



MALMÖ HÖGSKOLA

ARBETSBOK
KLINISK CYTOLOGI
VFU HT12-VT13

C S

HANDLEDARE: I C

PROVHANTERING

Till avdelningen för Klinisk Cytologi på centralsjukhuset i Kristianstad skickas cellprover både från interna (sjukhus, vårdcentraler) och externa (privata kliniker) kunder inom Region Skåne. Cellproverna utgörs av exempelvis blåssköljväska, borstprov från vagina/bronker, urin eller aspirationscytologi, som är cellprover tagna med finnålsaspiration från misstänkt tumörväxt. Proverna kan bestå av ofixerade vätskor såväl som färdiga utstryk som är sprit- eller luftfixerade. Nedan följer en kort beskrivning av de prover som kan inkomma till klinisk cytologi:

Exsudat

Till exsudat hör *ascites*, vätska från *pleura* och *pericard*. Till exudat räknas även buksköljväska eftersom det prepareras och bedöms på samma tillvägagångssätt. Exsudatprov kommer ofixerat med tillsats av heparin till laboratoriet. Heparin tillsätts för att förhindra koagulation i provet [1,2].

Urin/Blåssköljväska

Urin- och blåssköljvätskor skickas ofixerade i ett konat plaströr med skruvkork till cytologilaboratoriet för analys. På remissen skall det stå angivet om provet är kastat, tappat från kateter eller blåssköljväska.

Blåssköljväska ger generellt ett bättre underlag för diagnostik och erhålls genom att blåsan sköljs med steril isoton koksaltlösning. Provet samlas sedan upp i ett konat plaströr med skruvkork och skickas omgående till cytologilaboratoriet [1,2].

VS – Vagnial Smear

Provet tas med en borste från *bakre fornix* (vagina), *portio* samt *endocervix* enligt speciell teknik. Borsten vispas sedan runt i en behållare med PreservCyt-lösning för att lösgöra cellmaterialet och skickas till laboratoriet för preparering.

Remissen bör innehålla information om indikation till provtagning, uppföljning efter behandling, datum för sista menstruation, graviditet, hormonbehandling m.m. [1,2].

Cystvätska

Tumör som utgörs av en cysta aspireras, och vätskan/sekretet skickas till cytologilaboratoriet i ett tätslutande kärl för vidare preparering [1,2].

Finnålspunktioner

Vid utredning av misstänkta tumörer och metastaser görs en finnålspunktion (FNA). Det erhållna materialet stryks ut på objektglas och fixeras i 95 % etanol alternativt luftfixeras. Material från FNA kan överföras i cytolytväska, för att möjliggöra analys med immunologiska markörer [1,2].

Bronkialsköljväska/Borstprov

Borstprov tas i samband med bronkoskopi. Epitelet borstas försiktigt och uppsamlade celler stryks ut på objektglas som lufttorkas. Borsten vispas sedan runt i ett provrör med koksaltlösning som skickas till cytologilaboratoriet tillsammans med objektglaset.

Vid sköljning av bronkerna spolras det aktuella området med steril isoton koksaltlösning och vätskan samlas upp i provrör [1,2].

Det är viktigt att remissen innehåller uppgifter om var provet är taget.

Sputumprov

Sputum består av material från de nedre luftvägarna som hostats upp av patienten. Sputum samlas upp i ett speciellt provkärl för sputumprov och fixeras i 70 % etanol [1,2].

Likvor

Likvor, eller cerebrospinalvätska, tappas från patienten genom ryggmärgspunktion med nål. Provet skickas ofixerat direkt till cytologilaboratoriet i ett konat plaströr med skruvkork [1,2].

Vid upppackning av mottagna prover kontrolleras att patientuppgifter stämmer överens med insända prover och tillhörande, och att antalet skickade behållare och glas är korrekt mot antalet mottagna (om det finns angivet på remissen).

Remisserna registreras dataprogrammet Sympathy och tilldelas ett unikt CK/VK-nummer (Cytologi/Vaginal Kristianstad) med tillhörande etiketter – en till remiss och en per provkärl/objektglas.

Remisser samt behållare läggs sedan ut till cytologilaboratoriet för *preparering* [1,2].

