



JÖNKÖPING UNIVERSITY
School of Health and Welfare

METODUTVECKLING AV EN VÄTSKEBASERAD CYTOLOGISK METOD VID PREPARERING AV EXSUDAT

En jämförelse med konventionell cytologi

HUVUDOMRÅDE: Biomedicinsk laboratorievetenskap

FÖRFATTARE: Alexander Jonsson, Mena Said

HANDLEDARE: Anna-Karin From, Jan Strindhall

EXAMINATOR: Maria Faresjö

JÖNKÖPING 2016 maj

Sammanfattning

Två huvudsakliga metodprinciper används inom cytologi för diagnostisering av cellförändringar, nämligen konventionell och vätskebaserad metod. De kan båda appliceras på såväl gynekologiska som icke-gynekologiska prover, där den senare bland annat omfattar olika sorters exsudat. Syftet med den här studien var att utveckla metoden för den vätskebaserade metoden så att etanolfixerade exsudat kunde prepareras och även påvisa bättre resultat än då de preparerats med konventionell metod. För att göra detta har 61 unika prover kategoriserade som exsudat preparerats totalt, varav 61 med konventionell metod, 54 med vätskebaserad metod och 22 med vätskebaserad metod med tillsats av ättiksyra. De färdiga glasen bedömdes sedan i mikroskop och gavs scorevärden utifrån fyra parametrar: mängden celler exklusive inflammatoriska celler; bedömbarheten av cellmorfologin; mängden inflammatorisk komponent samt mängden bakgrundsmaterial. Resultaten visade ingen förbättring mellan de glas som preparerats med konventionell eller vätskebaserad metod. Däremot visade resultaten för de ättiksyra-behandlade proverna på förbättrade scorevärden jämfört med de andra metoderna.

Som slutsats drogs att vätskebaserad metod med tillsats av ättiksyra uppnår syftet eftersom det reducerar mängden bakgrundsmaterial, förekomst av ring på objektglaset samt vidhåller en god cellmorfologi, vilket gör proverna lättare att diagnostisera för cytodiagnostikerna.

Nyckelord: Exsudat; Konventionell cytologi; Vätskebaserad cytologi; Ättiksyra

Summary

Method development of a liquid-based cytological method using exudate – a comparison with conventional method

Two main principles is used within cytology in order to diagnose cytological abnormalities; conventional and liquid-based cytology. Both methods can be applied on both gynaecological and non-gynaecological samples of which the later includes samples categorized as exudate. The aim of this study was to develop the method for liquid-based cytology so that exudate fixated with ethanol could be prepared and also achieve better results compared to conventional method. In order to do so, 61 unique samples were prepared of which 61 with conventional method, 54 with liquid-based method and 22 with liquid-based method with added acetic acid. The slides was then examined in microscope and was given score values within four parameters: amount of cells; cell morphology; amount of inflammatory component and amount of background. The results indicated no difference between the slides prepared with conventional or liquid-based method. However, the slides prepared with addition of acetic acid indicated more opportunistic score values when compared.

The conclusion was that liquid-based method with the addition of acetic acid did satisfy the aim of this study as it reduces the amount of background, reduces “ring formation” on the slides and preserve the cells morphology well, which makes the samples easier to diagnose.

Keywords: Exudate; Conventional cytology; Liquid-based cytology; Acetic acid

Innehållsförteckning

| | |
|---|----|
| Bakgrund | 1 |
| Exsudat | 1 |
| Konventionell jämfört med vätskebaserad cytologi | 1 |
| Vätskor inom vätskebaserad cytologi | 2 |
| Nuvarande situation | 2 |
| Tidigare studier i området | 3 |
| Syfte | 4 |
| Material och metod | 5 |
| Omfattning | 5 |
| Bortfall och selektion | 5 |
| Provberedning | 6 |
| Konventionell metod | 7 |
| Vätskebaserad metod | 7 |
| Vätskebaserad metod med tillsats av ättiksyra | 7 |
| Färgning | 8 |
| Bedömning av resultat | 8 |
| Utomstående bedömning | 9 |
| Etiska överväganden | 10 |
| Resultat | 11 |
| Konventionell metod | 11 |
| Vätskebaserad metod | 12 |
| Vätskebaserad metod med tillsats av ättiksyra | 13 |
| Korrigerade värden för jämförelse | 14 |

| | |
|---|----|
| Utomstående bedömning | 16 |
| Diskussion | 18 |
| Konventionell jämfört med vätskebaserad metod | 18 |
| Fällning under prepareringsprocessen | 18 |
| Förekomst av ring på objektglasen | 19 |
| Tillsats av ättiksyra jämfört med de två andra metoderna | 19 |
| Ättiksyrans inverkan | 20 |
| Volymens inverkan | 21 |
| Cytopatologens preferenser | 21 |
| Rekommendation för en poster | 21 |
| Vidare studier | 22 |
| Fördelar och nackdelar | 22 |
| Slutsatser | 23 |
| Omnämmanden | 24 |
| Referenser | 25 |
| | |
| Bilaga 1 Makroskopiska översiktsbilder på ett urval av glasen | |
| Bilaga 2 Mikroskopiska översiktsbilder på ett urval av glasen | |

Bakgrund

Inom cytologi förekommer två huvudsakliga metodprinciper, nämligen konventionell och vätskebaserad cytologi. Båda metodprinciperna kan appliceras inom såväl gynekologisk som icke-gynekologisk cytologi, varav den senare omfattar prover från exempelvis bukspottkörteln, sköldkörteln samt kroppsvätskor såsom urin och olika sorters exsudat [1].

Exsudat

Exsudat är ”sjukligt bildade vätskor” som ansamlats i kroppens olika hålrum som en vanlig komplikation vid cancer. De innehåller exfoliativa celler och är därför viktiga för cancerdiagnostiken. Exsudat återfinns bland annat som pleuravätska (i lungor), ascitesvätska (i bukhålan) och cardiavätska (i hjärtat), men även icke-kroppsliga vätskor såsom buksköljvätska kan innehålla exfoliativa celler från cancertumörer. Cirka en femtedel av de exsudat som upptäcks varje år innehåller maligna celler. Lungcancer utgör den största delen av maligna pleuravätskor, följt av bröstcancer. Maligna cardiavätskor har samma etiologi som maligna pleuravätskor, men är betydligt ovanligare. Äggstockscancer och livmoderhalscancer är de vanligaste orsakerna till maligna fynd i buksköljvätskor [2, 3]. Ascitesvätska är en vanlig komplikation vid tumörer eller metastaser i peritoneum, men även vid levercirros och hypoalbuminemi [4].

