



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Využití statistických metod ve skríninkové gynekologické cytologii

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: ZDRAVOTNÍ LABORANT

Autor: Pavlína Múllerová

Vedoucí práce: MUDr. Ondrej Ondič, PhD., FIAC

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Využití statistických metod ve skríninkové gynekologické cytologii“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Pavλίna Müllerová

Poděkování

Mé poděkování patří MUDr. Ondreji Ondiči, PhD., FIAC za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Zároveň také děkuji firmě Bioptická laboratoř a.s. za poskytnutí dat.

Využití statistických metod ve skríninkové gynekologické cytologii

Abstrakt:

Cílem mé práce je identifikace statisticky významných odchylek v kvalitě gynekologického skríninku z hlediska jednotlivé laborantky i celé laboratoře v průběhu kalendářního roku. Jako testovaný subjekt je posuzována má vlastní práce cytotechnologa v roce 2017. V cytologické části Bioptické laboratoře v Plzni se využívá jako jeden z kontrolních mechanismů náhodný reskrínink negativních preparátů a tímto způsobem se snižuje počet falešně negativních nálezů.

Předpokladem je možnost zvýšení kvality práce na základě statistického vyhodnocení údajů získaných z firemní databáze a další využití těchto dat pro vnitřní kontrolu laboratoře. Je možné se domnívat, že v chybovosti gynekologického skríninku nebudou nalezeny statisticky významné rozdíly v rámci jednotlivých měsíců, údaje jednotlivé laborantky mohou vykazovat rozdíly a ty se snažím v práci identifikovat.

V teoretické části je popsána problematika výskytu karcinomu děložního hrdla a možností laboratorních vyšetření, které jsou v Bioptické laboratoři k dispozici – klasické cytologické vyšetření, vyšetření LBC – liquid based cytology, testování HPV atd.

V experimentální části je popsán metodický postup při vyšetřování cytologických preparátů – mikroskopické hodnocení a zároveň jsou použity informace z firemní databáze, které jsou porovnávány a statisticky hodnoceny.

Zjištěné statistické údaje budou poskytnuty vedení Bioptické laboratoře pro účely zlepšení kvality gynekologického skríninku v běžném provozu.

Klíčová slova: cytologický skrínink, karcinom děložního hrdla kvalita laboratoře, reskrínink, statistické hodnocení

Use of statistical methods in gynecologic PAP smear screening

Abstrakt:

The aim of my work is to identify statistically significant deviations in the quality of gynecological screening performed by individual cytotechnician and the whole laboratory during the calendar year. My own work as a cytotechnician in 2017 is considered as a tested subject. A random rescreening of negative slides has been introduced as one form of control mechanisms in PAP smear screening at Bioptic Laboratory in Pilsen. In this way the number of false negative findings is reduced.

The results may be used to further increase quality of the screening based on statistical evaluation of data obtained from the company database. It is possible to assume that the error rate of gynecological screening will not be found to be significantly different within individual months. Data of individual cytotechnicians may show differences and I try to identify them in my work.

The theoretical part describes the issue of the occurrence of cervical cancer and the possibilities of laboratory examinations, which are available in the Bioptic Laboratory - classical cytology, LBC - liquid based cytology, HPV testing, etc.

The experimental part describes the methodological procedure for the examination of cytological preparations - microscopic evaluation and at the same time the information from the company database are used, which are compared and statistically evaluated.

The statistical data will be provided to the management of the Bioptic Laboratory for the purpose of improving the quality of routine gynecological screening.

Keywords: cervical cancer, cytological screening, laboratory quality, rescreening, statistical evaluation

Obsah

Obsah	6
1. Úvod.....	8
1.1. Současná epidemiologická situace	8
1.2. Skríninkové programy.....	9
2. Teoretická část	10
2.1. Definice oboru cytologie.....	10
2.2. Gynekologická cytologie	10
2.2.1. Liquid based cytology	10
2.2.2. Zpracování a hodnocení liquid based cytology.....	11
2.2.3. Výhoda LBC oproti klasické metodě stěru	11
2.2.4. Nevýhoda LBC	12
2.3. Vyšetření HPV	13
2.3.1. Vznik a vývoj infekce.....	13
2.3.2. Vyšetření HPV v Bioptické laboratoři	13
2.3.3. Klasifikace HPV typů.....	15
2.3.4. Karcinogeneze HPV	16
2.3.5. Prevence	16
2.3.5.1. Primární prevence	16
2.3.5.2. Sekundární prevence.....	17
2.3.5.3. Terciální prevence.....	17
2.4. Historie.....	17
2.5. Současnost.....	18
3. Experimentální část.....	19
3.1. Vlastní cíle	19
3.2. Hypotéza	19
3.3. Preanalytická část mimo laboratorní: odběry a fixace vzorků	20
3.4. Preanalytická část laboratorní:	20
3.4.1. Barvení cytologických preparátů v Bioptické laboratoři.....	20
3.5. Kontrola kvality laboratoře	21
3.5.1. Interní kontroly kvality (IQC)	21
3.5.2. Externí systémy zajištění kvality (External quality assurance systems)	22
3.6. Ověřování kvality Bioptické laboratoře Plzeň	22

3.7. Metodika – optická mikroskopie.....	23
3.8. Hodnocení	24
3.8.1. Hodnocení v cytopatologii	25
3.8.2. Hodnocení preparátů cytotechnologem.....	27
3.8.2.1. Hodnocení jádra.....	28
3.8.2.2. Hodnocení cytoplazmy	28
3.8.2.3. Hodnocení benigních změn	29
3.8.2.4. Hodnocení hormonální cytologie.....	30
3.8.2.5. Hodnocení endometriálních buněk	32
3.8.2.6. Menstruační cyklus	32
3.8.2.7. Hodnocení zánětlivých změn.....	33
3.8.2.8. Nedostatek vitamínů – kyseliny listové a vitamínu B12	36
3.9. Práce cytotechnologa	37
3.9.1. Matematické hodnocení práce testovaného subjektu v roce 2017	38
3.9.1.1. Nález atypických dlaždicových buněk – ASCUS.....	43
3.9.1.2. Nález LSIL: low grade squamous intraepithelial lesion.....	44
3.9.1.3. Nález ASC-H	45
4. Diskuze	46
5. Závěr	49
Seznam literatury	50
Seznam e-zdrojů	52
Seznam grafů, tabulek a obrázků:.....	54
Seznam zkratk	55

1. Úvod

Karcinom děložního hrdla je častým maligním nádorem především u žen produktivního věku. Každý rok je v ČR nově diagnostikováno asi 900 žen s tímto onemocněním a téměř 400 žen v jeho důsledku zemře. Podle dlouhodobé tendence incidence i mortality je ve sledovaném období pozorována stagnace a až v posledních několika letech byl zaznamenán mírný pokles.

V roce 2015 bylo nově diagnostikováno 871 případů nádorů hrdla děložního, což představuje více než 16 nádorů na 100 000 žen. V roce 2014 zemřelo na karcinom děložního hrdla 380 žen, což představuje přibližně 7 úmrtí na 100 000 žen.

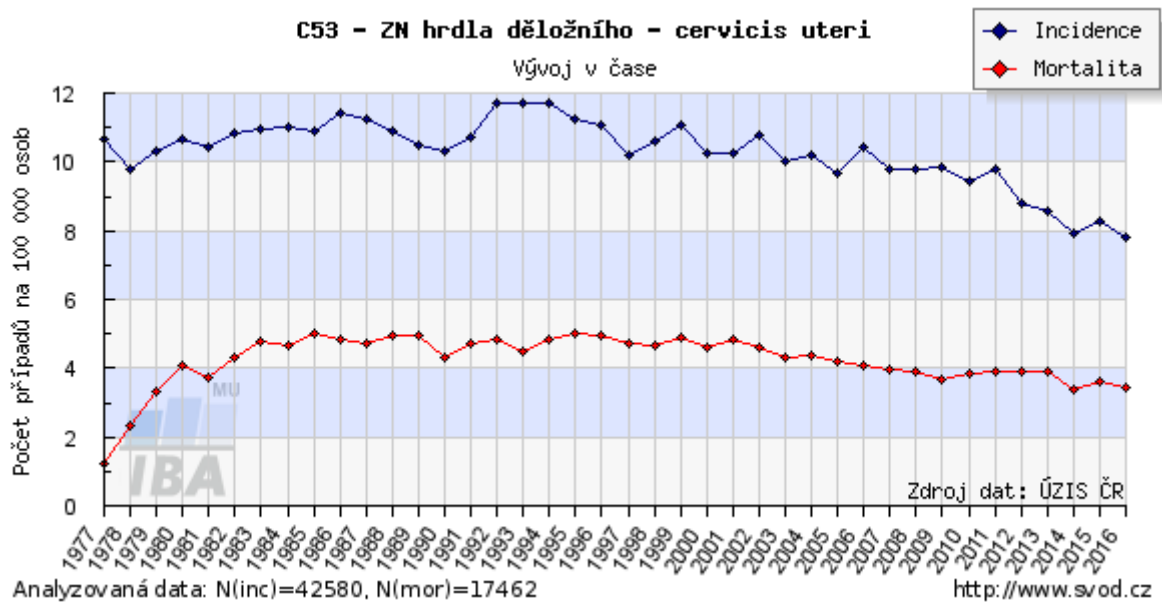
(www.cervix.cz)

1.1. Současná epidemiologická situace

V incidenci (= poměr nově vzniklých onemocnění v daném časovém období k celkovému počtu osob ve sledované populaci) zhoubných nádorů hrdla děložního obsazuje ČR světové 107. místo a v Evropě 13. nejvyšší pozici. V mortalitě (= počet úmrtí za určité časové období) zhoubných nádorů hrdla děložního se ČR řadí na 137. místo ve světě a na 18. místo v Evropě.

Teprve v posledních málo letech je zaznamenáván slabý pokles mortality (úmrtnost). Při stabilní incidenci je však důsledkem zvyšování prevalence, tedy počet žijících žen s diagnostikovaným a léčeným karcinomem děložního hrdla. V roce 2015 dosáhla prevalence hodnoty 18 490 žen a ve srovnání s rokem 2005 (15 922 žen) tak vzrostla o 16 %. (www.cervix.cz)

Časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100000 osob) diagnózy C53 (zhoubný nádor hrdla děložního) v celé populaci tak, jak je vidět z grafu má mírně klesající tendenci (obr. 1).



Obr. 1: Vývoj incidence a mortality C53

1.2. Skríninkové programy

V současné době je gynekologická cytodiagnostika nejrozšířenější skríninkový program ministerstva zdravotnictví České republiky. Cervikální skrínink spočívá v pravidelných gynekologických kontrolách, jejichž cílem je odhalit přednádorové změny (prekancerózy) nebo časná stadia zhoubného nádoru (karcinomu) děložního čípku. Kromě gynekologického skríninku je Ministerstvem zdravotnictví ČR organizován i skrínink nádorů kolorekta a skrínink nádorů prsu. (www.mzcr.cz)

Skríninkové programy jsou organizovány statutárním orgánem – Ministerstvem zdravotnictví, které ze všech dodaných dat vyhodnocuje účelovost a prospěšnost daného preventivního programu. Tak jako se využívá statistické zpracování skríninkových informací pro vnější kvalitu laboratoří (srovnání laboratoří dle kvality a dle dodaných dat), je vhodné využívat tuto metodu pro zhodnocení vnitřní kvality laboratoří, a to je v rukou každé jednotlivé laboratoře. V cytologické laboratoři se může statistické zpracování údajů o práci jednotlivých pracovníků stát užitečným nástrojem pro zvyšování kvality i na základě vyhodnocování reskrínérské práce. Tento způsob vyhodnocení se může stát jednou z metod získávání informací ze zkoumání dat a jejich využití při řešení problémů.

2. Teoretická část

2.1. Definice oboru cytologie

Cytologie je vědní obor buněčné biologie zabývající se studiem buněk, a to nejen jejich anatomii, ale i jejich fyziologií a vlastnostmi, především buněčným cyklem, způsoby dělení a buněčnou smrtí. Zároveň je jedním z biologických podoborů provázána s histologií, mikrobiologií, molekulární biologii, biochemií, biofyzikou, genetikou, organickou chemií, mikroskopií atd.

2.2. Gynekologická cytologie

Gynekologická cytologie je vyšetřovací metoda, při které se pomocí světelného mikroskopu hodnotí barevně znázorněné buněčné populace získané stěrem či výtěrem z genitálního traktu ženy. Cytologie nám dává možnost předejít velkým zdravotním problémům. Karcinom děložního hrdla je totiž jedním ze dvou nejčastějších druhů rakoviny, které u nás zabíjí ženy. Základní mikroskopii provádí cytotechnolog- primární skrínér, který je vyškolen k tomu, aby rozpoznal abnormální buňky mezi tisíci normálních buněk v nátěru nebo LBC preparátu. Vzorky, které obsahují abnormální buňky, jsou dále předány vedoucímu cytotechnologovi nebo patologovi, který provede ohodnocení abnormalit podle standardizovaného hodnotícího systému a vydá doporučení klinikům ohledně dalšího postupu u pacientky. Cytodiagnostika se uplatňuje v hormonální i onkologické diagnostice. Cíleným rozšířením preventivních prohlídek a vylepšováním skreeninkových metod se daří zachycovat předstupně maligního bujení děložního čípku v době, kdy mohou být jednoduchými léčebnými zásahy likvidovány a tím jsou zachraňovány životy mnoha žen. (Kobilková et al.2006)

2.2.1. Liquid based cytology

LBC je odlišná technika zpracování, kdy se preparáty z tekutého média vyrábí až v laboratoři, je odstraněn hlen, erytrocyty a buňky jsou rovnoměrně rozprostřeny na sklíčku v tzv. ThinPrep Pap = tenké vrstvě, takže stěr je potom lépe diagnostikovatelný v mikroskopu. Nádobky s LBC se v laboratoři po cytologickém vyšetření skladují 6 týdnů. Když je potřeba u pacientky provést dodatečné genetické vyšetření na průkaz HPV, lze je provést z této uskladněné nádobky a pacientka nemusí opětovně chodit ke gynekologovi na odběr. Navíc je touto technikou možné dodatečně provést

imunocytochemický průkaz p16 onkogenu, který označí rakovinové buňky, což v klasickém Pap stěru nelze. Kromě systému ThinPrep (Cytoc Corporation, Marlborough, MA, USA) používaném v Bioptické laboratoři je ve světě zaveden ještě systém SurePath (Tripath Imaging Inc., Burlington, NC, USA). Mezi hlavní rozdíly patří druh přepravního roztoku (fixativa), při Surepath jsou buňky odděleny centrifugací při ThinPrep filtrací, buňky jsou umístěny na sklíčko v oválném nebo okrouhlém poli pomocí sedimentace (Surepath) nebo kontrolovaného tlaku (ThinPrep), rozdíl ve velikostech pole pro mikroskopii jsou při Surepath 13 mm a při ThinPrep 20 mm. (www.biopticka.cz) Zásadním rozdílem je skutečnost, že počítačem asistované vyhodnocování preparátu u systému SurePath probíhá v případě negativy zcela bez účasti člověka.