PUNKTIONSMOTTAGNING

I Kristianstad sköts punktionsmottagningen av en cytopatolog samt en assisterade BMA eller cytodiagnostiker. Syftet med fin- och mellannålpunktion är att utreda misstänkta tumörer utan att patienten skall behöva genomgå kirurgiska ingrepp. Till punktionsmottagningen kommer inremitterade patienter samt patienter som genomfört mammografi vid bröstmottagningen där punktion är indicerat. Cytopatologen går igenom samtliga remisser för de olika patienterna medan assisterande BMA/cytodiagnostiker förbereder material såsom objektglas, kyvetter med 95 % etanol för fixering, punktionskanyler etc. Remisserna innehåller bakgrundsinformation om patientens besvär samt frågeställning som fyllts i av remitterande läkare. Om patienten har varit på röntgen innan punktion bör en kopia på röntgensvaret bifogas remissen. Frågeställningar som förekommer är till exempel ”maligna celler?”, ”lymfom?”, ”tumör?”, ”metastas?” m.m. När det har blivit dags att ta emot första patienten går BMA/Cytodiagnostiker ut till väntrummet och ropar upp patientens namn. Patienten får sedan själv bekräfta sin identitet genom att tala om sitt personnummer vilket stäms av mot remiss. Patienten visas in till undersökningsrummet där cytopatologen tar emot. Cytopatologen går igenom anamnes och eventuella tidigare behandlingar med patienten, sedan palperas det aktuella området som skall punkteras. Huden desinficeras med 70 % etanol därefter utförs punktionen [1].

Finnålpunktion

Majoriteten av de punktioner som utförs för att samla material till cytologisk analys görs med FNA. Fördelen med metoden är att det inte fordrar bedövning av området som skall punkteras samt att utförandet går snabbt och smidigt.

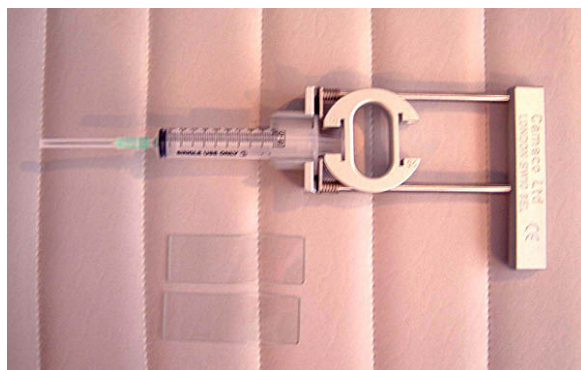


Bild 1: Kanyl, spruta samt specialdesignad hållare för FNA.

Vid FNA fixerar cytopatologen det aktuella området mellan två fingrar och sticker nålen rakt in. Nålen förs fram och tillbaka med stadiga rörelser över förändringen vilket resulterar i att celler sugas upp med kapillärkraft i nålen. Nålen dras ut och cellerna stryks ut på ett objektglas märkt med patientens namn och personnummer som fixeras omedelbart i 95 % etanol eller lufttorkas. Utstryk som spritfixeras får ej tillåtas lufttorka eftersom cellerna tenderar att expandera något vid lufttorkning, vilket gör att de lätt kan förväxlas med maligna tumörceller och orsaka ett falskt positivt resultat. Material från FNA kan även suspenderas i cytolyt-vätska och prepareras för färgning med immunologiska markörer. Spritfixerade glas märks med "S" och luftfixerade glas märks med "L".

Om cytopatologen önskar göra en DNA-extraktion på cellprovet används *Whatman FTA Microcard*. När cellerna appliceras mot kortet absorberas provet in i membranet, vid kontakt med den preparerade ytan lyseras cellerna och proteiner denatureras. Nukleinsyrorna absorberas in i kortet, isoleras och stabiliseras utan degradering på grund av nukleaser, oxidation etc. Kortet är ljuskänsligt och lufttorkas i mörkt utrymme i ca 60 minuter innan det försluts med tillhörande lock. Patientens namn och personnummer samt "PCR" noteras på kortet, för att sedan skickas till Lund tillsammans med remisskopia för PCR amplifiering.

Om materialet skall analyseras med flödescytometri skall cellerna suspenderas ner i en behållare med Hank's saltlösning, vars syfte är att upprätthålla fysiologiskt pH i provet. På remissen antecknas "FLÖDE". Behållare med remisskopia skickas sedan upp till Lund för flödescytometrisk analys.