Konventionell jämfört med vätskebaserad cytologi

Konventionell cytologi är en billig och enkel metod där provmaterialet stryks på ett objektglas efter att ha centrifugerats, varefter det fixeras i antingen metanol eller etanol och därefter färgas. En viktig fördel med konventionell cytologi jämfört med vätskebaserad är att den bevarar bakgrundsmaterial som annars kan gå förlorade. Det ger en möjlighet att påvisa den naturliga kärnmorfologin, vilket behövs för en slutgiltig diagnostik till exempel vid papillär sköldkörtelcancer [5]. Dock är metoden tidskrävande i fråga om manuellt arbete och ger ofta upphov till en sämre bild i mikroskopet än vad vätskebaserad cytologi gör. Det på grund av att materialet ofta blir ojämnt fördelat, tjockt utstruket och ojämnt fixerat. Det kan få till följd att materialet lossnar helt eller delvis från objektglaset under fixeringen eller färgningen, vilket kräver att provet prepareras om.

Vätskebaserad cytologi använder istället ett vätskebaserat medium, vanligtvis metanol- eller etanolbaserat, i vilket provmaterialet appliceras, renas och fixeras omedelbart i flytande form. Proverna prepareras och appliceras sedan på objektglas maskinellt i antingen en semi- eller helautomatisk enhet varefter de färgas och avläses i mikroskop. Med vätskebaserad cytologi

blir cellagret tunnare och jämnare, vilket förhindrar att provmaterialet lossnar från objektglaset. Då fixeringen sker i flytande fas direkt i det vätskebaserade uppsamlingsmediet blir även den jämnare då cellerna utsätts för lika mycket fixeringslösning från alla håll. Cellernas innehåll bevaras även i en högre grad med vätskebaserad cytologi jämfört med konventionell. Samtidigt blir den morfologiska bilden i mikroskopet bättre för icke-gynekologiska prover, vilket medför att den här metodprincipen lämpar sig bättre i diagnostiskt syfte. Vätskebaserad cytologi tillämpas idag på de flesta exfoliativa cytologiska provmaterialen på grund av sin höga noggrannhet, känslighet och specificitet [6, 7, 8].

Vätskor inom vätskebaserad cytologi

PreserveCyt[®] Solution (Hologic Inc, Marlborough, MA, USA) är en metanolbaserad buffertlösning som används som uppsamlingsmedium. Det fixerar cellerna och bevarar dem intakta under såväl transport som preparering av provet [9]. CytoLyt[®] Solution (Hologic Inc.) är i likhet med PreserveCyt[®] Solution en metanolbaserad buffertlösning, men innehåller även aktiva ämnen med en hemolytisk och slemlösande effekt som bidrar till att rena provmaterialet och förhindrar även proteinutfällning, vilket slutligen ger en bättre bild i mikroskopet. Dock lämpar det sig inte för cytologisk diagnostik där bakgrundsmaterialet har betydelse, såsom vid diagnostik av tumörbenägenhet för mjukvävnadstumörer [6, 9].

Nuvarande situation

Vid Region Jönköpings län används idag konventionell cytologi vid provberedningen av så kallade exsudat, vilka omfattar bland annat pleura-, ascites- och cardiavätska. På andra jämförbara sjukhus, till exempel Länssjukhuset i Kalmar, används istället vätskebaserad cytologi i rutinen med goda resultat. En stor skillnad är dock att Kalmar använder färska, det vill säga ofixerade, provmaterial medan Ryhov använder etanolfixerade provmaterial [10]. Enligt företaget Hologic Inc. (leverantören av PreserveCyt[®] Solution och CytoLyt[®] Solution) är deras teknik dock inte förenlig med etanol då det kan ge ogynnsamma resultat [9]. Länssjukhuset Ryhov önskar dock inte behöva använda färska preparat på grund av tidspressen och smittorisken som det innebär. De önskar heller inte övergå till att använda PreserveCyt[®] Solution som uppsamlingsmedium för exsudat då det skulle kräva omfattande förändringar i hur provtagningen sker ute på avdelningarna jämfört med idag. Länssjukhuset Ryhov önskar istället fortsätta använda etanolfixerat provmaterial, men ändå kunna använda den vätskebaserade metoden istället för den konventionella som används idag.

Enligt Hologic Inc. kan dock ättiksyra appliceras på prover som behandlats med den metanolbaserade produkten PreserveCyt[®] Solution för att tvätta blodiga preparat. Det är troligt att även etanolfixerade exsudat som är väldigt tjocka och blodiga kan gagnas av tillsatsen av ättiksyra [9]. Ättiksyra har en hemolyserande verkan och används redan idag för att på liknande sätt tvätta blodiga gynekologiska cellprovskontroller på Länssjukhuset Ryhov, där den vätskebase-erade metoden med PreserveCyt[®] Solution som uppsamlingsmedium redan används [11]. Dock rekommenderas inte att ättiksyra användas direkt på ofixerade material [9].

ThinPrep[®] 5000 Processor (Hologic Inc.) är det instrument som idag används för vätskebaserad cytologi på Länssjukhuset Ryhov, där det används för främst gynekologiska prover, men även icke-gynekologiska såsom blåssköljvätskor. Instrumentet är dock kompatibelt för användning mot även andra icke-gynekologiska prover, såsom exsudat [9, 12]. Om färskt provmaterial eller provmaterial som applicerats i PreserveCyt[®] Solution vid provtagningen tvättas med CytoLyt[®] Solution och sedan appliceras i uppsamlingsmediet PreserveCyt[®] Solution kan dessa köras i ThinPrep[®] 5000 Processor där cellerna filtreras och sedan appliceras automatiskt på ett objektglas så ett tunt och jämt cellager erhålls [7]. Luftartefakter och grumlighet i form av blod och slem elimineras likväl och provmaterialet faller inte av vid färgningen. Tekniken minskar således felkällor och även kontamination av färglösningar [12, 13]. Genom att utveckla metodprincipen hoppas samma resultat kunna uppnås för etanolfixerade exsudat.