2.2.2. Zpracování a hodnocení liquid based cytology

Kartáček po odběru je nutné propláchnout ve fixační tekutině (Tyrodův roztok) tak, aby se všechna odebraná tkáň dostala do transportního média. Po odeslání uzavřené nádoby do laboratoře se cytologický stěr zhotoví centrifugací nebo sedimentační metodou. Automatický přístroj ThinPrep Pap stěr obarví, osuší a systém Hologic označí potenciálně suspektní místa pomocí nástavbového systému automatického zpracování digitálního obrazu a napojením na automatické mikroskopy (Imaging System). Takto označená místa cytologické skříněrky prohlídí přednostně a poté prohlídí celý preparát. Tato metoda (ThinPrep Pap test) umožňuje vyniknout méně výrazným atypiím buněk, eliminuje limitace stěru (hlen, krev, zánět) a zároveň napomáhá práci skříněrkám a cytopatologům. (www.biopticka.cz)

2.2.3. Výhoda LBC oproti klasické metodě stěru

Odebrané buňky při metodě LBC jsou rovnoměrně rozprostřeny na sklíčku bez příměsí (hlen, krev, artefakty, aj) v počtu od 5000 buněk na sklíčku. Při klasickém nátěru obsahuje PAP stěr přibližně 160000 až 200000 buněk – nejčastější chybou při jeho hodnocení je přehlédnutí malého množství rakovinových buněk v celkové záplavě ostatních buněk – zde se jedná o omezených možnostech lidského oka, účinnost dosahuje pouze k 60-70 % odhalení. Přesnost odečtu při metodě LBC přesahuje 90 %.

Navíc je touto technikou dodatečně možné provést imunocytochemický průkaz p16, nebo lze dodatečně provést vyšetření na průkaz HPV. (www.eurocytology.eu)

2.2.4. Nevýhoda LBC

Nevýhody z odborného hlediska prakticky neexistují. Omezujícím faktorem může být finanční nákladnost instalace kompletního systému.

2.3. Vyšetření HPV

Jako jedna z nejdůležitějších příčin vzniku karcinomu děložního čípku je již dlouhou dobu považována infekce HPV. V roce 2008 dostal německý lékař a vědec Harald zur Hausen nar. v roce 1936 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství, a to konkrétně za objasnění role papilomavirů při vzniku karcinomu děložního čípku a tím napomohl vzniku vakcinace proti HPV. (www.hpv.cervix.cz)

2.3.1. Vznik a vývoj infekce

Lidské papilomaviry jsou známy jako potenciálně onkogenní viry v souvislosti s četnými onemocněními kůže a sliznic. Nejznámější je jejich souvislost s karcinomem cervixu a prekancerózními stavy, kde jsou prokázaným hlavním, i když ne jediným vyvolávajícím faktorem a jejich diagnostika je součástí preventivních screeningových programů stejně nezbytně jako klasická gynekologická cytologie.

Z virologického hlediska tvoří papilomaviry dnes již samostatnou čeleď Papillomaviridae, popsáno je více než sto typů, patří mezi relativně malé viry (kapsida o průměru asi 55nm). Pro HPV je typická druhová a tkáňová specifita. Tkáňová specifita se týká jejich schopnosti infikovat výhradně mitoticky aktivní buňky bazálního epitelu kůže a sliznic. Přenos infekčních virových částic se děje prostřednictvím přímého kontaktu infikovaného a neinfikovaného jedince, autoinokulací (přenos z jednoho místa organismu na jiné). Infekční virové částice byly také nalezeny na gynekologických nástrojích a plochách ordinace, spodním prádle, ve školních šatnách a sprchách, v prostorách fitness center, v plaveckých bazénech. Další vývoj infekce je možný dvěma směry: produktivní v keratinocytech, kde dochází postupně až k syntéze dospělých infekčních částic, genom zůstává v epizomální formě, nebo jako neproduktivní = transformující v buňkách slizničního epitelu, kde nastává exprese pouze časných proteinů, popřípadě, u infekce hr typů, maligní transformace buňky. V pokročilejším stádiu onemocnění pak dojde k začlenění virového genomu do genomu buňky. (www.hpv.cervix.cz)

2.3.2. Vyšetření HPV v Bioptické laboratoři

Výběr vhodného detekčního systému je závislý na lokalizaci léze (kožní x slizniční typy) a materiálu, ve kterém je detekce prováděna (fixovaný x nefixovaný). Pro gynekologický screening používáme tzv. Digene Hybrid Capture 2 systém, což je molekulárně biologická metoda založená na přímé hybridizaci HPV DNA.

V rámci PCR (Polymerase Chain Reaction) existují různé systémy primerů pro amplifikaci fylogeneticky příbuzných skupin typů cílené do různých genů. Jedná se o primery obecné nebo degenerované, amplifikující buďto převážně kožní nebo převážně slizniční typy, v jednoduché nebo Nested PCR (= vnesená polymerázová řetězová reakce). Podle druhu testovaného materiálu a způsobu jeho případné fixace a souvisejícího možného poškození DNA volíme primery amplifikující kratší nebo delší oblast. (www.biopticka.cz)

HPV se v cervikálním stěru vyšetřuje v Bioptické laboratoři pomocí testu Hybrid Capture 2 od firmy DIGENE (Test detekuje DNA 13 hr-HPV typů: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68, který je proplácen zdravotními pojišťovnami. Principem testu je denaturace DNA a hybridizace v tekutém mediu se směsí neznačených celogenomových RNA sond specifických pro výše uvedené hr-HPV typy. Specificky vycytené hybridy DNA-RNA jsou detekovány pomocí sekundární protilátky s navázanou alkalickou fosfatázou, která v konečné fázi štěpí přidaný substrát za vyzáření chemiluminiscence) nebo pomocí testu APTIMA HPV ASSAY: detekce mRNA 14 HR-HPV typů metodikou zachycení cílové mRNA a jejího amplifikačního namnožení. Následně je možno detekovat HPV 16, 18 a 45. (www.zdravi.euro.cz)

Další nabízené HPV vyšetření v Bioptické laboratoři je test InnoLiPA (firma Innogenetics), které detekuje jednotlivé typy, včetně vakcinačních 6, 11, 16, 18. (www.biopticka.cz)

Zejména díky faktu, že lékaři dokáží dobře definovat preklinická stadia onemocnění, které lze efektivně odstraňovat ablačními technikami (např. konizace), patří karcinom děložního hrdla mezi nejlépe preventabilní maligní onemocnění. Celoplošný program na prevenci karcinomu děložního hrdla, založený na mikroskopické identifikaci abnormálních buněk v PAP cervikálních nátěrech, snížil incidenci cervikálního karcinomu v některých státech až o 80 %. Protože infekce hr-HPV je nutným faktorem pro vznik karcinomu děložního hrdla a nukleové kyseliny viru jsou poměrně stálé, jejich identifikace ve stěru je další možnou variantou screeningu karcinomu děložního hrdla. Molekulárně-genetické testy pro detekci HPV v cervikálním stěru nabízejí oproti cytologickému screeningu mnohé výhody, mezi které patří zejména vyšší citlivost pro identifikaci cervikální léze vysokého stupně (HSIL), lepší reprodukovatelnost a menší zatížení subjektivním hodnocením. Díky nižší specifitě HPV testu u mladších žen pro prokázání CIN 2 ve srovnání s cytologií, a to zejména u mladších žen (která se navíc liší podle konkrétní metody, na které je

založený) použití v konkrétním nasazení národního skríninkového programu vyžaduje velice důkladné zvážení. (Ondič a Kašpírková, 2013)

2.3.3. Klasifikace HPV typů

Doposud bylo objeveno více než 120 typů lidských papilomavirů (HPV). Kožní a slizniční léze u člověka způsobují typy zejména ze dvou taxonomických rodů - alfa a beta. U běžné populace byl spolehlivě prokázán onkogenní potenciál pouze u skupiny slizničních HPV typů náležících do rodu alfa. Na základě dat z výzkumu rakoviny děložního hrdla označuje mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny IARC (International Agency for Research on Cancer) jako karcinogenní 12 HPV typů, a to HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 a 59, jež jsou klasifikovány jako vysoce rizikové (hr = high risk). Dlouhodobá infekce vysoce rizikovými lidskými papilomaviry (hr-HPV) je příčinou (za účasti dalších kofaktorů - např. snížení celkové imunity organismu) vzniku maligních neoplazií zejména v oblasti anogenitálního traktu. Další typy HPV jsou označovány lr (low risk) patří mezi ně např. typy 6 a 11, které jsou původcem genitálních bradavid – condylomata acuminata. HR-HPV etiopatogeneze byla prokázána u 99,7 % dlaždicobuněčných karcinomů děložního hrdla, 81,8 % adenokarcinomů děložního hrdla, 40 % karcinomů vulvy, 64–91 % karcinomů pochvy, 88–93,8 % análních karcinomů a 40–81,8 % karcinomů penisu. Hr-HPV jsou také asociovány s neoplazii v oblasti hlavy a krku, a to u zhruba 25–35 %. Maligní potenciál dalších typů, zejména HPV 26, 53, 66, 68, 73, 82, je stále studován, neboť většina z nich byla popsána právě ze slizničních lézí, i když zřídka. (Ondič a Kašpírková, 2013)

2.3.4. Karcinogeneze HPV

Za karcinogenní proces vyvolaný hr-HPV infekcí jsou zodpovědné dva onkoproteiny kódované virovými geny E6 a E7. Tyto proteiny inaktivují produkty hlavních tumor supresorových genů – proteiny p53 a pRb, čímž

1. podporují postup buněčného cyklu a syntézu DNA a
2. blokují apoptózu (programovanou buněčnou smrt)

Proces karcinogeneze v oblasti děložního hrdla je možné rozdělit do čtyř poměrně dobře definovaných stadií, jež od třetího kroku dobře odráží buněčné změny v cervikálním stěru:

1. získání HPV
2. HPV perzistence
3. progresu přetrvávající infekce směrem k cervikálním prekancerózám
4. invaze, přičemž doba od získání infekce ke stadiu invaze se v obvyklé populaci počítá na roky, spíše desetiletí (www.hpv-guide.cz)

2.3.5. Prevence

2.3.5.1. Primární prevence

K primární prevenci řadíme sexuální abstinenci, kondom, očkování HPV

Očkování HPV: vakcíny obsahují rekombinantní L1 protein ve formě virus like partikule, odlišují se adjuvantním systémem: Cervarix: ASO₄ (hydroxid hlinitý + kostimulační adjuvants), Silgard + Gardasil 9: Al(OH)₃. 2 až 3 dávkové schéma, zkřížená protekce HPV 31,33,45 (adenokarcinomy), Gardasil 9 – vyšší počet genotypu i vyšší počet antigenů.

První vakcína byla představena v roce 2006 (kvadrivalentní Silgard/Gardasil), Vakcína je dostupná v cca 130 zemích světa a více než 60 z nich zařadilo očkování proti HPV do národních imunizačních programů. Pokrytí vakcinací a proces implementace se stát od státu liší. Nejlepších výsledků dosáhla Austrálie, kde se podařilo naočkovat kvadrivalentní vakcínou velký počet mladých lidí, a dosáhnout tak snížení výskytu HPV infekce nízkorizikových typů 6, 11 a vysoce rizikových typů 16, 18 o zhruba 90 %, snížit výskyt genitálních bradavic o zhruba 90 %, předrakovinových změn na cervixu nízkého stupně o zhruba 45 % a předrakovinových změn na cervixu vysokého stupně o

zhruba 85 %. Proočkovanost dívek v ČR stoupla od roku 2012 z 53 % na 65 % v roce 2017. (Kinkorová, 2018)

V České republice je celoplošně hrazená vakcinace dívek ve věku 13/14let od roku 2012 a od roku 2018 i chlapců v tomtéž věku. Schválené a doporučované vakciny proti HPV: Silgard, Cervarix a Gardasil 9. (www.vakciny.net)

2.3.5.2. Sekundární prevence

K sekundární prevenci řadíme skrínink karcinomu děložního čípku → od roku 2008 v ČR organizovaný skrínink (od roku 2014 adresné výzvy)

2.3.5.3. Terciální prevence

Terciální prevence znamená terapeutické zásahy (konizace apod).

2.4. Historie

Historicky se datuje gynekologická cytodiagnostika do roku 1928, kdy řecko-americký lékař a vědec G. N. Papanicolaou přednesl na konferenci „Race Betterment“ v Battle Creek v Michiganu studii o nádorových buňkách získaných poševní aspirací. Tento lékař se podílel se na výzkumu účinku ovariálních hormonů na ženský pohlavní trakt. V roce 1926, Dr Papanicolaou publikoval sdělení, že ve vaginálním sekretu žen s rakovinou hrdla jsou přítomny nádorové buňky a posléze publikoval v roce 1943 sdělení *Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear*. Vyvinul laboratorní metodu - tzv. PAP test, který popisuje způsob odběru vzorku, následné zpracování, přesný způsob barvení a hodnocení nátěrů optickými mikroskopy.