En enda punktion kan ge tillräckligt med material för diagnos men generellt görs mellan 2-3 FNA och när cytopatologen har samlat tillräckligt med material plåstras patienten om.

På remissen antecknas antalet glas, färgningar som skall utföras samt eventuella rör med cystvätska alternativt om celler suspenderats i cytolytvätska alternativt Hank's lösning[1].

Mellannålspunktion

En mellannålspunktion utförs på liknande sätt som vid finnål, dock är provtagningen smärtsam och kräver att patienten lokalbedövas. Vid en mellannålsbiopsi stansas en cylinderformad vävnadsbit ut med hjälp av ett specialdesignat instrument med avtryckare. Vävnadsbiten, som är mellan ca 10-30 millimeter, avlägsnas från nålen (helst i ett stycke) och fästes på ett Millipore filterpapper. Om flera vävnadsbitar skall läggas i samma provkärl görs en anteckning om undernummer/lokalisering på filterpappret. Om cytopatologen vill verifiera att biopsin är representativ görs ett imprint på ID-märkta objektglas. Biopsin läggs sedan i ett provkärl med 4 % fosfatbuffrad formaldehyd (10 % formalin). Imprinten färgas sedan med May-Grünwald-Giemsa snabbfärgning.

Glaset doppas då 5 gånger i 95 % etanol för snabbfixering. Sedan doppas glaset 5 gånger i May Grünwald färglösning samt 5 gånger i Giemsa färglösning. Objektglaset spolas försiktigt med vatten för att avlägsna överflödigt färg. Cytopatologen kan sedan mikroskopera materialet för att se om fler biopsier behöver tas. I de fall DNA-analys skall göras kan biopsin pressas lätt mot ett *Whatman FTA Microcard* innan det fixeras i fomalin. Kortet behandlas sedan på samma vis som vid finnålspunktion, dock kan torkningstiden halveras. När punktionen är färdig plåstras patienten om och uppmanas att inte duscha samma dag för att minska infektionsrisken vid punktionsstället. På remissen antecknas hur många biopsier som tagits samt eventuella glas. Remiss, provkärl och eventuella glas lämnas sedan till avdelningen för klinisk patologi för vidare hantering [1].

PREPARERING

Innan proverna kan diagnostiseras i mikroskop måste de prepareras. *Exudat* kommer ofixerade till laboratoriet. Om provet är mycket blodigt tillsätts cytolyt-lösning för att lysa erytrocyterna. Provet skakas lätt och 20 ml överförs till två centrifugeringsrör. Rören centrifugeras sedan på 3000 rpm i 10 minuter. Supernatanten sugas av med pipett och bottenparterna stryks ut på två objektglas som är etiketterade med remissens CK-nummer. 2 glas fixeras i 95 % etanol i 10 minuter och 2 glas lufttorkas. De spritfixerade glaserna märks med ett "S" och sätts i rack för färgning med Papanicolaou specialfärgning (PAP). Lufttorkade glas märks med ett "L" och placeras i rack som färgas med May-Grünwald-Giemsa specialfärgning (MGG). *Exudat* kan även prepareras till cellblock/pellet för att få fram snittbart material för att möjliggöra immunhistokemisk färgning.



Bild 2: Vid Klinisk cytologi i Kristianstad används Eppendorf centrifuge 5702.

Urin/blåsköljväska samt *borstprov* lösta i koksalt/PreservCyt centrifugeras i 3000 rpm i 10 minuter. Supernatanten hålls av och bottenparten löses upp i vätska från en burk med PreservCyt-lösning avsedd för ThinPrep-preparering. Materialet blandas väl med lösningen och hålls tillbaka i PreservCyt-burken. Burken får vila i 15 minuter innan cellerna bearbetas i ThinPrep 2000-processorn enligt gällande rutiner. De färdigpreparerade glaserna fixeras i 95 % etanol i ca 10 minuter och färgas i PAP. De inskickade borstprovets som strukits på objektglas är lufttorkade och färgas med MGG.

Cystvätska centrifugeras som prover nämnda ovan, supernatanten sugas av och bottenparten stryks på två objektglas; ett spritfixeras i 95 % etanol och färgas med

Mayer's Hematoxylin & Erythrosin (H&E) och ett glas lufttorkas och färgas med MGG.