Tidigare studier i området

För några år sedan genomfördes en liknande studie på Länssjukhuset Ryhov i Jönköping där både konventionell och vätskebaserad cytologi testades för blåssköljvätskor. I likhet med exsudat är blåssköljvätskor icke-gynekologiska prover, men förutom provlokalisering skiljer de sig även väsentligt i konsistens då exsudat generellt är mycket tjockare. Resultatet från den studien pekade likväl på att vätskebaserad cytologi har klara fördelar jämfört med konventionell cytologi [14].

Liknande studier har tidigare även gjorts på gynekologiska prover där resultatet har pekat mot samma slutsats som ovanstående, nämligen att vätskebaserad cytologi ger bättre bild i mikroskop jämfört med konventionell cytologi [15].

Syfte

Genom att utveckla metoden för vätskebaserad cytologi på provmaterial kategoriserade som exsudat hoppas bättre resultat kunna uppnås i frågan om provmaterialets jämnhet på objektglaset, fixering och morfologiska bild i mikroskop jämfört med konventionell cytologi även då provmaterialet är etanolfixerat.

Material och metod

Två metodprinciper applicerades på samtliga prover. Den ena metoden var den nuvarande rutinmetoden för preparering av exsudat, vilket motsvarade metodprincipen för konventionell cytologi [16]. Resultaten från den metoden kom att fungera som referens. Den andra var den vätskebaserade metoden, vilken var baserad på Länssjukhuset i Kalmar's metodbeskrivning för preparering av exsudat för vätskebaserad cytologi, där den metodprincipen användes i rutinen, men applicerades på etanolfixerade exsudat istället för färskt [10]. För att jämföra dessa två metodprinciper genomfördes de parallellt på samma exsudatprover och jämfördes därefter i mikroskop.

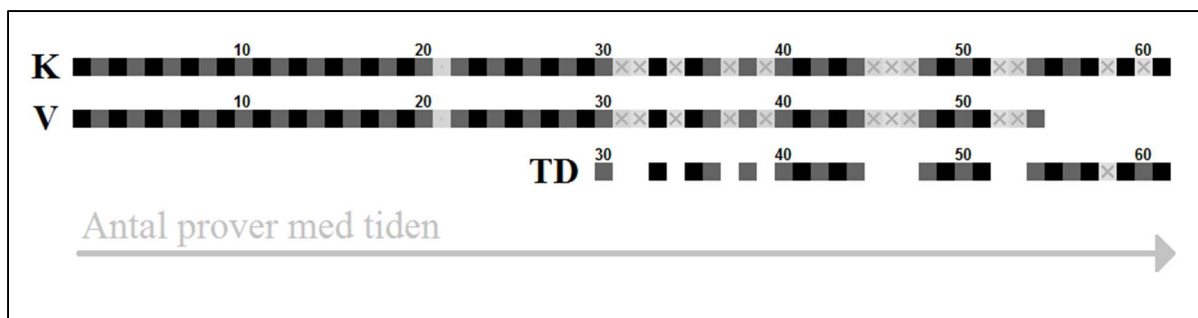
Under studies gång integrerades ytterligare en metodprincip. Den metoden innebar att ättiksyra tillsattes vid prepareringen med den vätskebaserade metoden. Den baserades på Länssjukhuset Ryhovs metod för att tvätta blodiga preparat, såsom gynekologiska cellkontroller, genom tillsats av CytoLyt[®] Solution och ättiksyra [11].

Omfattning

Totalt preparerades och färgades 137 unika glas utifrån 61 unika prover, varav 61 prover preparerades med konventionell metod; 54 med vätskebaserad metod samt 22 med tillsatt ättiksyra vid preparering med vätskebaserad metod. I figur 1 illustreras provberedningen med en tidslinje där den kronologiska ordningen ses från vänster till höger.

Bortfall och selektion

Ett bortfall på 10 prover finns bland de prover som tillsatts ättiksyra, vilket ses som luckor i tidslinjen TD (tvätt direkt, arbetsnamn) i figur 1. Bortfallet beror dels av ett begränsat antal filter och dels av att proverna har kasserats allteftersom de har preparats. Eftersom filterantalet var begränsat till 100 filter totalt fick ett antal prover noggrant selekteras ut för försöket med tillsatt ättiksyra. Prover som selekterades ut var de som var särskilt tjocka och blodiga samt de som hade påvisade celler exklusive inflammatoriska celler. Metoden införlivades likväl i studien först efter att 29 prover redan preparerats. De proverna hade då redan kasserats, vilket förklarar varför inga försök med ättiksyra har gjorts på dessa. Ett av proverna som behandlades med ättiksyra hann heller inte bli klart i tid (prov 58) och uteslöts därför.



Figur 1 Tidslinjen för hur proverna har preparerats. Tidslinjen K illustrerar de prover som preparerats med konventionell metod; V de som preparerats med vätskebaserad metod och TD (tvätt direkt) de som tillsatts ättiksyra. Varje ruta representerar ett prov där antalet ackumulerar med tiden från vänster till höger. Mörka rutor motsvarar prover som faktiskt har preparerats. Luckorna samt de ljusgrå rutorna med kryss i motsvarar bortfallen.

Ytterligare ett bortfall på 13 prover finns hos de prover som preparats med konventionell metod och 11 prover bland de som preparats med vätskebaserad metod. Ett av dessa prover, gemensamt för båda metoderna (prov 21), gick ej att mikroskopera på grund av luftartefakter. Det utslöts därför. Två glas bland dem som preparerats med konventionell metod (prov 58 och 61) blev aldrig klara i tid och utslöts därför. De resterande 10 proverna, gemensamma för båda metoderna, är de prover som motsvarar luckorna i figur 1 för de prover som har förbehandlats med ättiksyra. De har mikroskopats, men ingen bedömning har gjorts på dem. Det beror på att de saknade motsvarande glas som var behandlade med ättiksyra och sålunda inte kunde jämföras samtidigt som mikroskoperingen inte visade på något avvikande resultat. Samtliga bortfallna proverna har färgats i ljusgrå färg och markerats med kryss i figur 1.