Do klinické praxe v gynekologii a porodnictví v ČSR byla cytodiagnostika zavedena 7 let po uveřejnění díla G. N. Papanicolaoua. Velikou zásluhu na proniknutí cytodiagnostiky mezi vyšetřovací metody mají J. Herold a F. Luksch z gynekologické a porodnické kliniky I. lékařské fakulty v Praze a gynekologové z československých fakultních pracovišť:

Výuku gynekologické cytodiagnostiky zajišťovala od roku 1962 gynekologická cytologická sekce. Ta byla považována za společnost a díky prof. O. Nyklíčkoví, DrSc., připojena k Mezinárodní cytologické akademii. Měla pevnou organizaci a systém jako odborná gynekologická společnost. Gynekologická cytodiagnostika se prosadila ve světě jako vyšetřovací metoda k hodnocení buněk na děložním hrdle a v cervikálním

kanálu. Papanicolaouovo barvení preparátů a Bethesda hodnocení je hlavní metodou v prevenci rakoviny hrdla - skrínigová metoda. (zdravi.euro.cz)

2.5. *Současnost*

Bioptická laboratoř s.r.o. je největší cytologická laboratoř a zároveň i největší bioptická laboratoř v České republice. Bioptická laboratoř s.r.o. zaměstnává v současné době celkem 260 pracovníků včetně 50 lékařů a VŠ pracovníků. Ročně se v laboratoři vyšetří 150 000 pacientů biopticky a 800 000 pacientů cytologicky. Bioptická laboratoř je smluvním partnerem všech zdravotních pojišťoven v ČR. Disponuje největším genetickým oddělením, které je specializováno na diagnostickou onkologickou problematiku. Je akreditovaná ČIA dle ČSN EN ISO 15189 a je držitelem akreditace MZ pro skrínink karcinomu cervixu.

Bioptická laboratoř poskytuje vyšetření gynekologické cytologie (onkologické i funkční vyšetření stěrů z cervixu a vaginální sliznice, vulvy a endometria) i negynekologické cytologie, dále pak kompletní bioptickou službu, imunohistochemická a molekulárně genetická vyšetření. Spolu s klasickým cytologickým vyšetřením nabízí špičkovou metodiku ve vyhodnocení gynekologické cytologie (ThinPrep PAP test) a v cytologickém vyšetření moči (ThinPrep UROCYTE), a to díky použití moderní technologie Liquid based cytology (LBC, cytologie v tenké vrstvě) v kombinaci s nástavbovým systémem automatického zpracování digitálního obrazu a napojení na automatické mikroskopy: Imaging systém. (www.biopticka.cz)

3. Experimentální část

3.1. Vlastní cíle

V roce 2017 jsem měla zajištěn téměř 100 % reskrínink hodnocených preparátů, a proto jsem se rozhodla, že se pokusím o statistické zhodnocení vlastní práce (laborantka A) v kontextu celé laboratoře.

Dalším cílem bylo vyhodnocení roční variability falešně negativních výsledků gynekologické cytologie identifikovaných v rámci rychlého reskríninku.

3.2. Hypotéza

1. Chybovost gynekologického skríninku prováděného cytologickou laboratoří určená jako počet revizí nálezů v průběhu roku nevykazuje statisticky významné rozdíly v rámci jednotlivých měsíců.
2. Počet revidovaných reskrínovaných nálezů odečtených jednou laborantkou v jednotlivých měsících v průběhu roku nevykazuje statisticky významné rozdíly.

3.3. Preanalytická část mimo laboratorní: odběry a fixace vzorků

Odběry cytologických vzorků provádí atestovaný gynekologický lékař nejlépe v období první poloviny menstruačního cyklu. Je důležité odebrat buňky tzv. transformační zóny - junkční zóny (místo přechodu dlaždicového epitelu do žlazového) - stěr hodnocený jako uspokojivý musí obsahovat buňky ektocervixu i endocervixu, tzn. dlaždicové i žlazové epitelie. Odběr se v současné době provádí kartáčkem (brush). Odebraný buněčný materiál gynekolog rovnoměrně rozetře na podložní sklíčko tak, aby bylo pokryto celé buněčným nátěrem. Na kvalitě odběru je závislé i cytologické hodnocení.

Řádně označený vzorek se ukládá do čistých transportních obalů bez možnosti ovlivnění chemickými látkami např. deodoranty, dezinfekcí, osvěžovače vzduchu, formaldehyd apod. (vlivem změny pH u buněk v nátěru dochází k cytolýze buněk), také je doporučována fixace pomocí izopropylalkoholem nebo 96 % alkoholem. Vzorky jsou uchovávány při pokojové teplotě a zpracovány do 1-2 týdnů.

3.4. Preanalytická část laboratorní:

Po dopravení vzorků do laboratoře jsou vzorky obarveny a pokryty solakrylem příp. krycím sklíčkem a po úplném vyšetření jsou archivovány v laboratoři po dobu nejméně 5 let. Sklo i průvodka musí mít vždy shodné označení-jednoznačná identifikace je určena jménem a příjmením pacienta + ztotožnění pacienta (identifikační číslo) příp. jiné označení přidělené lékařem.

Po přijetí preparátu zaslaných gynekology je nutné v rámci preanalytické části zaevidovat a zkontrolovat preparáty, jejich označení, průvodky, stav po převzetí, neidentifikovatelné či sporné žádanky či materiál vyřadit či vrátit zpět – v souladu s laboratorní příručkou Bioptické laboratoře. Poté jsou žádanky i sklíčka označeny a zaznamenány v programu Winzis.

3.4.1. Barvení cytologických preparátů v Bioptické laboratoři

Skolíčka se barví v barvicím automatu pro gynekologickou cytologii Leica 4040: 2x po 1 minutě 96 % alkohol, 1 min 70 % alkohol, 1 min oplach vodou, 1 min Harrisův roztok, 2x po 1 min oplach vodou, 1 min 70 % alkohol + 1ml amoniaku, 2x po 1 min oplach vodou, 3x po 1 min 96 % alkohol, 2x po 1 min polychrom, 3x po 1 min 96 % alkohol, 1 minuta aceton+ xylen (1:1), 2x po 1 min xylen.

Po obarvení preparátů následuje nanesení montážního média, jeho překrytí a zaschnutí ve speciálních sušících stojanech. Každá laborantka cytotechnolog si druhý den odebere určené množství skel se žádankami a čísla skel zaneše do programu WINZIS pod vlastním identifikačním číslem. Tímto způsobem lze po rozdělení práce dohledat každé dodané sklo. (www.biopticka.cz)

3.5. Kontrola kvality laboratoře

Bethesda systém předpokládá ověřování kvality práce cytologické laboratoře. Pro udržení kvality skríninku cervikálního karcinomu na žádoucí úrovni jsou zavedeny tyto systémy:

3.5.1. Interní kontroly kvality (IQC)

IQC jsou uplatněny laboratoří v denním provozu:

1. Vybavení, údržba a chod laboratoře (automatizaci zpracování stěru-barvení, zalévání-aby se maximálně eliminoval lidský faktor v preanalytické části).
2. Kvalifikace screeningových laborantek a patologů. Toto kritérium sleduje také zdravotní pojišťovna a stavovské organizace.
3. Denní objem práce připadající na jednu skríněrku je max. 100 preparátů denně, s rychlostí do 12,5 preparátů za hodinu. Jedná se o zamezení chyb pro neúměrnou rychlost práce, únavu anebo také pro nedostatečnou zkušenost a erudici při malém počtu vyšetření (dolní hranice není stanovena).
4. Průběh druhého čtení (reskríning) - může probíhat dvěma způsoby:
 - a) Aspoň 10 % negativních preparátů kontrolně odečítá patolog, kvalifikovaná zkušená skríněrka, nebo certifikovaný robotický systém.
 - b) 100 % preparátů podléhá rychlému reskríningu v případě, že odečtení 1 případu trvá přibližně 1 minutu.
5. Cytologicko-histologické korelace. Je důležitá dokumentace a především analýza porovnávání cytologie s nálezem při následném histologickém vyšetření s významem výchovně vzdělávacím, někdy při neshodě vede i k návrhu na opakovanou biopsii z jiného místa čípku.
6. Zpětné vyhledávání. Jde o postup dohledání a opakovaném posouzení všech nátěrů z minulosti v případě nálezu dysplastických nebo nádorových buněk v aktuálním stěru pacientky. Hlavním smyslem je vzdělávání pracovníků laboratoře.

7. Kvalita skríníngu. Posuzuje se podle nálezů označených jako ASC v poměru k součtu nálezů LSIL a HSIL. Jiným kritériem je poměr falešné negativity určený poměrem počtu falešně negativních nálezů k součtu skutečně pozitivních a falešně negativních nálezů. Tento poměr se v celosvětovém měřítku u dobrých laboratoří pohybuje kolem 5-10 %. (Bofin, 2007, Boulanger, 2007, Renshaw, 1997)
8. Kontinuální vzdělávání lékařů a středního zdravotního personálu lze hodnotit podle počtu a kvality publikovaných vědeckých prací, účasti na odborných sjezdech doma a v zahraničí. Také se posuzuje vnitřní vzdělávací systém laboratoře. (www.cipek.cz)

3.5.2. *Externí systémy zajištění kvality (External quality assurance systems)*

EQA jsou aplikovány externími regulačními institucemi, např. testováním dovedností, porovnáváním struktury nálezů a pozitivních predikčních hodnot mezi laboratořemi. (www.eurocytology.eu)

V současné době je statistické zpracování součástí metodiky cytologické práce a jejího hodnocení. V kontrole vnitřní kvality laboratoře – konkrétně v části reskríninku (druhé čtení) se statistické hodnocení zatím příliš nevyužívá, proto by začlenění této metody mohlo přinést další informace vedoucí ke zvýšení kvality práce.

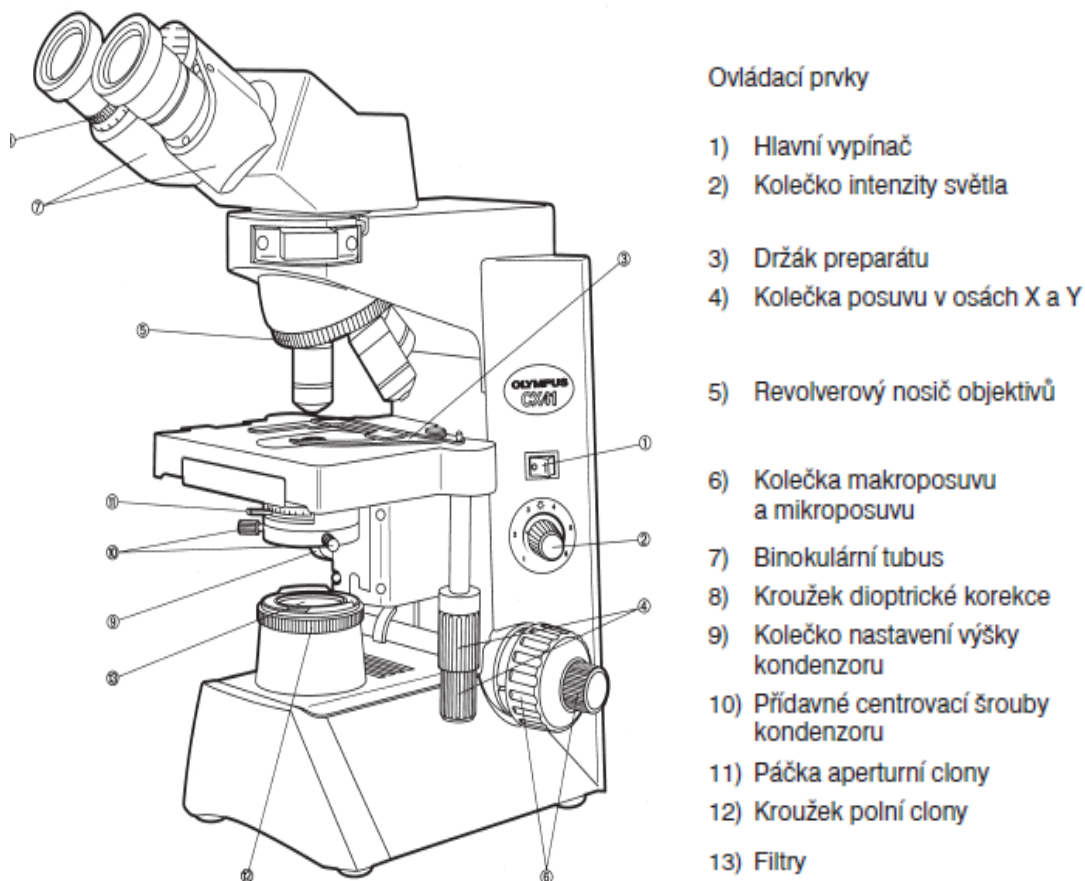
3.6. *Ověřování kvality Bioptické laboratoře Plzeň*

Bethesda systém předpokládá ověřování kvality - v Bioptické laboratoři je důležitou součástí prověřování tzv.reskrínink, což je opětovné hodnocení 10 % negativně hodnocených stěrů (NILM) určenými zkušenými skrínérkami. Problematické preparáty jsou reskrínérkami vyřazeny pro kontrolu atestovaným patologem a po jeho zhodnocení je nález ponechán nebo změněn na suspektní = je provedena revize.

Nedílnou součástí cytologické laboratorní praxe je výuka a výchova všech pracovníků tak, aby byli seznámeni s novými vědeckými poznatky a postupy. V Bioptické laboratoři se pravidelně konají korelační semináře (obr.16), je doporučena účast na celonárodních cytologických kongresech a seminářích. Ověřování kvality a kontrola práce se uskutečňuje s kliniky, formou mezilaboratorní kontroly výměnou preparátů a vyhodnocováním přednáškové a publikační činnosti pracovníků laboratoře. (www.biopticka.cz)

3.7. Metodika – optická mikroskopie

Vlastní experimentální část je založena na práci cytotechnologa – zdravotního laboranta s doplněným vzděláním v oboru gynekologické cytologie. V Bioptické laboratoři jsou k dispozici optické (světelné) mikroskopy značky Olympus CX41 (obr.2), pomocí kterých lze rozeznat struktury neviditelné pouhým okem.



Obr. 2: Optický mikroskop. Zdroj: www.opticalservis.cz

Mikroskop se skládá z osvětlovací části: zdroj světla (halogenová žárovka 6 V 30 W), kondenzor a clona, mechanické části: podstavec, stojan a stolek s křížovým posunem a optické části: objektivy a okuláry (binokuláry). K zobrazení se využívá viditelná část spektra o vlnové délce 420 až 760nm. K zobrazení preparátu je nutné, aby jím procházelo světlo, které se dále soustředí na vzorek pomocí kondenzoru a při použití vhodné kombinace čoček se obraz zaostřuje na úroveň oka. Objektiv tvoří soustava čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností, která vytváří skutečný, převrácený a zvětšený obraz objektu, ten se promítá mezi ohnisko okuláru a okulár. Okulárem je pak tento obraz pozorován zvětšený, u tohoto mikroskopu je zvětšení

okuláru 10x. Objektiv má označení PlanC, velikost zvětšení, NA = numerická apertura a označenou tloušťku krycího sklíčka.