Bronkiälsköljväska/sekret centrifugeras som prover nämnda ovan och supernatanten hålls sedan av. Vid extra kompakt/slemmigt prov används en pipett för att hacka och blanda runt bottensatsen till en homogen blandning. Vätska från en PreservCyt burk slås på och provet blandas med omsorg innan det hålls tillbaka i PreservCyt-burken. Provet får vila i ca 15 minuter och bearbetas i ThinPrep 2000-processorn enligt gällande rutiner. De färdigpreparerade glaserna fixeras i 95 % etanol i ca 10 minuter och färgas sedan med PAP.



Bild 3: ThinPrep 2000-processorn används för preparering av vätskor. Processorn bearbetar cellsuspensionen till ett enkelt och jämnt skikt och pressar det mot objektglaset.

Sputum inkommer i speciellt avsett provkärl och är fixerat i 70 % etanol. Ur sputumprovet väljs blodigt, missfärgat eller annat avvikande material ut från två separata områden. Materialet överförs till två etiketterade objektglas. Med hjälp av ett annat objektglas fördelas materialet i en roterande rörelse, ibland kan en droppe vatten behövas för att mjuka upp hårt material. Glaserna får lufttorka och färgas sedan med PAP.

Likvorvätska inkommer ofixerat till laboratoriet. Om provmängden överstiger 1,5 ml centrifugeras det vid 3000 rpm i 10 minuter. Supernatanten sugas sedan av tills ca 1 ml vätska finns kvar i provet som blandas om med bottensatsen. 2 etiketterade objektglas samt filter monteras sedan i Shandon Cytospin 3. 200 µl av provet överförs till respektive filter, och centrifugeras sedan på 600 rpm i 6 minuter. Glaserna får lufttorka och färgas med MGG.



Bild 4: Shandon CytoSpin 3 från Thermo Scientific med avsedda filter.

Material från *finnålspunktion* kommer färdigstruket på objektglas, och/eller i vätska. Vätskan centrifugeras som ovan beskrivet och stryks på objektglas. Spritfixerade glas färgas med H&E medan lufttorkade glas färgas med MGG. Om

finnålsmaterialet skall färgas med *immunologiska markörer* används material i cytolöslösning. Beställning på vilka antikroppar som skall användas bestäms av ansvarig cytopatolog och finns antecknade på remissen. Till immunbeställningar används s.k. plus-glas med ytbehandling som gör att cellerna fäster extra hårt mot glaset. Ett glas per beställd antikropp förbereds genom att CK-nummer, årtal samt beställd antikropp antecknas på glasets matrand med blyerts. Provet bearbetas sedan i ThinPrep 2000-processorn. Om provet utgörs av en mycket liten mängd måste det delas upp innan provet körs i ThinPrep-processorn, eftersom hela provets mängd annars kommer att gå åt till det första objektglaset och inte lämna några celler kvar till resterande glas. På så vis fördelas cellerna i lika mängd över alla glas som skall analyseras. Glasen lufttorkas minst ett dygn i kylskåp på en bricka innan de lämnas in till immunologifärgningslaboratoriet. Remissen läggs på anvisad plats i patologens färgningslaboratorium [2].

FÄRGNING

I färgningslaboratoriet jobbar vanligtvis en BMA som ansvarar för färgning, montering och framläggning samt beredning av olika lösningar. I Kristianstad färgas samtliga glas i en automatiserad färgningsmaskin; Leica Autostainer XL. Maskinen kan laddas med flera prover som kör simultant i olika specialfärgningsprogram och behöver inte administreras under tiden programmen körs, vilket underlättar för samtidig hantering av övriga arbetsuppgifter. Till färgningsmaskinen är även en monteringsmaskin ansluten som monterar samtliga glas efter hand de är färdiga i färgningsprogrammet.



Bild 4: I Kristianstad används färgningsmaskin av typ **Leica Autostainer XL** samt monteringsmaskin av typ **Leica CV5030** till alla färgningar som utförs vid Cytologilaboratoriet.