På grund av det begränsade antalet filter kunde heller inte fler än 54 prover totalt prepareras med den vätskebaserade metoden, medan den konventionella som inte behöver filter kunde appliceras på alla 61 prover. De sista filtren prioriterades att användas till de prover som behandlats med ättiksyra.

Provberedning

Gemensamt för metodprinciperna var att provmaterialet skulle inkomma fixerat i lika delar 70% etanol samt med några droppar heparin tillsatta direkt vid provtagningen. Provet skulle förvaras i en tättslutande burk eller flaska. Provmaterialet skulle även tillblandas väl före prepareringen. Behållaren vändes därför upp och ner några gånger så att allt material lossnade från väggarna. När provmaterialet var homogent följdes sedan metodbeskrivningarna nedan.

Konventionell metod

Approximativt 10 ml av provmaterialet hälldes i ett 10 ml centrifugrör som därefter centrifugerades i 10 min vid 620 x g (Rotanta 460, Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Tyskland). Supernatanten dekanterades sedan försiktigt varefter pelletten resuspenderades. En droppe av pelletten överfördes sedan till ett objektglas (TOMO, IHC adhesive Glace Slide, Osaka, Japan). Droppen placerades i mitten av glaset. Ett täckglas placerades sedan försiktigt ovanpå droppen så att den bredde ut sig över glaset. Därefter drogs täckglaset horisontellt över objektglaset så att droppen ströks ut över hela glasytan. Objektglaset inkuberades sedan minst 1 timme i en kyvett innehållandes 95% etanol. Därefter följde provet rutinfärgningsprocessen [16].

Vätskebaserad metod

Approximativt 50 ml av provmaterialet hälldes i ett 50 ml centrifugrör som därefter centrifugerades i 10 min vid 620 x g. Supernatanten dekanterades försiktigt i vasken efteråt. Den kvarvarande pelletten resuspenderades och tillsattes sedan 30 ml CytoLyt[®] Solution. Provet inkuberades sedan i 15 min innan det återigen centrifugerades i 10 min vid 620 x g. Om pelletten efter det här steget fortfarande bedömdes vara blodig upprepades hela proceduren sedan efter den första centrifugeringen. Det i syfte att tvätta provmaterialet ordentligt från blod och slem. Efter centrifugeringen rördes pelletten ihop med en pipett varefter 2-3 droppar överfördes av den till en uppmärkt ThinPrep-burk innehållandes PreserveCyt[®] Solution. ThinPrep-burken inkuberades sedan i minst 15 min innan den matades in i ThinPrep[®] 5000 Processor. Proverna skulle därefter köras på programmet "Övrig cytologi" och blå filter (ThinPrep[®] Non Gynecological Filter, Hologic Inc.) anpassade för tjocka prover, såsom exsudat, användes. Maskinen preparerade proverna på objektglas av typen ThinPrep[®] Imaging System Microscope Slides (Hologic Inc.). Därefter följde provet rutinfärgningsprocessen [10].

Vätskebaserad metod med tillsats av ättiksyra

Approximativt 7 ml av provmaterialet hälldes i ett 15 ml konat centrifugrör (med kork) som därefter centrifugerades i 10 min vid 620 x g. Supernatanten dekanterades sedan försiktigt i vasken efteråt. Den kvarvarande pelletten resuspenderades och tillsattes sedan 7 ml CytoLyt[®] Solution. Korken förslöts och provet blandades innan 7 ml 10% ättiksyra (Honeywell Speciality Chemicals, Tyskland) tillsattes. Provet förslöts därefter på nytt och provet blandades innan det centrifugerades på nytt i 10 min vid 620 x g. Efter centrifugeringen dekanterades supernatanten försiktigt i vasken. Av pelletten överfördes sedan 2-3 droppar, alternativt hela pelletten om den understeg detta, till en uppmärkt ThinPrep-burk innehållandes PreserveCyt[®] Solution. Burken

vändes några gånger så att lösningen blev homogen. ThinPrep-burken inkuberades i minst 15 min innan den matades in i ThinPrep[®] 5000 Processor. Proverna kördes därefter på programmet "Övrig cytologi" och blå filter anpassade för tjocka prover, såsom exsudat, användes. Maskinen preparerade proverna på objektglas av typen ThinPrep[®] Imaging System Microscope Slides (Hologic Inc). Därefter följde provet rutinfärgningsprocessen [11].

Färgning

Samtliga glas färgades enligt rutinfärgningsprocessen på Länssjukhuset Ryhov för exsudat där Papanikolaoufärgning (PAP-färgning) används. Färgningen utfördes av laboratoriets ordinarie personal. Instrumenten som användes i rutinen är av modellerna Leica[®] ST5010 Auto-stainer XL (Leica Microsystems, Nußloch, Tyskland) samt Leica[®] CV5030 Coverslipper (Leica Microsystems). Glasen fick efter färgningen torka till dagen efter.

Bedömning av resultat

De färdiga glasen studerades systematiskt i ett mikroskop av en cytodiagnostiker och tre biomedicinska analytiker (inklusive författarna). Glasen bedömdes utifrån fyra parametrar; mängden celler exklusive inflammatoriska celler såsom granulocyter och makrofager; bedömbarenheten av cellernas morfologi; mängden inflammatorisk komponent (det vill säga mängden granulocyter och andra inflammatoriska celler), samt mängden bakgrundsmaterial. Önskvärt resultat var tydliga celler med tydliga cellstrukturer och granula, med så lite bakgrundsmaterial, såsom blod och slem, som möjligt. För varje parameter gavs glasen scorevärden från 0 till 3 som specificerades som "ingen", "sparsam/dålig", "måttlig/god" och "riklig/mycket god" i kronologisk ordning. Därutöver bedömdes förekomsten av fällning i kyvetten eller färgbaden efter prepareringen på de glas som preparerats med konventionell metod. Det syftar till huruvida provmaterialet har lossnat från glasen eller inte. På de glas som preparerats med vätskebaserad metod bedömdes istället förekomsten av ring på glasen. En ring uppstår då provmaterial inte har kunnat filtreras ordentligt och/eller fäst på objektglasets yta. Provmaterialet fäster då enbart i ytterkanterna, vilket ger upphov till en ringformation med lite eller total avsaknad av provmaterial i mitten. De två kategorierna, fällning respektive ring, bedömdes enbart som antingen "ja" eller "nej". Eftersom ett visst bortfall finns, vilket innebär att inte alla prover har preparerats med alla metoderna, beräknas den procentuella fördelningen mellan scorevärdena för varje

enskild parameter. Detta för att kunna jämföra olika grupper trots att antalet prover som preparerats med metoderna är olika. Medianen beräknas likväl utifrån samtliga scorevärden och används för att jämföra metoderna övergripigt.