Součástí mikroskopu je tzv. revolverový nosič se 4 objektivy s udaným zvětšením 4x 0,10 NA = celkové zvětšení je 40x, u objektivu 10x 0,25 NA = celkové zvětšení 100x, u objektivu 20x 0,40 NA je celkové zvětšení 200x a poslední objektiv má zvětšení 40x při 0,65 NA s celkovým zvětšením 400x. Základní vyhledávání se provádí s objektivem 10x0,25NA. Objektiv zvětšující 100x 11,25 NA je vhodný pro histologické preparáty za použití imerzního oleje, při prohlížení gynekologické cytologie se nepoužívá.

Numerická apertura je číselná hodnota, kterou lze přirovnat k relativní apertuře (číslu f) objektivů fotoaparátů. S rostoucí numerickou aperturou roste i rozlišovací schopnost objektivu. Celkové zvětšení je součin zvětšení objektivu a zvětšení okuláru. Pracovní vzdálenost je vzdálenost mezi horní plochou krycího sklíčka a nejnižším bodem objektivu. Důležité pro mikroskopické hodnocení je mít náležitě nastavený mikroskop: po zapojení mikroskopu do elektrické sítě a zapnutí hlavního vypínače na mikroskopu se nastaví vhodná intenzita světla. Nastaví se průměr polní clony tak, aby obraz jejího obvodu opsal zorné pole. Po vycentrování polní clony – kontrola pomocí okrajů zorného pole se nastaví aperturní clonu dle hodnoty aperturní hodnoty objektivu-clona má cca 80 % NA objektivu. (www.opticalservice.cz)

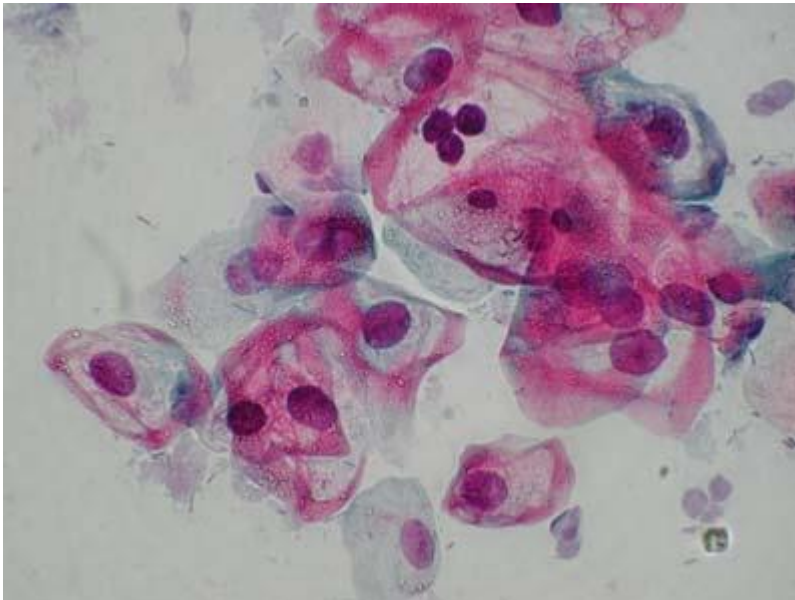
3.8. Hodnocení

Po správném nastavení celého mikroskopu se vloží podložní sklíčko s preparátem na stolek mezi ramena držáku a při prohlížení se sklíčko posouvá pomocí koleček posuvu po pravé straně stativu mikroskopu. V preparátech se samostatně hodnotí benigní změny a uzavírá se jejich hodnocení dle systému Bethesda a odesílají se výsledky určeným gynekologům prostřednictvím počítačového programu WINZIS. Přibližně 10 % vyšetřovaných skel, s předpokládající suspektní buněčnou neoplázií a jakoukoli problematickou diagnózou se předává k následnému zhodnocení lékaři – patologovi. Tyto skla mají cytotechnologem označená problematická místa pro lepší orientaci kontrolujícího lékaře. Zároveň minimálně 10 % náhodně vybraných preparátů podléhá povinně dvojí kontrole = reskríninku. Preparáty jsou také zpětně kontrolovány v případech, kdy se objeví nesoulad mezi histologickým a cytologickým nálezem.

3.8.1. Hodnocení v cytopatologii

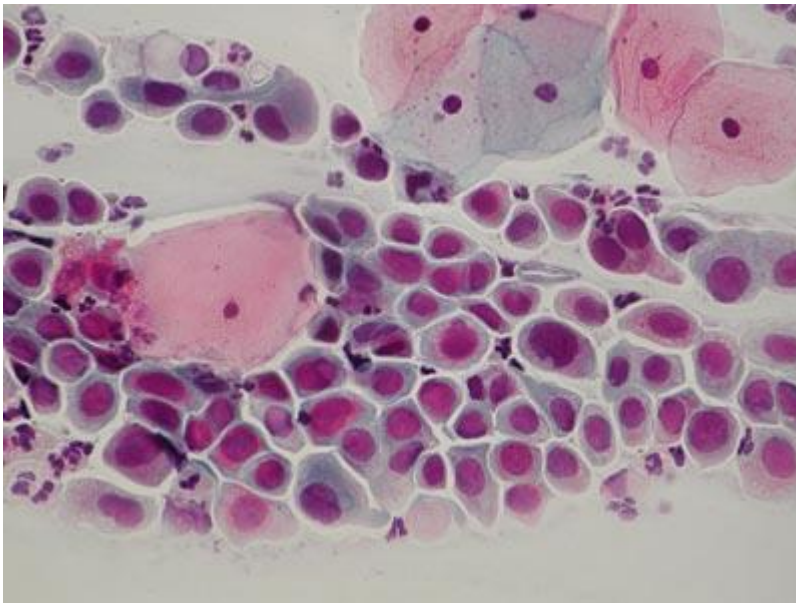
Cervikální cytodiagnostika se v současné době řídí tzv. Bethesda systémem (TBS), který byl zaveden na cytopatologické konferenci v Bethesdě (stát Maryland) v roce 1988 a poté byl inovován v letech 1991, 2001 a 2014. Tento systém nahradil dosud používaný PAP systém jeho zakladatele řeckého lékaře dr. Papanicolaoa. Dle Bethesda systému se diagnostikují dlaždicové buňky do výsledků:

1. ASC-US = atypické dlaždicové buňky s nejasným významem (atypical squamous cells of undetermined significance)
2. ASC-H = atypické dlaždicové buňky-nelze vyloučit HSIL (atypical squamous cells – cannot exclude HSIL)
3. LSIL (obr. 3) = nízký stupeň dlaždicové intraepiteliální léze (low-grade squamous intraepithelial lesion)



Obr. 3: LSIL. Zdroj: www.cervix.cz

4. HSIL (obr. 4) = vyšší stupeň dlaždicové intraepiteliální léze (high-grade squamous intraepithelial lesion)

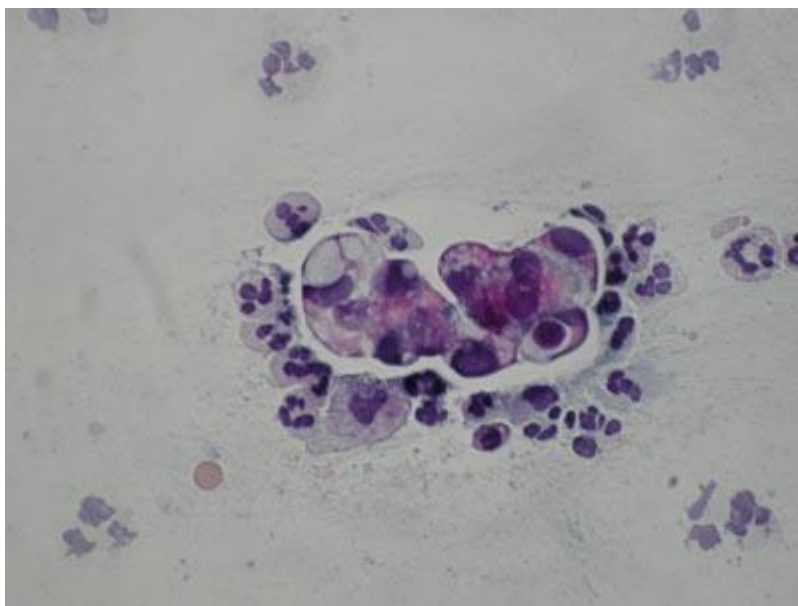


Obr. 4: HSIL. Zdroj: www.cervix.cz

5. Squamous cells of carcinoma = dlaždicobuněčný karcinom

Diagnostika žlazových buněk se dělí následovně:

- 1.→AGC (NES) = Atypické žlazové buňky (nespecifikováno) - atypical glandular cells cells not otherwise specified
- 2.→AGC (NEO) = Atypické žlazové buňky spíše neoplastické-atypical glandular cells, suspicious for AIS or cancer
- 3.→AIS (obr. 5) = adenokarcinom in situ



Obr. 5: AIS. Zdroj: www.cervix.cz

Cytologický skrínér hodnotí ve stěru jeho kvalitu a popisuje stěr jako uspokojivý nebo limitovaný (krví, zánětem, cytolýzou, malobuněčností apod) anebo neuspokojivý. Posuzuje benigní změny (infekce, reparativní změny, hormonální stav, změny na dlaždicovém a žlazovém epitelu).

3.8.2. Hodnocení preparátů cytotechnologem

V cytologických nátěrech je také možné pozorovat elementy, které nepochází z tkání pochvy-erytrocyty, leukocyty, histiocyty, lymfocyty, ale i spermatozoa aj. Erytrocyty se vyskytují samozřejmě v menstruační fázi, jejich přítomnost je v cytodiagnostice velmi důležitá - např. maligní buňky bez příměši krve jsou vzácné (např. při metastázách). Leukocyty nejsou v cytodiagnostice problematické, jsou součástí téměř všech nátěrů, a zvláště při zánětech se jejich počet zvyšuje. Lymfocyty a plazmatické buňky se vyskytují také u žen se zánětlivými procesy v oblasti děložního hrdla. Histiocyty mohou být diagnosticky problematické-zde je možné vidět mitozy a vícejadernost, fagocytované elementy atd. Tyto buňky mohou uvést skrínera v omyl a zaměnit histiocyty za monstrozní holá jádra dlaždicových buněk. Spermatozoa se můžou objevit v nátěrech, pokud jsou odebrány po koitu, připomínají leukocyty nebo bakterie, diferencují se při vícenásobném zvětšení. Mají ovoidní tvar, kulaté jádro a zřetelný bičík. (Kobilková a Dušková, 2003)

3.8.2.1. Hodnocení jádra

V cytologických preparátech se hodnotí především velikost a struktura buněčných jader. K barvení jader je určen Harrisův hematoxylin (kamencový hematoxylin-oxidovaný žlutý prášek, extrakt z kampeškového dubu) - bazofilní část barvení, které jádro buňky obarví do modro-fialova. Vzhled jádra informuje o biologické aktivitě buňky i o obsahu DNA. Zbarvené struktury chromatinu odpovídají neaktivní formě chromatinu (heterochromatinu) v podobě jaderné membrány, nepřímo můžeme posuzovat i množství biologicky aktivního euchromatinu v pozadí jádra (parachromatin). Viditelná jadérka znamenají intenzivní syntézu v době barvení. Obsahují RNA, červeně září, vyskytují se v období zvýšené aktivity-replikace, regenerace či reparace, ale i také v preinvazivní neoplazii (maligní novotvorba tkáně). Při hodnocení jader je důležitá:

1. velikost - konkrétně poměr mezi jádrem a cytoplasmou je posunut ve prospěch jádra (tzv.N/C poměr - nukleo/cytoplasmatický poměr).
2. anizonukleozavariace v rozměrech a tvaru buňky
3. hyperchromazie-tmavší jádra = intenzivněji zbarvená, často se vyskytuje v případech malignity, ale i atrofování epitelu v menopauze-regresivní změny, nebo může být problém ve způsobu barvení
4. abnormality vzhledu a rozložení chromatinu-maligní buňky často vykazují hrubý, nepravidelný, tmavě se barvící chromatin nebo marginální uložení chromatinu na okrajích jader
5. abnormality jadérka-zvětšená, mnohočetná, nepravidelně tvarovaná
6. vícejaderné buňky a mitotické nálezy
7. nádorové pozadí = nádorová diatéza-důležitý ukazatel u invazivních karcinomů - obsah buněčné drti-rozpadlých maligních buněk, červené krvinky různého stupně zachovalosti aj. (Kobilková a Dušková, 2003)

3.8.2.2. Hodnocení cytoplazmy

Funkční diferenciaci buňky znázorňuje cytoplasma. Barvení probíhá pomocí polychromo-acidofilní část barvení, u dlaždicových buněk se barví do slabě vodových barev (cyanofilní-tyrkysová, eosinofilní), u žlázových buněk je cytoplazma jemně zrnitá (namodralá), u buněk endometriálních a rezervních (kmenových) je chudá a jemně vakuolizovaná. Okraje mohou být výrazné (ztluštění ektoplazmy) nebo nevýrazné

(histiocyty) či ve shlucích nezřetelné. Keratinizované buňky mají cytoplazmu oranžovou-vlivem hromadění keratinu (stavební protein nerozpustný ve vodě obsažený v epitelálních tkáních-kůže, vlasy, nehty) ve zrohovatělých buňkách, při degenerativních změnách je amfofilní (narůžovělá). V cytoplasmě nejsou vidět organely ani sekreční granula, pouze zbytky-hnědavý lipofuscin jako pigmentová zrnka, hemosiderin (bílkovina s navázaným železem) a zbytky pohlcených materiálů. Vakuolizace cytoplazmy je projevem degenerace, u některých forem malignit jsou jedním z ukazatelů vakuoly s obsahem inkluzí a vakuoly cylindrických žlázových bb s pohlcenými polymorfonukleáry -u adenokarcinomů. (Kobilková a Dušková, 2003)

3.8.2.3. Hodnocení benigních změn

Kromě vyhledávání suspektních ukazatelů se laborantka soustředí i na benigní změny, které popisuje do firemní databáze do karty příslušné pacientky. Jedná se o změny v diferenciaci buněk, výskyt rohovění-keratinizace, zánětlivé změny a identifikace mikroflory, různé degenerativní (reparace, regenerace) změny apod.