Papanicolaou

Denna färgning används ofta inom cytologi då den erbjuder en mycket bra bild av cellernas morfologi, både kärna och cytoplasma. Som kärnfärgning används Harris hematoxylin. Första cytoplasmafärgningen, OG-6, består av alkohollöst Orange G som färgar keratiniserade celler. Den andra cytoplasmafärgningen, EA, består av Light green och Eosin Y. EA är en polykrom färglösning som färgar cellernas cytoplasma beroende på innehåll vilket möjliggör en separation av olika celltyper vid mikroskopering. Metaboliskt inaktiva celler färgas i olika nyanser av rosa, medan metaboliskt aktiva celler färgas i olika nyanser av blå-grönt. Eosin Y färgar ytligt skivepitel, nucleoli, erythrocyter och cilier. Light green färgar

mellanliggande skivepitel, parabasala och cylindriska celler, histiocyter, leukocyter, underdifferentierade carcinom (små- respektive storcelliga) samt celler från adenocarcinom. Eosin Y, består av mindre molekyler som penetrerar cellerna snabbt. Eosin Y ersätts sedan av Light green, som består av större molekyler i de celler som är metaboliskt aktiva. Båda cytoplasmafärgerna använder fosfowolframsyra som betmedel för att binda in de olika strukturerna [3].

Hematoxylin & Erythrosin (H&E)

Glas med material från cystvätska samt spritfixerade finnålsaspirat färgas med Hematoxylin & Erythrosin (H&E).

Som kärnfärgning används Mayer's hematoxylin och för färgning av övrig struktur (cytoplasma, bindväv, etc.) används Erythrosin. Mayer's Hematoxylin är en progressiv kärnfärgning där natriumjodid genererar en oxidation av hematoxylin till den reaktiva anjonfärgen hematein och aluminium fungerar som betmedel. Hematein bildar då ett komplex med aluminium, så kallad *färglack*, som är nödvändig eftersom hematein i egenskap av anjonfärg inte har någon affinitet för nukleinsyrorna i cellkärnan. Aluminiumsaltet ger då lösningen en positiv nettoladdning som binder de negativt laddade fosfatgrupperna i cellkärnans kromatin. Tillsats av citronsyra och klorhydrat justerar pH och reducerar skumbildning i lösningen. Erythrosin färgar sedan cytoplasma i olika nyanser av rosa-orange beroende på cytoplasmans innehåll [3].

May Grünwald-Giemsa

Med MGG färgas anjoner blå av metylenblå medan katjoner färgas rosa av eosin. Bakterier färgas blå beroende på deras innehåll av nukleinsyror. MGG är en polykrom färg vilket innebär att den består av flera färger som ger olika nyanser vid färgning. När metylenblå förbereds vid alkaliskt pH bildar den spontant andra färger, främst azure A & B [3].

FRAMLÄGGNING/MIKROSKOPERING

Glaset som färgats och monterats paras ihop med remisserna och sorteras i nummerordning på brickor. Brickorna med färdiga glas läggs ut ihop med tillhörande remisser på anvisad plats där cytopatologerna själva kan hämta sina respektive prover för diagnostik. Resterande prover som inte lämnas till cytopatolog diagnostiseras av en cytodiagnostiker. En cytodiagnostiker screenar och bedömer samtliga VS och förscreenar exsudat, bronkoskopier och urin. Vissa av dessa prover bedöms även av cytodiagnostikern. Vid mikroskoperingen jämförs förhållandet mellan cytoplasma-cellkärna, hur kromatinteckningen ser ut i cellkärnan samt andra avvikelser. Vaginalprover bedöms av en cytodiagnostiker upp till cancer in situ respektive cylindercellsatypi, och diagnosen får alltid ett andra utlåtande från en annan cytodiagnostiker innan det färdiga svaret lämnas ut. Vid mikroskopering får cytodiagnostikern information om patienten som står angivet på remissen som kan påverka bedömningen av provet. Till exempel kan ett VS hos en patient som nyligen haft sin menstruation innehålla mycket celler från livmoderslemhinnan. Om samma cellbild förekommer hos en patient som inte menstruerar kan detta dock indikera en atypi, varför datum för senaste mens bör vara antecknat i remissen. Human Pappilomavirus (HPV) är ett vanligt

förekommande tillstånd som ses vid VS-screening. HPV finns i över 90 olika typer. HPV delas in i låg- respektive högrisktyp där nr 16, 18 och 32 är de vanligast förekommande bland högrisktyperna. Vanliga HPV indikationer är s.k. *koilocyter* (cellernas cytoplasma ser ut att ha flutit ut mot cellväggen och är blekt mot kärnan), flerkärniga celler, hyperkeratos etc. HPV anses vara den största orsaken till utveckling av cervixcancer [1].