Utomstående bedömning

Ett protokoll utformades likväl för att få en utomstående, oberoende bedömning från en cytopatolog av de olika metoderna. Protokollet tillhandahölls cytopatologen tillsammans med alla de fall som preparerats med var och en av de tre metoderna så att ett glas fanns för varje metod på varje fall. Det motsvarade följaktligen 15 fall och 45 glas totalt. Cytopatologen ombads därefter att välja ett av glasen inom varje fall som vore att preferera ur ett diagnostiskt perspektiv. Då proverna var kodade utgjorde det på så sätt en utomstående och oberoende bedömning.

Etiska överväganden

Samtliga prover som användes i den här studien var avkodade då de tillhandahölls och patienterna var och är således anonyma genom hela studien. Proverna var dessutom utsvarvade sedan länge och hade normalt varit kasserade. Därför behövdes ingen vidare etisk granskning.

Resultat

Scorevärdenas procentuella fördelning mellan de olika kategorierna presenteras för var och en av de tre metoderna i tabellerna 1-6. Medianen av scorevärdena 0-3 beräknades likväl och presenteras i samma tabeller.

Konventionell metod

De glas som preparerats med konventionell metod motsvarade de som idag används på Länsjukhuset Ryhov i Jönköping. De fungerade därför som referens till de övriga metoderna. I tabell 1 redovisas den procentuella fördelningen av scorevärdena på de glas som preparerats med konventionell metod. Totalt preparerades 61 glas, varav 48 har bedömts.

Fällning förekom i 26 av de bedömda proverna. Det förekom inga celler utöver inflammatoriska på 15 av glasen. Det bedömdes förekomma sparsamt med celler på 21 av dem och måttligt med celler på 11 av dem. Endast 1 glas bedömdes ha rikligt med celler utöver inflammatoriska. Bedömbarheten av cellmorfologin bedömdes som mycket god på 26 av glasen och som god på 15 av dem. På 6 av glasen var färgningen svag och därför bedömdes bedömbarheten som dålig och på 1 av dem hade ingen infärgning skett alls till följd av total avsaknad av celler.

Den inflammatoriska komponenten bedömdes vara sparsam på 35 av glasen medan den bedömdes vara måttlig på 9 och riklig på 2 av dem. På 2 av glasen fanns ingen inflammatorisk komponent alls. Bakgrundsmaterialet bedömdes vara måttligt på 29 av glasen och riklig på 7 av dem. På 9 av glasen var bakgrundsmaterialet sparsamt och på 3 fanns det inget bakgrundsmaterial alls.

Tabell 1 Den procentuella fördelningen inom de olika kategorierna för de konventionellt preparerade glasen samt medianen av deras scorevärden.

| KONVENTIONELL METOD (n=48) | | | | |
|----------------------------|---|------------------------------|--------------------------|---------------------|
| Fällning i kyvett/färgbad | Mängd av celler (exklusive inflammatoriska) | Bedömbarhet av cellmorfologi | Inflammatorisk komponent | Bakgrundsmaterial |
| 46% nej | 31% inga | 2% ingen | 4% ingen | 6% inget |
| 54% ja | 44% sparsam | 13% dålig | 73% sparsam | 19% sparsamt |
| | 23% måttlig | 31% god | 19% måttlig | 60% måttligt |
| | 2% riklig | 54% mycket god | 4% riklig | 15% rikligt |
| Median | 1 sparsam | 3 mycket god | 1 sparsam | 2 måttligt |

Medianen av scorevärdena är 1 beträffande mängden celler på glasen exklusive de inflammatoriska, vilket motsvarar sparsam mängd. Bedömbarheten av cellmorfologin har en median på 3 vilket motsvarar mycket god bedömbarhet. Den inflammatoriska komponenten har en median på 1 vilket motsvarar sparsam mängd inflammatorisk komponent. Bakgrundsmaterialets har en median på 2 motsvarande måttligt med bakgrundsmaterial.

Vätskebaserad metod

I tabell 2 redovisas den procentuella fördelningen av scorevärdena 0-3 för de glas som preparerats med den vätskebaserade metoden. Totalt preparerades 54 glas, varav 43 bedömdes. Ring förekom på 31 utav de bedömda glasen. På 12 av glasen förekom det måttligt av celler exklusive inflammatoriska. På exakt lika många, det vill säga på 12 av glasen, förekom istället sparsamt med celler. På endast 3 av glasen förekom det rikligt med celler, medan det på 16 av dem förekom inga celler alls utöver inflammatoriska celler. Bedömbarheten av cellmorfologin bedömdes vara mycket god på 23 av glasen och god på 15 av dem. På endast 4 av dem bedömdes bedömbarheten vara dålig och på 1 av glasen fanns inget material att bedöma, varav det bedömdes som värdet 0. Det förekom sparsamt med inflammatorisk komponent på 30 av de bedömda glasen. På 10 av dem förekom det måttlig inflammatorisk komponent medan det på endast 1 glas bedömdes vara riklig. Endast 2 glas saknade inflammatorisk komponent helt. Bakgrundsmaterialet bedömdes vara måttligt på 25 av glasen och sparsam på 10 av dem. På 4 av glasen förekom rikligt med bakgrundsmaterial och lika många, det vill säga 4 glas, hade inget bakgrundsmaterial alls.