Buňky se diferencují (přeměňují směrem k vyšší specializaci) na:

- a) kmenové buňky
- b) parabazální buňky (v atrofii, v šestinedělí, atd)
- c) intermediální buňky
- d) superficiální buňky.

Při skríninku se laborantka zaměřuje na výskyt méně diferencovaných bb, které se často těžko odlišují od malých histiocyťů, stromálních bb endometria, ale i od buněk carcinoma in situ CIS. V transformační zóně cervixu nejčastěji začíná neoplazie (zhoubné bujení). Nález metaplazie ukazuje proces nahrazování cylindrického epitelu epitelem dlaždicovým a je nejvýraznější v prenatálním období a po první graviditě (pokles pH).

Za jiných podmínek dlaždicový epitel podléhá hyperdiferenciaci a vzniká tzv. zrohovatělá vrstva epitelu-v cytologickém stěru se pak nachází bezjaderné šupiny-hyperkeratoza nebo malé eosinofilní buňky s pyknotickým jádrem-parakeratoza. Tyto nálezy jsou benigního charakteru-vznikají mechanickými vlivy-prolaps dělohy, zavedené pesary, či IUD, při zánětech, aktinoterapii, virózách aj. Někdy se keratinizace vyskytuje u suspektních nálezů, a to při infekci HPV-cervikálních intraepiteliálních neoplaziích, kdy jsou malé buňky polymorfní a parakeratóza nebo dyskeratocyty

překrývají léze HPV, pod nimiž mohou být skrytá ložiska prekancerozy nebo karcinomu.

3.8.2.4. Hodnocení hormonální cytologie

Hodnocení hormonální cytologie je součástí Bethesda systému-vyšetření se indikuje pacientkám z různých důvodů:

1. určení ovariačního cyklu u pacientek s hysterektomií, s poruchami cyklu, u dětí a v období premenarche (před nástupem menstruace).
2. určení hormonální situace v graviditě při habituálních (opakovaných) potratech nebo v období puerperia (šestinedělí)
3. detekce folikulární perzistence-funkční porucha: chybí ovulace, netvoří se žluté tělísko
4. určení hormonální situace v klimakteriu a menopauze
5. monitorování HRT (hormonální terapie) a převažujícího vlivu steroidů ve směsích
6. diagnóza steroidy produkujících novotvarů v dětství a v postmenopauze

Hormonální cytologie má i dnes výpovědní hodnotu v dětské gynekologii, může ovlivnit volbu léčby, sledovat vliv léčby, vyloučit či odhalit nutnost podrobnějšího došetření steroidního metabolismu. Znalost hormonální cytologie ovlivňuje zároveň i hodnocení onkologické cytologie-například v atrofovaném stěru se při nejasném výsledku požaduje ze strany vyšetřujícího lékaře estrogenový proliferální test, který pomůže vyžrát vaginálními buňkami a pak se lépe prokáže nebo vyloučí patologický nálezh.

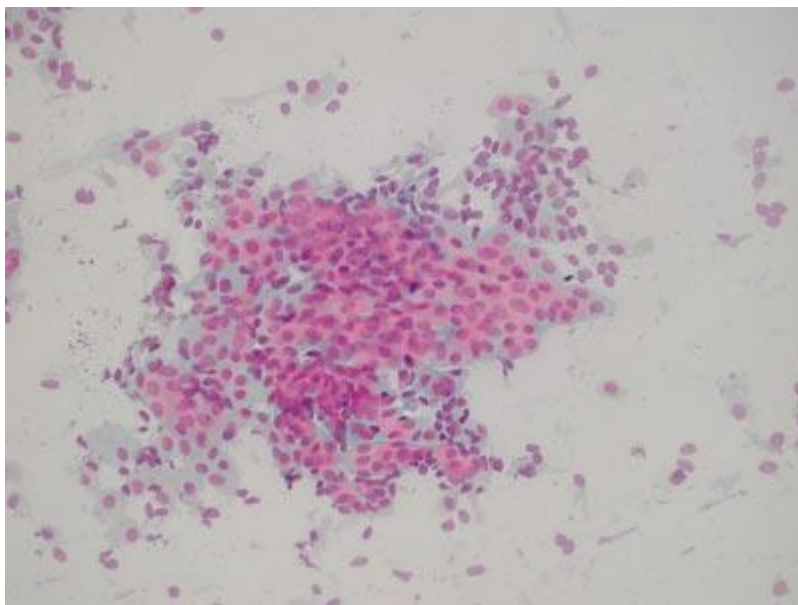
Vícevrstevnatý nerohovějící dlaždicový epitel pochvy a děložního čípku velmi jemně reaguje na pohlavní hormony. Jedná se o velmi citlivý receptor pro estrogény. Stimulace endometria potřebuje mnohem větší dávku estrogenů, k úplnému a normálnímu vyzrání epitelu dochází jen pod vlivem těchto hormonů. Také pod vlivem androgenů a progesteronu (gestageny) proliferuje epitel. K atrofii epitelu dochází v případech neúčinnosti pohlavních hormonů.

Atrofický stěr (obr. 6) je

1. fyziologický: od 3. týdne života do začátku puberty, ve stáří a v šestinedělí
2. patologický: v průběhu pohlavního zrání jako projev hypohormonální poruchy – amenorrhoe

Amenorrhoe primární – menstruace se vůbec neobjeví z důvodů organických (deformace dělohy apod.) nebo genetických (např. Turnerův syndrom), chromozomálních abnormalit aj.

Amenorrhoe sekundární – u žen menstrujících je vynechané krvácení nejméně 3 měsíce → poruchy hypothalamo–hypofyzární, hyperprolaktinémie, ovariální nebo uterinní poruchy atd.



Obr. 6: Atrofický stěr. Zdroj: www.cervix.cz

Stěry pro hormonální cytologii se při gynekologickém odběru odebírají ze zadní vaginální stěny, popř. z fornixu (klenby poševní), dolní vaginální segment a exocervix jsou pro tento odběr nevhodné. Preparáty musí být technicky dobře zpracované, negativní vliv při odečítání má zánět, metaplazie či dysplazie. Zároveň v průvodním listu je nutné uvést věk pacientky, stav a fáze menstruačního cyklu. Pokud jsou zastoupeny všechny typy buněk – parabazální, intersticiální a superficiální - jedná se často o odběr nevhodný pro hodnocení hormonální cytologie (výjimku tvoří např. patologická nadprodukce androgenu u malých holčiček nebo a to je častější situace - útlum maturace při mentální anorexii).

Při hodnocení hormonální cytologie se určuje

1. stav stěru: materiál umožňuje/neumožňuje hodnocení hormonální cytologie
2. zda nález odpovídá/neodpovídá věku, stavu a fázi cyklu.

Vaginální epitel je pod vlivem estrogenů, gestagenů, androgenů, adrenálních steroidů a vždy jde o multihormonální vlivy s individuálními odlišnostmi. (Dušková, 2009)

3.8.2.5. Hodnocení endometriálních buněk

Nález endometriálních buněk se vyskytuje při krvácení z dělohy (např. menstruační), v případech karcinomů endometria a při poškození sliznice dutiny děložní. Endometrium = děložní sliznice je složena ze zona bazalis a zona functionalis. Zona bazalis se odlučuje každých 28 dní a je odplavována menstruačním krvácením. Tato bazální vrstva je tvořena stromatem ze žlázového epitelu a cév, z nichž je každý měsíc regenerována nová vrstva zona functionalis závislá na hormonální stimulaci z ovaria.

V cytologickém stěru lze také vidět endometriální buňky a to:

- endometriální žlázové buňky: jako skupiny buněčných shluků s tmavým nahloučením jader v centru nebo shluky endometriálních buněk s ještě definovanými buněčnými hranicemi nebo shluky buněk s pyknózou jader (zvýšená patologická kondenzace chromatinu v jádrech)
- povrchové stromální buňky endometria: buňky větší než endometriální žlázové, nález menších shluků, jednotlivě nerozeznatelné od histiocytů
- hluboké stromální buňky endometria: malé, oválné nebo vřetenité, často bez cytoplazmy, nález ve shlucích i jednotlivě

3.8.2.6. Menstruační cyklus

Menstruační cyklus ovlivňuje hodnocení a vzhled buněk:

- A. od 5. do 14. dne menstruačního cyklu-proliferační fáze-růstová fáze (4.-9. den růst folikulu v ováriu)
- B. od 14. do 28. dne menstruačního cyklu-sekreční fáze endometria, luteální fáze v pochvě-ovulace: uvolnění vajíčka z vaječníku mezi 14. a 16.dnem, převaha gestagenů (hlavně progesteronu) nad estrogeny
- C. od 28. do 5. dne menstruačního cyklu-vlastní fáze menstruační, kdy endometrium podléhá nekróze. Z cév endometria dochází ke krvácení, které roztříští děložní sliznici a které je následně vyloučeno z organismu formou menstruačního krvácení.

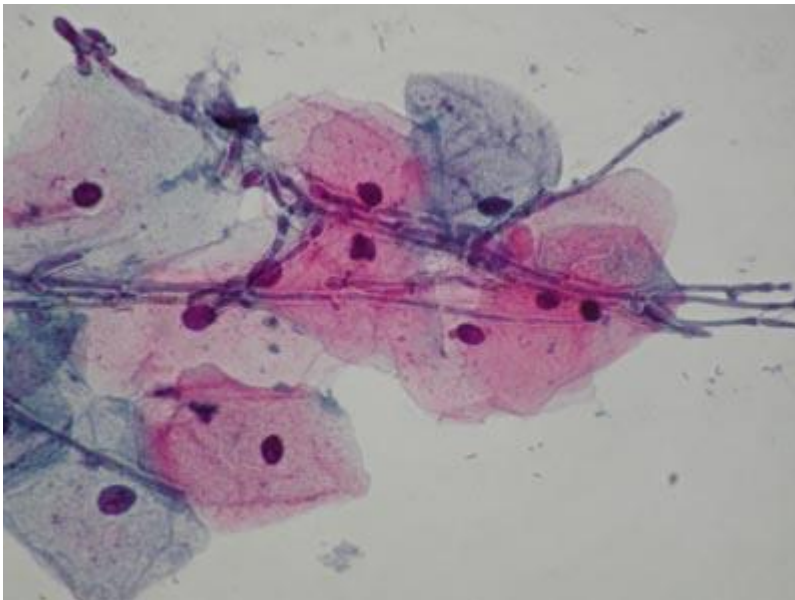
3.8.2.7. Hodnocení zánětlivých změn

Při výskytu zánětlivých změn vznikají reaktivní buněčné změny, které mohou do určité míry napodobovat dysplazii. Poševní epitel je za normálních okolností osídlen bakteriemi kmene *Lactobacillus* nejčastěji *acidophilus*, v cytologii nazývané Döderleinovy tyčinky. Toto osídlení je fyziologické, bakterie epitel chrání v prostředí kyselého pH a jsou schopny rozpustit cytoplazmu intermediální dlaždicové buňky (cytolýza) - především v graviditě, luteální fázi menstruačního cyklu, v postmenopauze a během léčby steroidy.

Jako normální nález považujeme také výskyt smíšené flóry (koky a tyčinky).

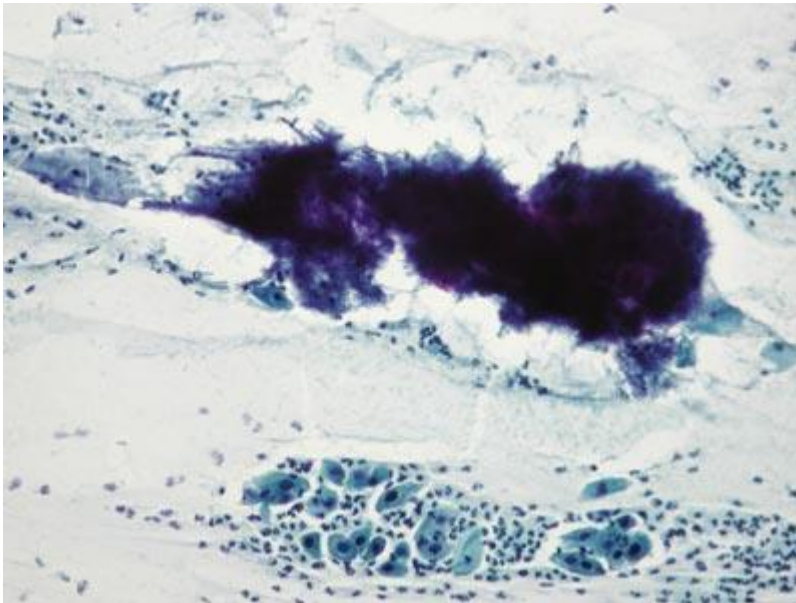
Mezi nejčastější původce zánětlivých změn patří:

1. *Candida albicans* (obr. 7) a *Candida glabrata* – v cytologickém stěru se nachází původce mykozy



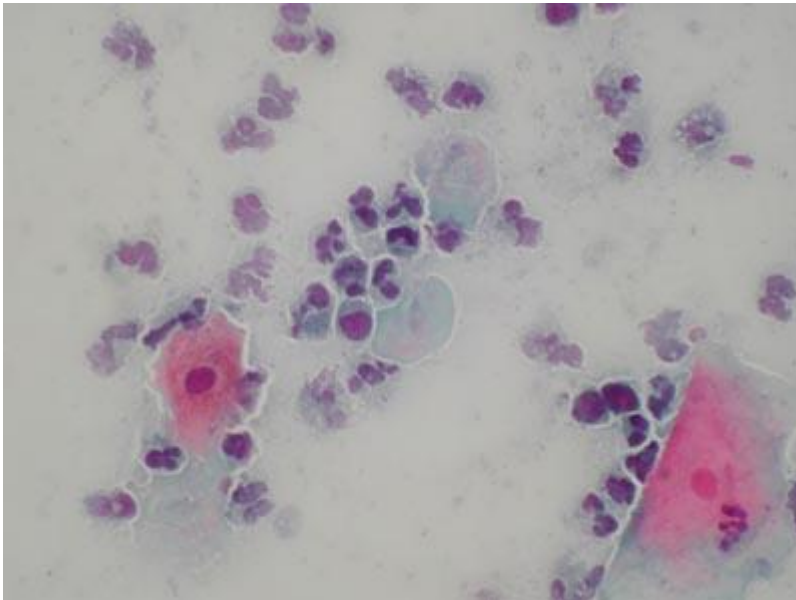
Obr. 7: *Candida albicans*. Zdroj: www.cervix.cz