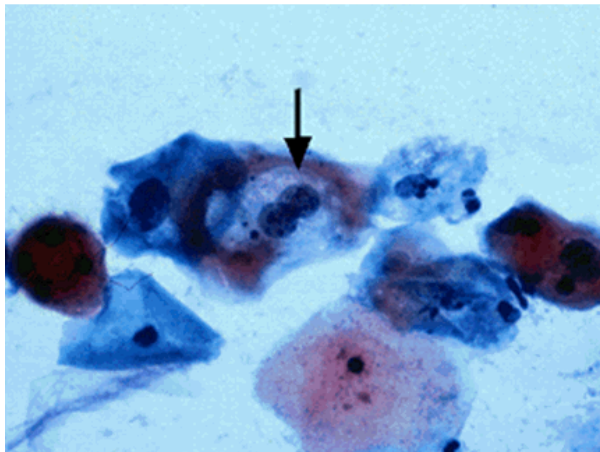


Bild 5: Koilocyt i ett vaginalprov färgat med PAP.

REFLEKTIONER

Under min praktik i Kristianstad har jag fått gå bredvid en cytodiagnostiker och lära mig hur arbetet går till vid punktionsmottagning, preparering och färgning, samt mikroskopering. Trots att jag spenderat kort tid vid placeringen har jag insett vilken enorm kompetens som finns bakom titeln, varför det är viktigt att yrkesrollen stimuleras och kompetensen används på rätt sätt. Patientkontakt och samverkan är viktigt för att få rätt prover till det diagnostiska arbetet. Det är av stor betydelse för framtiden att cytodiagnostiker och BMA inom klinisk cytologi tillåts ta mer ansvar eftersom det underlättar patologernas arbete och därmed diagnostiseringen. Cytologiska analysmetoder har under de senaste decennierna fått ta en allt större plats då många sjukdomstillstånd kunnat upptäckas och behandlas i god tid tack vare s.k. ”screening”. I många fall har cytologin kunnat ge indikation om patologiska tillstånd utan att ett kirurgiskt ingrepp varit nödvändigt.

Trots att mycket arbete sker i nära samarbete med läkarna är det viktigt att cytodiagnostiker har ett eget diagnostiskt ansvar. Om cytodiagnostikernas kunskap och erfarenheter inte utnyttjas på rätt sätt och får sitt erkännande inom vården riskerar yrkesrollen att försvinna och ersättas av annan kompetens som inte kan täcka hela kunskapsområdet. Eftersom det i dagsläget råder brist på cytodiagnostiker är det av min uppfattning att det är viktigt att kompetensen i första hand används till diagnostik.

Arbetsbok i Klinisk Cytologi är faktagranskad och godkänd av ansvarig handledare för VFU i Kristianstad.

Datum

Signatur

REFERENSER

1. Information inhämtad via dialog med personal anställd vid Klinisk Cytologi i Kristianstad.
2. Pärm med lokala rutiner kring preparering/Cytologilaboratoriet i Kristianstad
3. Histotechnology – a self-instructional text, 3rd edition, Freida L. Carson & Christa Hladik, American society for clinical pathology press, Chicago, USA 2009.

BILDER

Bild 1: Hämtad från

<http://www.hkma.org/english/cme/onlinecme/cme200307set.htm> (Hämtad som senast 2013-03-02)

Bild 2: Hämtad från

http://www.eppendorf.com/int/index.php?pb=0a44b57da878580f&action=product_s&contentid=1&catalognode=48180 (Hämtad som senast 2013-03-02)

Bild 3: Hämtad från

http://www.hologic.de/index.php/thinprep/informationen_fur_das_labor/gerate/t-2000-prozessor (Hämtad som senast 2013-03-02)

Bild 4: Hämtade från <http://www.hudsjunk.pwp.blueyonder.co.uk/work.html>

respektive <http://www.hellotrade.com/biomedical-polymers/product.html> (Hämtade som senast 2013-03-02)

Bild 5: <http://www.leicabiosystems.com/products/staining-coverslipping-workstations/details/product/leica-st5010/gallery/> (Hämtad som senast 2013-03-02)

Bild 6: <http://radiology.uchc.edu/eAtlas/GYN/2035b.htm> (Hämtad som senast 2013-03-02)