Tabell 2 Den procentuella fördelningen inom de olika kategorierna för de glas som preparerats med den vätskebaserade metoden samt medianen av deras scorevärden.

| VÄTSKEBASERAD METOD (n= 43) | | | | |
|-----------------------------|--|---------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Förekomst av ring | Mängd av celler (exklusive inflammatoriska) | Bedömbarhet av cellmorfologi | Inflammatorisk komponent | Bakgrundsmaterial |
| 28% nej | 37% inga | 2% ingen | 5% ingen | 9% inget |
| 72% ja | 28% sparsam | 9% dålig | 70% sparsam | 23% sparsamt |
| | 28% måttlig | 35% god | 23% måttlig | 58% måttligt |
| | 7% riklig | 53% mycket god | 2% riklig | 9% rikligt |
| Median | 1 sparsam | 3 mycket god | 1 sparsam | 2 måttligt |

Medianen av scorevärdena för mängden av celler exklusive inflammatoriska celler utföll som 1, vilket motsvarar sparsamt med celler. Bedömbarheten av cellmorfologin hade istället en median på 3, vilket motsvarar mycket god bedömbarhet. Den inflammatoriska komponenten har en median på 1, vilket motsvarar sparsam mängd inflammatoriska celler som exempelvis granulocyter. Medianen för bakgrundsmaterialet utföll som 2, vilket motsvarar måttligt med bakgrundsmaterial.

Vätskebaserad metod med tillsats av ättiksyra

Totalt behandlades 22 prover med ättiksyra vid prepareringen med vätskebaserad metod. Av dessa har 21 bedömts. I tabell 3 redovisas den procentuella fördelningen av scorevärdena 0-3 mellan de olika kategorierna.

Det förekom ingen ring på 20 utav de 21 bedömda glasen. Mängden celler exklusive inflammatoriska celler bedömdes vara sparsam på 9 av glasen, måttlig på 4 och riklig på 4 av dem. På ytterligare 4 glas fanns inga celler alls utöver inflammatoriska celler. Bedömbarheten var mycket god på 18 och god på 2 av dem. Endast 1 glas bedömdes ha scorevärdet 0 och inga av glasen bedömdes ha dålig bedömbarhet. Den inflammatoriska komponenten var sparsam på 11 av glasen och måttlig på 7 av dem. På 2 av glasen bedömdes den vara riklig och 1 glas bedömdes ha ingen inflammatorisk komponent. Totalt bedömdes 11 glas helt sakna bakgrundsmaterial och ytterligare 9 glas bedömdes ha sparsamt med bakgrundsmaterial. Endast 1 glas hade måttligt med bakgrundsmaterial och inget glas bedömdes ha riklig.

Tabell 3 Den procentuella fördelningen inom de olika kategorierna för de glas som tillsatts ättiksyra samt medianen av deras scorevärden.

| VÄTSKEBASERAD METOD MED TILLSATS AV ÄTTIKSYRA (n=21) | | | | |
|--|--|---------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Förekomst av ring | Mängd av celler (exklusive inflammatoriska) | Bedömbarhet av cellmorfologi | Inflammatorisk komponent | Bakgrundsmaterial |
| 95% nej | 19% inga | 5% ingen | 5% ingen | 52% inget |
| 5% ja | 43% sparsam | 0% dålig | 52% sparsam | 43% sparsamt |
| | 19% måttlig | 10% god | 33% måttlig | 5% måttligt |
| | 19% riklig | 85% mycket god | 10% riklig | 0% rikligt |
| Median | 1 sparsam | 3 mycket god | 1 sparsam | 1 sparsamt |

Medianen av scorevärdena utföll som värdet 1 för mängden celler exklusive inflammatoriska, vilket motsvarar sparsam mängd celler. Den utföll däremot som 3 för bedömbarheten, vilket motsvarar mycket god bedömbarhet av cellmorfologin. Median utföll som 1, vilket motsvarar sparsam, för den inflammatoriska komponenten. Den utföll även som 1 för bakgrundsmaterialet, vilket motsvarar sparsamt med bakgrundsmaterial.

Korrigerade värden för jämförelse

För att kunna jämföra de preparat som tillsatts ättiksyra med de som preparerats med konventionell och direkt vätskebaserad metod måste samma prover betraktas. Eftersom en selektion har gjorts bland de prover som tillsatts ättiksyra, där cellrika preparat särskilt har valts ut, kan parametrarna i tabell 3 inte jämföras direkt med de motsvarade i tabell 1 och 2. Tabellerna måste därför korrigeras till att enbart inkludera de prover som har preparerats med alla tre metoderna, vilket ger 15 prover. Tabell 4, 5 och 6 visar de korrigerade resultaten där endast de 15 proverna som har behandlats med alla tre metoderna ingår.

Då endast de 15 prover som har preparerats med alla tre metoderna betraktas har fällning förekommit på 6 utav de glas som preparerats med konventionell metod. Ring förekom på 11 utav de glas som preparerats med vätskebaserad metod och på endast 1 utav de glas som preparerats med tillsättning av ättiksyra. Mängden celler exklusive inflammatoriska bedömdes som inga på 4 utav glasen för alla metoderna och som sparsamt på 8 av de som preparerats med konventionell metod, 6 av de som preparerats med vätskebaserad metod och 5 av de som preparerats med tillsats av ättiksyra. Av de konventionellt preparerade glasen bedömdes 2 ha måttligt med celler medan 3 av de som preparerats med vätskebaserad metod och 4 av de som preparerats efter tillsats av ättiksyra bedömdes ha detsamma. Rikligt med celler förekom på 1 av de glas som preparerats med konventionell metod, 2 av de som preparerats med vätskebaserad metod och 2 av de som tillsatts ättiksyra. Bedömbarheten av cellmorfologin bedömdes som värdet 0 på 1 glas för samtliga metoderna. Den bedömdes som dålig på 1 av de glas som preparerats med konventionell metod liksom 1 av de glas som preparerats med vätskebaserad metod, men inte på något av de som preparerats med tillsats av ättiksyra. Bedömbarheten bedömdes som god på 3 av de glas som preparerats med konventionell metod, 3 av de glas som preparerats med vätskebaserad metod och 2 glas av de som tillsatts ättiksyra. Bedömbarheten av cellmorfologin bedömdes vara mycket god på 10 av de konventionellt preparerade glasen, 10 av de som preparerats med vätskebaserad metod och 12 av de som tillsatts ättiksyra.