Actinomyces spp. (obr. 8) - nález především u žen se zavedeným nitroděložním tělískem-IUD (IntraUterine Device)



Obr. 8: Aktinomykoza. Zdroj: www.cervix.cz

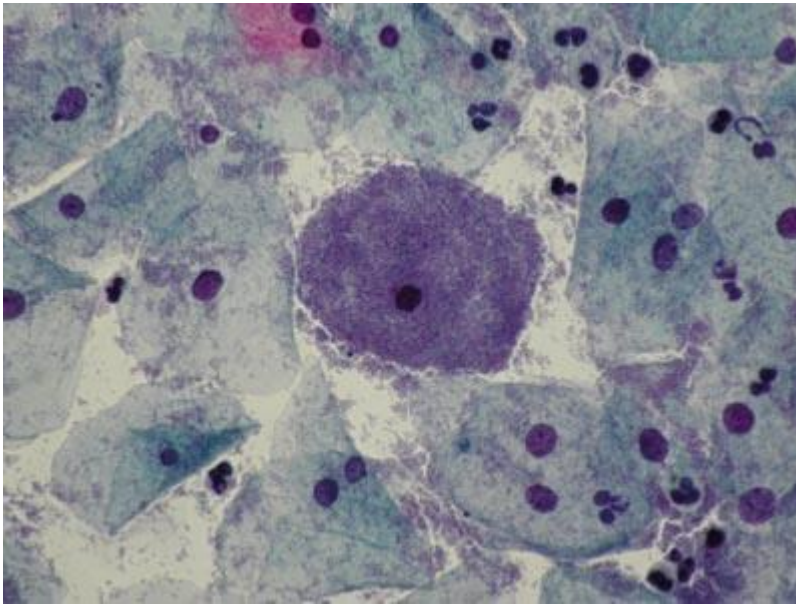
2. *Trichomonas vaginalis* (obr. 9) - prvok způsobující nehormonální vyzrávání, sexualně přenosné onemocnění, usnadňuje přenos HIV



Obr. 9: *Trichomonas vaginalis*. Zdroj: www.cervix.cz

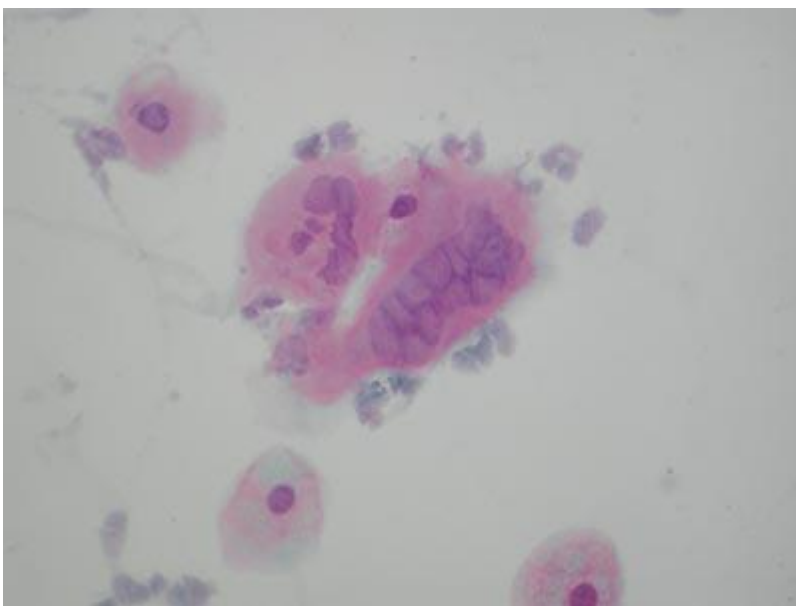
3. *Leptothrix vaginalis* – vlasovité mikroorganismy bez zánětlivých vlivů, často provází infekci *Trichomonas vaginalis*

4. *Gardnerella vaginalis* (obr. 10) - původce bakteriální vaginózy



Obr. 10: *Gardnerella vaginalis*. Zdroj: www.cervix.cz

5. Koky – stafylokoky vytváří hroznovitá seskupení, streptokoky tvoří řetízky. Přesnější určení je možné jen kultivací.
6. *Chlamydia trachomatis* – G-bakterie: detekce pomocí specifických protilátek metodou ELISA nebo neakreditované Touchdown Enzyme Time Release-PCR (metoda je přibližně 10x citlivější než běžné PCR metody) (www.biopticka.cz)
7. HSV typu 2 (obr. 11) = herpes simplex virus vytváří puchýře, ulcerace a obraz cervicitidy + CMV = cytomegalovirus-výskyt vzácný



Obr. 11: HSV. Zdroj: www.cervix.cz

8. HPV = humen papillomavirus-nejdůležitější původce v cytologickém skreeninku, má klíčovou úlohu v karcinogenezi, ve stěru se nacházejí tzv. koilocyty (buňky s typickým perinukleárním haló + dysplastické změny)
9. Zvláštní typ zánětu – folikulární cervicitis s typickým obrazem nezralých lymfocytů, histiocytů a makrofágů

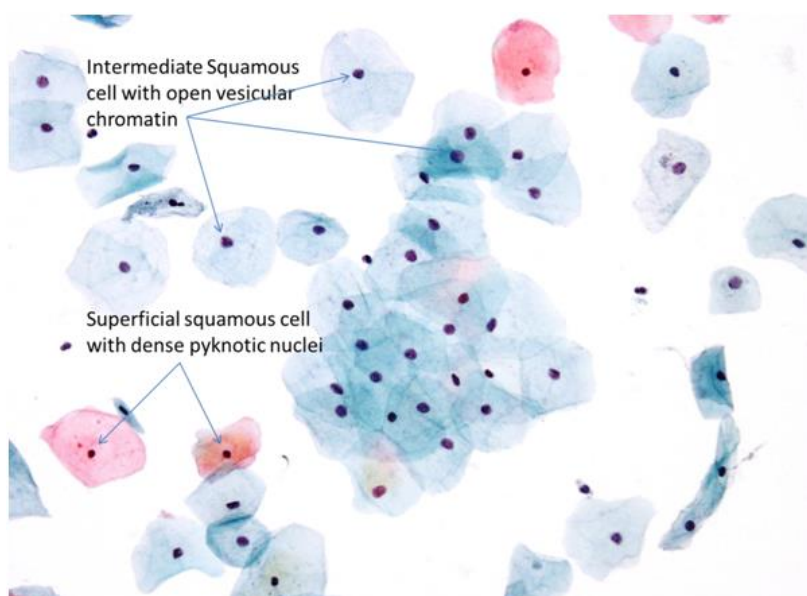
3.8.2.8. Nedostatek vitamínů – kyseliny listové a vitamínu B12

Nedostatek se projevuje v graviditě, postmenopauze, při užívání některých druhů antikoncepce nebo po aktinoterapii - v případě kys.listové se může vyskytnout na cytologickém preparátu obraz dysplazie (LSIL), vícejaderné buňky, hypersegmentace neutrofilů. Při nedostatku kobalaminu (vit. B12) se nachází ve stěru makrocytoza se změnami napodobujícími účinky aktinoterapie či chemoterapie – obraz předchází změny v kostní dřeni. (Kobilková, 2006)

3.9. Práce cytotechnologa

Cytologický stěr hodnotí cytotechnolog optickou mikroskopií. Hodnocení je obtížné, ovlivněné prostředím s vlivy hormonálními, mikrobiálními aj. Předpokladem je náležitý odběr a zhotovení dokonalého stěru (buňky v dostatečném množství správně nanesené na sklíčko) = sensitivita metody. Mylně hodnocené pozitivní stěry sice neohrožují život ženy, ale snižují specifitu, vedou ke zbytečným operačním zákrokům, finančním nákladům a psychickému stresu pacientky. (Kobilková, 2000)

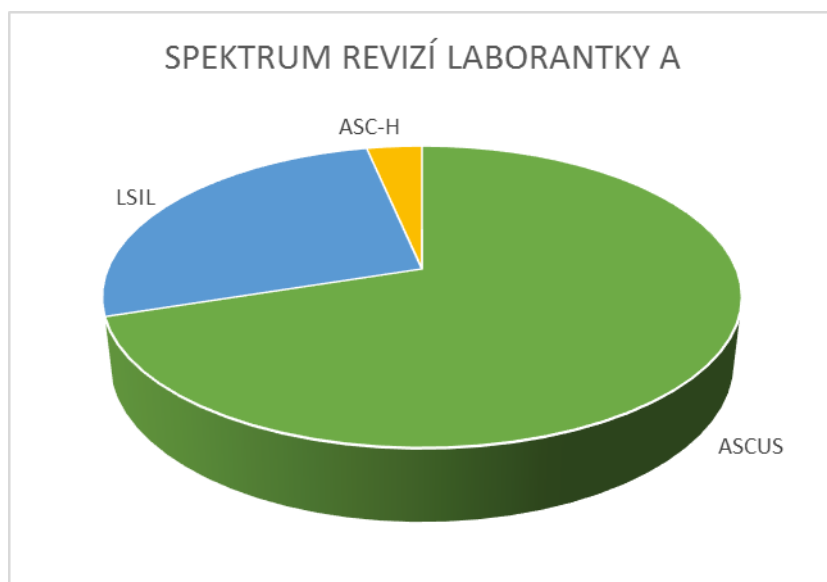
Hodnocení velkého počtu preparátů s vysoce převažujícími normálními nálezy (obr. 15) realizované v prvním kroku nelékaři – cytotechnology – nese reálné, statisticky zdůvodněné (a eticky nepřijatelné) riziko přehlédnutí, případně podhodnocení přítomné léze. Minimalizace těchto rizik zavedením povinných reskríninků 10–20 % náhodně vybraných negativních vzorků, rychlého pre- nebo postskríninku celého objemu diagnostikovaného materiálu, popř. vřazením automatizovaného pre- nebo postskríninku pomocí obrazově analytických systémů se stala součástí skríninkových programů akreditovaných laboratoří. (Dušková, 2010)



Obr.č. 15: Normální cytologický obraz NILM. Zdroj: www.eurocytology.eu

3.9.1. Matematické hodnocení práce testovaného subjektu v roce 2017

Statistické srovnání je založeno na celkovém hodnocení mé práce cytotechnologa = laborantky A na základě téměř 100 % reskríninku dle postupů platných v Biopstické laboratoři. V cytologické laboratoři bylo v roce 2017 odečteno celkem 749652 preparátů a z tohoto počtu bylo celkem reskrínováno 203784 preparátů (což představuje 27,2 % z celkového počtu). Z tohoto důvodu byl celkový počet falešně negativních nálezů na pracovišti pro účely srovnávání práce jednotlivé laborantky extrapolován. V roce 2017 laborantka A celkem hodnotila 20673 preparátů. Z nich bylo 392 označeno jako suspektních. Revize byla nakonec provedena ve 30 případech takto: 21 nálezů na závěr ASCUS, 8 nálezů na závěr LSIL a 1 nález na závěr ASC-H (obr. 13).



Obr. 13: Identifikace revizí laborantky A dle tabulky 1

Tab. 1: Počty odečtených a reskrínovaných preparátů hodnocených laborantkou A

2017 měsíc	statistika práce laborantky A			nalezené chyby			počet revizí
	počet	reskrínink	procenta	ASCUS	LSIL	ASC-H	
1	1030	265	26%	0	0	0	0
2	1678	880	52%	2	1	0	3
3	2096	2096	100%	5	1	0	6
4	1723	1723	100%	0	0	0	0
5	1481	1481	100%	5	2	0	7
6	2201	2201	100%	1	3	0	4
7	1719	1719	100%	2	0	0	2
8	992	992	100%	0	0	0	0
9	2074	2074	100%	3	1	1	5
10	2320	2320	100%	1	0	0	1
11	1976	1976	100%	2	0	0	2
12	1383	1383	100%	0	0	0	0

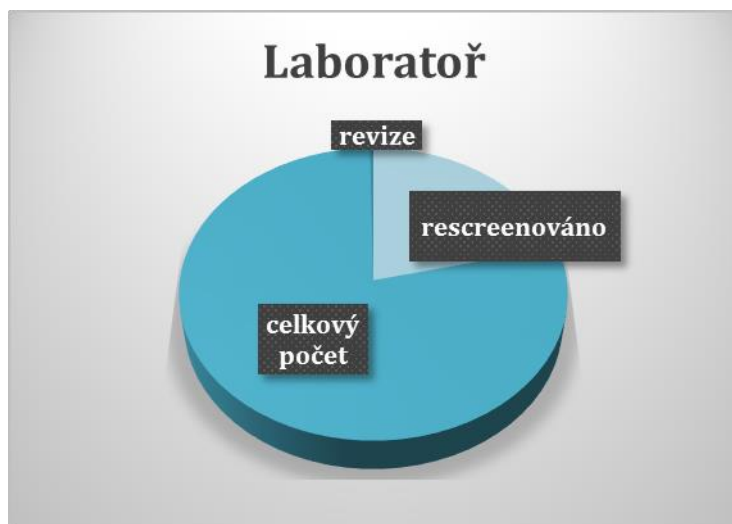
Na základě analýzy z tabulky 1 je vidět, že v měsících s nejmenším počtem odečtených skel (srpen, leden, popřípadě i prosinec) nebyly zrevidovány žádné závěry, z čehož vyplývá, že s nárůstem odečtených skel souvisí i nárůst falešně negativních nálezů. Největší počet revizí ale není jasně zaznamenán v měsíci s největším počtem odečtených skel: viz 10. měsíc.

