФФ» для окраски по Папаниколау

ТУ 21.20.23-001-23475651-2017, РУ на медицинское изделие № РЗН 2018/7102 от 28.04.2018 г.

Набор реагентов содержит все необходимое для окраски по Папаниколау: фиксатор-спрей, краски Гематоксилин, OG и EA, раствор для дегидратации, просветлитель (заменитель ксилола), заключающую среду.

При производстве применяется многостадийный контроль качества, в том числе – конечная проверка на комбинированных буккальных препаратах. Реагенты длительное время тестировались в ведущих клиниках России.

Спасибо за внимание!

Дополнительную информацию можно найти на наших сайтах:

stainer.ru, fastainer.com, papanicolaou.ru;

на сайте АКЦР: ruscytology.ru

Контактная информация:

E-mail: 1206293@mail.ru
k.snihovskaya@gmail.com
5547638@bk.ru
Телефон: (495) 287-81-00