Tabell 4 Den korrigerade procentuella fördelningen av scorevärdena för konventionell metod då enbart preparat som har preparats med samtliga tre metoder inkluderas.

| KORRIGERADE VÄRDEN FÖR KONVENTIONELL METOD (n=15) | | | | |
|---|--|---------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Förekomst av ring | Mängd av celler (exklusive inflammatoriska) | Bedömbarhet av cellmorfologi | Inflammatorisk komponent | Bakgrundsmaterial |
| 60% nej | 27% inga | 7% ingen | 7% ingen | 0% inget |
| 40% ja | 53% sparsam | 7% dålig | 80% sparsam | 27% sparsamt |
| | 13% måttlig | 20% god | 13% måttlig | 60% måttligt |
| | 7% riklig | 67% mycket god | 0% riklig | 13% rikligt |
| Median | 1 sparsam | 3 mycket god | 1 sparsam | 2 måttligt |

Tabell 5 Den korrigerade procentuella fördelningen av scorevärdena för vätskebaserad metod då enbart preparat som har preparats med samtliga tre metoder inkluderas.

| KORRIGERADE VÄRDEN FÖR VÄTSKEBASERAD METOD (n=15) | | | | |
|---|--|---------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Förekomst av ring | Mängd av celler (exklusive inflammatoriska) | Bedömbarhet av cellmorfologi | Inflammatorisk komponent | Bakgrundsmaterial |
| 27% nej | 27% inga | 7% ingen | 7% ingen | 13% inget |
| 73% ja | 40% sparsam | 7% dålig | 67% sparsam | 33% sparsamt |
| | 20% måttlig | 20% god | 27% måttlig | 40% måttligt |
| | 13% riklig | 67% mycket god | 0% riklig | 13% rikligt |
| Median | 1 sparsam | 3 mycket god | 1 sparsam | 2 måttligt |

Tabell 6 Den korrigerade procentuella fördelningen av scorevärdena för de prover som tillsatts ättiksyra då enbart preparat som har preparats med samtliga tre metoder inkluderas.

| KORRIGERADE VÄRDEN FÖR PROVER MED TILLSATT ÄTTIKSYRA (n=15) | | | | |
|---|--|---------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Förekomst av ring | Mängd av celler (exklusive inflammatoriska) | Bedömbarhet av cellmorfologi | Inflammatorisk komponent | Bakgrundsmaterial |
| 93% nej | 27% inga | 7% ingen | 7% ingen | 40% inget |
| 7% ja | 33% sparsam | 0% dålig | 67% sparsam | 53% sparsamt |
| | 27% måttlig | 13% god | 27% måttlig | 7% måttligt |
| | 13% riklig | 80% mycket god | 0% riklig | 0% rikligt |
| Median | 1 sparsam | 3 mycket god | 1 sparsam | 1 sparsamt |

Det förekom ingen inflammatorisk komponent på 1 glas för alla tre metoderna. Det bedömdes finnas sparsamt med inflammatorisk komponent på 12 av de glas som preparerats med konventionell metod och på 10 av de glas som preparerats med vätskebaserad metod liksom 10 av de som tillsatts ättiksyra. Den inflammatoriska komponenten fanns i måttlig mängd på 2 av de konventionellt preparerade glasen och på 4 av de som preparerats med vätskebaserad metod liksom 4 av de som tillsatts ättiksyra. Inget glas bedömdes ha rikligt med inflammatorisk komponent. Det bedömdes inte förekomma något bakgrundsmaterial alls på 2 av de glas som preparerats med vätskebaserad metod och på 6 av de som tillsatts ättiksyra. Inget glas av de konventionellt preparerade saknade helt bakgrundsmaterial, men 4 glas bedömdes ha sparsamt med bakgrundsmaterial. Av de glas som preparerats med vätskebaserad metod bedömdes 5 ha sparsamt med bakgrundsmaterial och av de som tillsatts ättiksyra var antalet 8 glas. Bakgrundsmaterialet bedömdes som måttligt på 9 av de glas som preparerats med konventionell metod, 6 av de som preparerats med vätskebaserad metod och 1 av de som tillsatts ättiksyra. Det bedömdes vara rikligt med bakgrundsmaterial på 2 av de glas som preparerats konventionellt, 2 av de som preparerats med vätskebaserad metod och ingen av de som tillsatts ättiksyra. Medianen är oförändrad jämfört med de i tabell 1, 2 och 3.

Utomstående bedömning

Ett protokoll delades ut till en cytopatolog på Länssjukhuset Ryhov tillsammans med 15 kodade fall med vardera ett glas som preparerats med konventionell metod, ett som preparerats med vätskebaserad metod samt ett som tillsatts ättika vid vätskebaserad metod. Cytopatologen ombads välja det av de tre glasen för vardera fallet som vore att preferera utifrån ett diagnostiskt syfte. I tabell 7 redovisas vilka glas som cytopatologen har prefererat.

Tabell 7 Cytopatologens översiktliga bedömning. Proverna har kodats och numrerats 1-15 och X indikerar vilket glas som har prefererat. K representerar de prover som preparerats med konventionell metod. V representerar de prover som preparerats med vätskebaserad metod. TD representerar de som tillsatts ättiksyra.

| CYTOPATOLOGENS PREFERENSER | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| V | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TD | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

Cytopatologen föredrog att diagnostisera utifrån de glas som preparats efter tillsatts av ättiksyra med vätskebaserad metod i 15 av fallen, det vill säga i samtliga fallen. Ett glas preparerat med vätskebaserad metod bedömdes vara likvärdigt med det av samma kodade prov som preparats med ättiksyra. Inget av glasen som preparerats med konventionell metod bedömdes vara det mest optimala att diagnostisera utifrån.

Diskussion

Genom att utveckla metoden för vätskebaserad cytologi på provmaterial kategoriserade som exsudat hoppades bättre resultat kunna uppnås i frågan om provmaterialets jämnhet på objektglasen, fixering och morfologiska bild i mikroskop jämfört med konventionell cytologi även då provmaterialet var etanolfixerat.

Konventionell jämfört med vätskebaserad metod

Resultaten från den konventionella och vätskebaserade metoden, vilka kan ses i tabellerna 1 och 2, tyder inte på någon skillnad eller förbättring av resultaten. Den procentuella fördelningen av scorevärdena är väldigt snarlik för de två metoderna för nästan alla parametrar. Medianen är även den densamma för alla parametrar inom de två metoderna.