Tab. 2: Sumarizace závěrů cytologických vyšetření v Bioptické laboratoři v roce 2017

celkový počet	805142	100%
NILM	774927	96,25%
ASC-US	14486	1,80%
ASC-H (nelze vyloučit HSIL)	2224	0,28%
LSIL (včetně HPV)	10054	1,25%
HSIL - nelze vyloučit invazi	1257	0,16%
HSIL - nelze vyloučit invazi	71	0,01%
Dlaždicobuněčný karcinom	47	0,01%
Atypie žláz. buněk (nespecifikovány) AGC-NOS	865	0,11%
Atypie žláz. buněk (spíše neoplastické) AGC-NEO	70	0,01%
Adenokarcinom in situ	20	0,00%
Adenokarcinom invazivní	36	0,00%
Ostatní maligní nádory	12	0,00%
Jiné	759	0,09%
Nelze stanovit	314	0,04%

Zdroj: www.biopticka.cz

V cytologické laboratoři bylo v roce 2017 celkem zreskrínováno 203784 skel (což představuje 27,2 % z celkového počtu skel) a bylo zrevidováno celkem 2990 skel, což je 0,4 % z celkového počtu = 1,5 % z počtu reskrínovaných skel (Tab. 3). Z tohoto hlediska je Biopstická laboratoř v dobré pozici na základě procent reskrínovaných skel, vzhledem k doporučeným 10 %. (obr. 14)



Obr. 14: Grafické znázornění revizí laboratoře

Dle tabulky 3 lze konstatovat, že nejméně revizí bylo provedeno v 9. měsíci (nejmenší procento revizí z počtu reskrínovaných preparátů), naopak nejvíce zrevidovaných nálezů bylo ve 4. měsíci. Nejvíce dodaných a analyzovaných preparátů v roce 2017 bylo v 10., 11. a pak v 6. a 3. měsíci. Nejméně odečtených preparátů je zaznamenáno v 7. a 12. měsíci, což má souvislost s letními prázdninami a vánočními svátky. Nejvíce zreskrínovaných skel je vidět ve 4. a pak ve 2. a 7. měsíci, zde je vidět souvislost ve 4. měsíci: největší reskrínink znamená nejvíce zrevidovaných nálezů. Nejméně zreskrínovaných skel je v 6. měsíci, ale počet revizí příliš neklesá – činí 1,74 %, nejmenší procento revizí z počtu reskríninku je naopak v 9. měsíci = 0,97 % reskríninku. Z těchto dat lze vyvodit závislost nalezených falešně pozitivních nálezů na počtu zreskrínovaných skel.

Tab. 3: Přehled celkového počtu gynekologických cytologií, počtu reskríninků a revidovaných skel v laboratoři

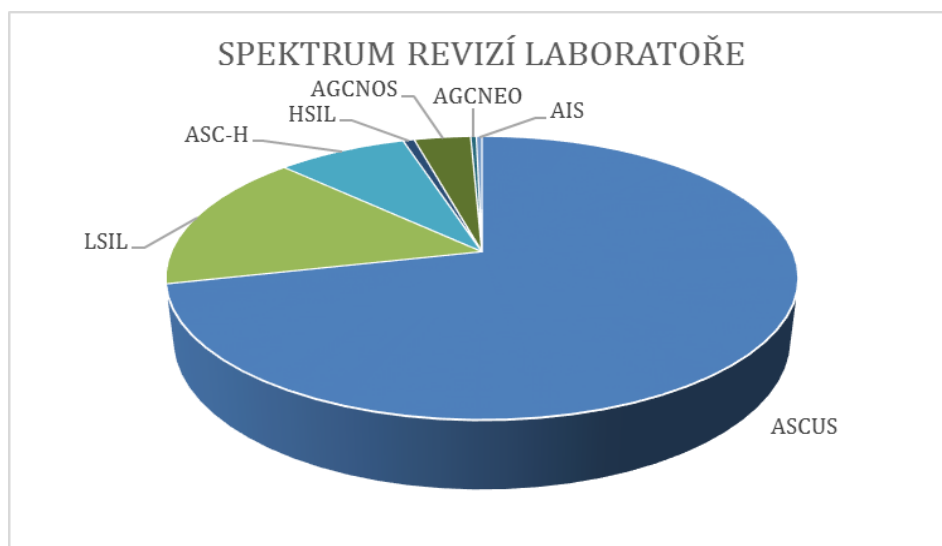
laboratoř			
měsíc	celkem	reskrínink	revize
1	60705	19040	293
2	58887	21097	274
3	70585	15480	248
4	58051	22286	332
5	68750	16533	245
6	71685	12421	243
7	43122	20519	247
8	56129	17784	247
9	60273	14766	184
10	75225	15077	234
11	72805	14276	227
12	53435	14505	216
	749652	203784	2990

V dalších krocích následuje srovnání jednotlivých revizí a pokus nalézt roční období s vyšším výskytem revizí. Také je nutno porovnat práci hodnoceného subjektu (laborantky A) s průměrem revizí laboratoře, přitom však je nutno vzít do úvahy 100 % reskrínink laborantky A a cca 27 % reskrínink ostatních laborantek. Průměrný počet skrínujících laborantek v Biopické laboratoři v roce 2017 byl 35 laborantek.

Tab. 4: Revize cytologických nálezů provedené v roce 2017

	ASCUS	LSIL	ASC-H	HSIL	AGCNOS	AGCNEO	AIS
1	25	9	0	0	0	0	0
2	23	5	2	0	1	0	0
3	18	1	3	0	2	0	0
4	24	1	3	0	2	0	0
5	19	3	2	1	0	0	0
6	8	5	4	0	0	0	0
7	15	1	0	1	1	0	0
8	13	2	0	0	1	0	0
9	20	10	4	0	1	0	0
10	14	2	0	0	0	1	1
11	13	2	3	0	1	0	0
12	15	5	2	0	1	0	0
	207	46	23	2	10	1	1

Z tab. 4 je poznat, že nejčastěji dochází k přehodnocení nálezu NILM na ASCUS (207x), pak na LSIL (46x), na ASC-H (23x), 2 revize na HSIL, 10 revizí na ACG-NOS, 1x na ACG-NEO a 1x na AIS. Počet reskrínovaných skel laboratoře tvoří 27 % celkového počtu preparátů. Obr. 15 ukazuje grafické rozložení revizí.



Obr. 15: Identifikace revizí v laboratoři

Tab. 5:

A → vzestupné pořadí měsíců v roce dle počtu revizí v nálezech ASCUS, LSIL, ASC-H

B → vzestupné pořadí měsíců v roce dle celkového počtu preparátů

A pořadí měsíců vzestupně dle počtu revizí					
Měsíc	ASCUS	Měsíc	LSIL	Měsíc	ASC-H
6	8	3	1	7	0
8	13	4	1	8	0
11	13	7	1	10	0
10	14	8	2	2	2
7	15	10	2	5	2
12	15	11	2	12	2
3	18	5	3	1	3
5	19	2	5	3	3
9	20	12	5	4	3
2	23	1	9	6	3
4	24	6	9	11	3
1	25	9	10	9	4
Průměr	17		4		2
Sm. odchylka	4,9		2,9		1,5

B pořadí měsíců dle počtu preparátů	
Měsíc	počet skel
7	43122
12	53435
8	56129
4	58051
2	58887
9	60273
1	60705
5	68750
3	70585
6	71685
11	72805
10	75225
	749652

Z tabulky 5, která je porovnána na základě průměrného počtu revizí v nálezech ASCUS, LSIL a ASC-H a dle směrodatné odchylky, lze určit měsíce s největší absolutní chybovostí: revize nálezů ASCUS byly největší v měsících leden, únor, duben, nálezy LSIL v měsících leden, červen a září a nálezy ASC-H v měsících červen, září a listopad. Nejčastěji docházelo k revizím v **lednu, červnu a září**. Posouzením dle celkového počtu odečtených skel nelze stanovit závislost – nejvíce skel je vidět v červnu, říjnu a listopadu, ale u měsíců s nejmenším množstvím odečtených skel (červenec, srpen, prosinec) lze poukázat na snížení revizí.

Tab. 6: Revize laborantky A za rok 2017

	ASCUS	LSIL	ASC-H	HSIL	AGCNOS	AGCNEO	AIS
1	0	0	0	0	0	0	0
2	2	1	0	0	0	0	0
3	5	1	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	5	2	0	0	0	0	0
6	1	3	0	0	0	0	0
7	2	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0
9	3	1	1	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0	0	0
11	2	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0
	21	8	1	0	0	0	0

Na základě téměř 100 % reskríninku byly změněny nálezy laborantky A z NILM na ASCUS v 21 případech, LSIL 8x a 1x ASC-H (Tab. 6). Nejproblematičtější měsíce jsou květen, červen a září.

3.9.1.1. Nález atypických dlaždicových buněk – ASCUS

ASCUS – atypical squamous cells je diagnóza v hodnocení dle Bethesda systému nejproblematičtější, obsahuje spektrum buněčných změn, které nejsou zcela přesně specifikovány. ASCUS je tzv. diagnóza nejistoty, tzn. nemá zcela přesné definice, zahrnuje mnoho buněčných změn. V celkovém počtu diagnóz by ASCUS neměl překročit 2,5 %, v roce 2017 Bioptická laboratoř má 1,8 % těchto nálezů. Morfologicky se v superficiálních a intermediálních buňkách nachází 2,5 – 3krát zvětšené jádro. Cytoplasma nemá jasně definované změny. V této diagnóze může být

ukryt zánět, ale i počínající malignita. Platí zde doporučení opakovat odběr po 6 měsících. (Kobilková et., 2006)

Mezi doporučené postupy po nálezu ASCUS se řadí opakování cytologického odběru přibližně za 6 měsíců, HPV HR testace, kolposkopie základní, eventuálně expertní, je zde možnost LBC atd.

Tab. 7: Průměr revizí ASCUS na 1 laborantku

	laboratoř		Laborantka A
měsíc	ASCUS 27%	ASCUS 100%	ASCUS
1	25	92,5	0
2	23	85,1	2
3	18	66,6	5
4	24	88,8	0
5	19	70,3	5
6	8	29,6	1
7	15	55,5	2
8	13	48,1	0
9	20	74	3
10	14	51,8	1
11	13	48,1	2
12	15	55,5	0
celkem	207	765,9	21
Průměr na 1 skríněrku: $765,9 : 35 = 21,9$			

Nález ASCUS byl u laborantky A v roce 2017 zrevidován 21krát, což je v souladu s průměrem laboratoře = 21,9 preparátů.

3.9.1.2. Nález LSIL: low grade squamous intraepithelial lesion

LSIL je nízký stupeň dlaždicové intraepitelové léze (prekanceróza lehkého stupně). Tato diagnóza je v Bethesda systému hodnocení charakterizována buňkami s jádry 3 - 6krát většími než u normálního jádra intermediální buňky, zde již na úkor cytoplazmy, mluvíme o N/C ratio (nukleoplazmatickém poměru). Jádra mohou být hyperchromatická, okolí jádra vykazuje známky HPV infekce tzv. halo efekt (projasnění cytoplazmy okolo jádra). Prokázané změny doprovázející vliv papilomavirů se zařazují do nálezů LSIL a tento obraz obvykle odpovídá histologickému nálezu CIN I (lehká dysplasie).

Tab. 8: Průměr revizí LSIL na 1 laborantku

	laboratoř		Laborantka A
měsíc	LSIL 27%	LSIL 100%	LSIL
1	9	33,3	0
2	5	18,5	1
3	1	3,7	1
4	1	3,7	0
5	3	11,1	2
6	5	18,5	3
7	1	3,7	0
8	2	7,4	0
9	10	37	1
10	2	7,4	0
11	2	7,4	0
12	5	18,5	0
celkem	46	170,2	8
Průměr na 1 skríněrku: $170,2 : 35 = 4,8$			

Pro nález LSIL bylo u laborantky A v roce 2017 revidováno 8 nálezů – nejvíce v měsíci červnu a potom také v květnu. Ve srovnání s průměrem laboratoře (4,8 preparátů) tento počet je významně vyšší (tab. 8).

3.9.1.3. Nález ASC-H

Atypické dlaždicové buňky, u kterých nelze vyloučit HSIL (atypical squamous cells cannot exclude HSIL), je nález závažný, ale méně častý. Nález je charakterizován především jadernými změnami, které naznačují směr vývoje buněk k HSIL diagnóze – jedná se o hyperchromazii s nepravidelnostmi, ale i relativně malá bledá jádra s atypii, zde může být nález v jednotlivých abnormálních buňkách, ale i v nahloučených buněčných strukturách napodobujících nezralou dlaždicovou metaplazii.

Tab. 9: Průměr revizí ASC-H na 1 laborantku

	laboratoř		Laborantka A
měsíc	ASC-H 27%	ASC-H 100%	ASC-H
1	0	0	0
2	2	7,4	0
3	3	11,1	0
4	3	11,1	0
5	2	7,4	0
6	4	14,8	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	4	14,8	1
10	0	0	0
11	3	11,1	0
12	2	7,4	0
celkem	23	85,1	1
Průměr na 1 skríněrku: $85,1 : 35 = 2,4$			

V této diagnóze (ASC-H) byl u laborantky A v roce 2017 zrevidován 1 nález v měsíci září. Průměr laboratoře v nálezech ASC-H je přepočítán na 2,4 revizí na 1 laborantku. V tomto případě hodnocená laborantka dosáhla nadprůměrného výsledku (tab. 9). Významné je zjištění, že na úrovni laboratoře po extrapolaci počtu revizí pro závažný nález (ASC-H + HSIL + AGC-NEO + AIS) na 100 % reskrínink byl počet revizí t.j. FNV - falešně negativních výsledků (tab. 4, 5 a 6) v roce 2017 nejvyšší v měsíci červen a září (vždy 4x ASC-H), ale i v říjnu (1x AGC-NEO a 1x AIS). Celkový počet relativní chybovosti pro závažné diagnózy (ASC-H + HSIL + AGC-NEO + AIS) za rok 2017 byl 27 revizí → přepočteno na 100% by bylo přesně 100 revizí závažných dg. za tento rok, což činí 3,3% z celkového počtu revizí = 0,05% z celkového součtu reskrínovaných preparátů a 0,01% z celkového součtu cytologických skel v roce 2017.

4. Diskuze

Počet falešně negativních výsledků (FNV) zjištěných rychlým reskríninkem může být považován za ukazatele kvality skríninku. Sledování tohoto parametru umožňuje určit období v roce s vyšším počtem FNV jak na úrovni celého pracoviště, tak na úrovni jednotlivé skríněrky. I když v rámci celého pracoviště není prováděn 100 % reskrínink, lze při celkovém vysokém počtu vyšetření a skrínerek provést extrapolaci k určení celkového počtu FNV. Tato hodnota pak může sloužit jako referenční údaj k

výpočtu průměrného počtu revizí na 1 skriněrku a k dalšímu porovnávání. I když sledujeme revize pro každou kategorii abnormálního nálezu, potenciálně závažné jsou pouze FNV s nálezem ASC-H, HSIL, AGC-NEO, AIS. Počet revizí pro nálezy HSIL, AGC-NEO, AIS je vzhledem k dosažené kvalitě gynekologického skríninku v Bioptické laboratoři tak nízký, že srovnávání nelze provádět. Z hlediska jednotlivé laborantky je korelace kvality práce možná, jak ukázala tato práce. Sledovaná laborantka pro nálezy ASCUS a ASC-H nevykazovala větší chybovost, než je vypočtený průměr laboratoře. Vyšší počet revizí nálezu LSIL je cenným zjištěním s praktickým dopadem na zacílení individuálního samostudia (například sbírkových sad preparátů, které jsou skrinérkám k dispozici).

Skutečnost, že absentovaly revize pro nález HSIL, ACG-NOS, ACG-NEO, AIS svědčí o kvalitě práce skrinérky.

Zjištěné hodnoty FNV v rámci reskríninku (celkově i pro jednotlivé nálezové kategorie dle Bethesda klasifikace) jsou nižší než obecně v literatuře akceptovaná hodnota cca 10-20 % a svědčí o vysoké kvalitě gynekologického skríninku, který toto pracoviště provádí.

Lidský faktor chybovosti v rámci gynekologicko-cytologického skríninku byl ve všech zemích s rozvinutými skríninkovými programy od roku 1988 rozsáhle zkoumán. Jedním z výsledků je pro skriněrku obecně akceptovaná hranice maximálního počtu 100 odečtených preparátů za den.

Pilotní studie hodnocení kvality práce skrinérky představena v této práci by mohla být dále rozvíjena na daném pracovišti s doplňováním údajů dle jednotlivých skrínérek a za jednotlivé roky. Výsledky by mohli přispět k dalšímu zvyšování kvality gynekologického skríninku, k individualizaci samostudia skrínérek a k flexibilní úpravě kontrolních mechanismů laboratoře v určitých obdobích roku s nejvyšším počtem zaznamenaných revizí závažnějších cytologických nálezů.



Obr. 16: 31hlavý mikroskop. Zdroj: www.biopticka.cz

5. Závěr

1. Práce ukázala, že je možné sledovat kvalitu práce skrínerek cytologické laboratoře vyhodnocováním počtu FNV, zjištěné rychlým reskríninkem.

2. Vyhodnocování počtu FNV dokáže odhalit rizikové období s vyšším počtem revizí jak na úrovni skrínérky, tak na úrovni celé laboratoře.

3. V Bioptické laboratoři bylo v roce 2017 reskrínováno cca 27 % preparátů. Toto množství výrazně převyšuje akreditační požadavek (10%) kladený na cytologickou laboratoř v České republice.

4. Zjištěný celkový počet revizí z reskríninku by po extrapolaci pro 100% reskrínink odpovídal hodnotě (**reskríninkem odhalené**) falešné negativity cca 2% pro rok 2017. Obecně v literatuře akceptovaná hodnota **skutečné** falešné negativity je cca 10-20 %. (Kirschner et, 2011, Mubiayi et, 2002, Bofin et, 2007)

5. Celkový počet revizí pro závažnou dg. (tj. ASC-H + HSIL + AGC-NEO + AIS) byl v roce 2017 nejvyšší v měsících červen a září (v obou měsících 4x ASC-H), popřípadě v říjnu (1xAGC-NEO + 1xAIS).

Hypotézy:

1. Chybovost gynekologického skríninku prováděného cytologickou laboratoří určená jako počet revizí nálezů v průběhu roku nevykazuje statisticky významné rozdíly v rámci jednotlivých měsíců.

2. Počet revidovaných reskrínovaných nálezů odečtených jednou laborantkou v jednotlivých měsících v průběhu roku nevykazuje statisticky významné rozdíly.

Zhodnocení předložených hypotéz:

1. Tato hypotéza nebyla potvrzena. Práce prokázala sezónní variabilitu celkového počtu FNV: vyšší výskyt revizí významných nálezů v lednu, dubnu, dále červnu a září, naopak velice nízký počet revizí v listopadu.

2. Tato hypotéza nebyla potvrzena. Práce prokázala sezónní variabilitu počtu FVN odečtených hodnocenou skrínérkou: vyšší výskyt revizí byl zaznamenán v květnu, březnu a září, naopak v lednu, dubnu, srpnu a prosinci nebyly provedeny žádné revize.

Seznam literatury

1. ABRAHAM, Jame, GULLEY, James L a ALLEGRA, Carmen J, ed., c2014. *The Bethesda handbook of clinical oncology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer. ISBN 978-1-4511-8758-8.
2. ALBERTS, Bruce, 2009. *Essential cell biology*. 3rd ed. New York: Garland Science. ISBN 978-0-8153-4129-1.
3. ALBERTS, Bruce, c1998. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Přeložil Arnošt KOTYK, přeložil Bohumil BOUZEK, přeložil Pavel HOZÁK. Ústí nad Labem: Espero. ISBN 80-902906-2-0.
4. BIBBO, 2015. *Comprehensive cytopathology*. 4th ed, Chicago: Elsevier Health Sciences; ISBN: 978-1-4557-5195-2
5. BOFIN, Anna M. et al., 2007. *Papanicolaou smear history in women with low-grade cytology before cervical cancer diagnosis*. *Cancer Cytopathology*, 111(4), 210-216. ISSN 0008-543X.
6. BOULANGER, J-C et al., 2007. *Cytological history of cases of invasive cervical cancer diagnosed in France in 2006*. *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité*, 35(9), 764-771. ISSN 1297-9589.
7. DeMAY, R.M., 2011: *The Art and Science of Cytopathology*, 2nd ed, American Society Clinical Pathology. ISBN 978-0-89189-644-9.
8. DUŠKOVÁ, Jaroslava, 2006. *Základy cytopatologie*. Praha: Karolinum. ISBN 8024611430.
9. FIELDS, Bernard N., KNIFE, David M., HOWLEY, Peter M a GRIFFIN, Diane E. c2001. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0-7817-1832-5.
10. HORÁČEK, Jaroslav a KOBILKOVÁ, Jitka, 2013. *Gynekologická cytodiagnostika: atlas cytohistologických korelací*. Praha: Maxdorf. Jessenius. ISBN 978-80-7345-327-5
11. HORÁČEK, Jaroslav a KINCL, Miloslav, 1996. *Cytologie*. Ostrava: Ostravská univerzita. ISBN 80-7042-312-9.
12. KIRSCHNER, Benny et al., 2010. *Screening history in women with cervical cancer in a Danish population-based screening program*. *Gynecologic Oncology*, 120(1), 68-72. ISSN 0090-8258.

- 13.** KOBILKOVÁ, Jitka, 2006. *Gynekologická cytodiagnostika*, 2.vyd. Galén, ISBN: 80-7262-313-3
- 14.** KOBILKOVÁ, Jitka, 2003. *Základy cytopatologie*. Praha: Karolinum. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0608-9.
- 15.** KOBILKOVÁ, Jitka a SIRACKÝ, Jan, 1990. *Cytodiagnostika v gynekologii*. 2. vyd., Praha: Avicenum. ISBN 80-201-0001-6.
- 16.** KOSS, Leopold G., MELAMED, Myron R. a KOSS, Leopold G, c2006. *Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0-7817-1928-3.
- 17.** KUBÁLEK, Vojtěch, 2001. *Úvod do cytodiagnostiky*. V Brně: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 8070133333.
- 18.** MUBIAYI, N. et al., 2002. *Cytological history of 148 women presenting with invasive cervical cancer*. *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité*, 30(3),210-217. ISSN 1297-9589
- 19.** RENSHAW AA, DiNISCO SA, MINTER LJ, CIBAS ES, 1997. *A more accurate measure of the false-negative rate of Papanicolaou smear screening is obtained by determining the false-negative rate of the rescreening process*. *Cancer cytopathology*. 81(5), 272-6. ISSN: 1934-662X.
- 20.** SLOBODA, Juraj, MASZTICSOVÁ, Gabriela a DRGONOVÁ, Marcela, 1991. *Klinická cytológia: učebný text pre pomaturitné špecializačné štúdium stredných zdravotníckych pracovníkov*. Martin: Osveta. ISBN 80-217-0460-8.
- 21.** SOLOMON, Diane a NAYAR, Ritu, c2004. *The Bethesda system for reporting cervical cytology: definitions, criteria, and explanatory notes*. 2nd ed. New York: Springer. ISBN 0-387-40358-2.
- 22.** VAJNER, Luděk, UHLÍK, Jiří a KONRÁDOVÁ, Václava, 2018. *Lékařská histologie I.: cytologie a obecná histologie*. 2.vydí. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-4107-2.
- 23.** WILBUR, D. C., 1997. *False negatives in focused rescreening of Papanicolaou smears: how frequently are 'abnormal' cells detected in retrospective review of smears preceding cancer or high-grade intraepithelial neoplasia?* *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 121(3), 273-276. ISSN 0003-9985.
- 24.** ZÁVODSKÁ, Radka, 2006. *Biologie buněk: základy cytologie, bakteriologie, virologie*. Praha: Scientia. Biologie pro gymnázia. ISBN 80-86960-15-3.

Seznam e-zdrojů

1. KAŠPÍRKOVÁ, Jana, ONDIČ, Ondřej, 2013. *Stručný přehled komerčních souprav pro detekci slizničních lidských papilomavirů (HPV)*. [online]. Zdravotnictví a medicína. Praha: Mladá fronta. [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/strucny-prehled-komercnich-souprav-pro-detekci-sliznicnich-lidskych-papilomaviru-hpv-473059>
2. KINKOROVÁ LUŇÁČKOVÁ, Iva, 2018. *Primární prevence karcinomu děložního hrdla - HPV vakcinace*. [online]. XXVI. Cytologický den, 2.–3.10.2018, Litomyšl. Společnost pro klinickou cytologii ČLS JEP. [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: https://cyt.cz/_files/200000227-cb1d2cc1fa/02-HPV%20vakcinace.pdf
3. KOBILKOVÁ, Jitka, 2015. *Gynekologická cytodiagnostika na prahu 3. tisíciletí*. [online]. Zdravotnictví a medicína. Praha: Mladá fronta. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/gynekologicka-cyodiagnostika-na-prahu-3-tisicileti-168659>
4. *Cervikální cytologie – Kritéria kvality*, 2019. [online]. Bioptická laboratoř. [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <http://www.cipek.cz/kvalita/kriteria.php>
5. *HPV.cervix – Vznik a vývoj infekce*, 2006. [online]. Bioptická laboratoř s.r.o. [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <http://www.hpv.cervix.cz/vznik-vyvoj-infekce.html>
6. Mikroskopy. [online]. Optical Service s. r. o. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: <https://www.opticalservice.cz/mikroskopy/>
7. *Projekt zvýšení návštěvnosti preventivních screeningových vyšetření a zahájení celorepublikové informační kampaně*, 2014. [online]. Ministerstvo zdravotnictví ČR. [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: https://www.mzcr.cz/dokumenty/projekt-zvyseni-navstevnosti-preventivnich-screeningovych-vysetreni-a-zahajeni-c_8766_3030_1.html
8. *Průběh HPV infekce*, 2019. [online]. HPV Guide. [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <http://www.hpv-guide.cz/teorie/prubeh-hpv-infekce>
9. *Statistika cytologií 1999-2018*, 2019. [online]. Bioptická laboratoř s.r.o. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: <http://www.biopticka.cz/cz/sluzby/doc/Statistika%20cytologii%201999-2018.xlsx>
10. *Vývoj od Papanicolaouova nátěru k dnešnímu screeningu*, 2015. [online]. Kurz Cervikální cytologie. Eurocytology, Leonardo Da Vinci project. [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://www.eurocytology.eu/cs/course/970>

11. *Zpracování cytologických vzorků v laboratoři*, 2015. [online]. Kurz Cervikální cytologie. Eurocytology, Leonardo Da Vinci project. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: <https://www.eurocytology.eu/cs/course/1129>

Seznam grafů, tabulek a obrázků:

Obr. 1: Vývoj incidence a mortality C53

Obr. 2: Optický mikroskop

Obr. 3: LSIL.

Obr. 4: HSIL

Obr. 5: AIS

Obr. 6: Atrofický stěr

Obr. 7: *Candida albicans*

Obr. 8: Aktinomykoza

Obr. 9: *Trichomonas vaginalis*

Obr. 10: *Gardnerella vaginalis*

Obr. 11: HSV

Obr. 12: Normální cytologický obraz NILM

Obr. 13: Identifikace revizí laborantky A

Obr. 14: Grafické znázornění revizí laboratoře

Obr. 15: Identifikace revizí v cytologické laboratoři

Obr. 16: 31hlavý mikroskop

Tab. 1: Počty odečtených a reskrínovaných preparátů hodnocených laborantkou A

Tab. 2: Sumarizace závěrů cytologických vyšetření v Biooptické laboratoři v roce 2017

Tab. 3: Přehled celkového počtu gyn.cytologií, počtu reskríninků a revidovaných skel

Tab. 4: Revize cytologických nálezů provedené v roce 2017

Tab. 5: A→vzestupné pořadí měsíců dle počtu revizí v nálezech ASCUS, LSIL, ASC-H
B→vzestupné pořadí měsíců v roce dle celkového počtu preparátů

Tab. 6: Revize laborantky A za rok 2017

Tab. 7: Průměr revizí ASCUS na 1 laborantku

Tab. 8: Průměr revizí LSIL na 1 laborantku

Tab. 9: Průměr ASC-H na 1 laborantku

Seznam zkratek

ASC – atypical squamous cell

ASCUS - atypical squamous cells of undetermined significance

ASC-H - atypical squamous cells, cannot exclude high grade squamous intraepithelial

LSIL - low grade squamous intraepithelial lesion

HSIL - high grade squamous intraepithelial lesion

AIS – adenocarcinoma in situ

AGC (NOS) - atypical glandular cells cells not otherwise specified

AGC (NEO) - atypical glandular cells favour neoplastic

IQC - interní kontroly kvality

EQA - external quality assurance systems

FNV – falešně negativní výsledky

NA - numerická apertura

TBS – Terminology Bethesda System

HPV – human papilomavirus

HSV – herpes virus

CMV - cytomegalovirus

HIV - human Immunodeficiency Virus

IUD - intrauterine device (nitroděložní tělísko)

TAG - triacylglyceroly

LDL - low density lipoprotein

CIS – carcinoma in situ

DNA – deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

PAP test – test dle Papanicolaoua

LBC – liquid based cytology

E6, E7 - onkoproteiny

IARC – International Agency for Research on Cancer

PCR - polymerase Chain Reaction

NILM - negative for intraepithelial lesions or malignity