Mängden celler (exklusive inflammatoriska) var en parameter som bedömdes för båda metoderna. De skiljer dock inte nämnvärt mellan de prover som har preparerats med konventionell eller vätskebaserad metod, även om den har ökat marginellt till det bättre, men då scorevärdena är baserade på bedömningar kan de inte heller sägas vara exakta värden, vilket innebär att små skillnader måste överses. Detsamma gäller för bedömbarheten av cellmorfologin, mängden inflammatorisk komponent och mängden bakgrundsmaterial. Skillnaderna i den procentuella fördelningen av scorevärdena är ännu mindre för dessa parametrar mellan de två metoderna. Förvånansvärt är att bakgrundsmaterialet inte har minskat i omfattning för de preparat som preparerats med vätskebaserad metod. Det förväntades att bakgrundsmaterialet skulle minska då CytoLyt[®] Solution användes då det lyserar erythrocyter och slem. En trolig orsak är att CytoLyt[®] Solution inte är applicerbar på etanolfixerade prover [9]. Preparaten har som konsekvens av det inte renats ordentligt och bakgrundsmaterial som erythrocyter och slem har då inte lyserats utan kvarstår. Exempel på hur bakgrundsmaterial såg ut i mikroskop kan ses i figur 3A-B i bilaga 2.

Fällning under prepareringsprocessen

Parametern ”Förekomst av fällning” förekom endast bland de prover som har preparerats med konventionell metod. Resultaten tyder likväl på att fällning är vanligt förekommande då 54% av glasen hade fällt under prepareringsprocessen, antingen i kyvetten eller i färgbaden. Exempel på hur fällning såg ut kan ses i figur 2A i bilaga 1. Det innebär ett stort problem då metoden idag är den som används som rutinmetod för preparering av exsudat på Länssjukhuset Ryhov. Om fällningen sker i färgbaden innebär det kontamination av färglösningarna och även en ökad

risk för kontamination av andra prover. Beroende hur mycket material som har lossnat behöver preparaten eventuellt prepareras om helt, vilket innebär onödig tidsåtgång beträffande manuellt arbete och även fördröjda svar för patienterna. Om glaset ändå har tillräckligt med material kvar för att kunna ställa en diagnos utifrån, innebär det en ökad ansträngning för cytodiagnostikerna som måste leta efter celler i en högre grad jämfört med om det fanns rikligare med material.

Förekomst av ring på objektglaset

Parametern "Förekomst av ring" förekom endast bland de prover som har preparerats med den vätskebaserade metoden. Uppkomsten av ringen beror av att provmaterialen är för tjockt och blodigt då det appliceras i ThinPrep® 5000 Processor, vilket medför att filtreringen inte har kunnat ske som ämnat. Exempel på ring kan ses i figur 2B i bilaga 1. Exsudat är normalt väldigt tjockt och innehåller inte sällan slem och blod. CytoLyt® Solution ska enligt Hologic Inc. hemolysa erythrocyter och även lysa slem, vilket ska ge ett rent provmaterial som inte ska ge upphov till en ringformation på objektglaset [9]. På 31 av de 43 bedömda glaset, det vill säga i 72% av fallen, har likväl en ring uppkommit på glaset. Celler i ytterkanterna tenderar dessutom att inte vara intakta då ring förekommer, vilket beror av att filtret tryckts emot objektglaset i ytterkanterna och skadat cellerna. Celler tenderar även att fästa i lägre utsträckning på objektglasens centrala delar då ring förekommer. En möjlig orsak till varför ringen uppkommer kan vara att CytoLyt® Solution inte är applicerbar på etanolfixerade prover [9]. Det är möjligt att preparaten inte har renats ordentligt till följd av det och att bakgrundsmaterial som erythrocyter och slem inte lyserats som ämnat. Orsaken är troligtvis densamma till varför inte bakgrundsmaterialet minskar jämfört med konventionell metod, då båda beror av att provmaterialet är fortsatt blodigt och tjockt. Bakgrundsmaterialet var en av de parametrar som annars hade förväntats minskas mest mellan de olika metoderna.

Tillsats av ättiksyra jämfört med de två andra metoderna

Resultaten från de prover som tillsatts ättiksyra, vilka kan ses i tabell 3 och 6, tyder till skillnad från den vätskebaserade metoden på förbättring av resultaten jämfört med den konventionella metoden. Den procentuella fördelningen av scorevärdena skiljer sig mycket i flera viktiga parametrar och medianen utfaller som ett mer fördelaktigt värde än för de andra metoderna.

Det föreligger ingen direkt skillnad i resultaten mellan de prover som har tillsatts ättiksyra jämfört med de som preparerats med konventionell och vätskebaserad metod då mängden celler

(exklusive inflammatoriska), bedömlbarheten av morfologin eller mängden inflammatorisk komponent betraktas. Då endast 15 prover impliceras i de procentuella fördelningarna av scorevärden i tabell 4-6 kan inte små förändringar betraktas som anmärkningsvärda utan måste därför lämnas obeaktade. Däremot är skillnaden i förekomst av ring anmärkningsvärd mellan de prover som tillsatts ättiksyra och de som har preparerats direkt med den vätskebaserade metoden. Ring förekommer på 73% av fallen betraktandes den vätskebaserade metoden (se tabell 5), men endast i 7% av fallen, vilket motsvarar ett enda glas, bland dem som tillsatts ättiksyra (se tabell 6). Betraktas samtliga prover som preparerats med vätskebaserad metod (se tabell 2) ses precis samma trend då 72% av fallen påvisade ring på objektglasen. Bakgrundsmaterialet har i likhet med förekomsten av ring minskat drastiskt för de ättiksyrabehandlade preparaten jämfört med de som preparerats med konventionell och vätskebaserad metod. Det förekom inget bakgrundsmaterial alls i 40% av fallen, motsvarande 6 glas, och endast sparsamt i 53 % av fallen, motsvarande 8 glas, då de ättiksyrabehandlade proverna betraktades (se tabell 6). Det bör jämföras med de motsvarande värdena i tabell 4 och 5 där bakgrundsmaterial finns i måttlig mängd i 60% av fallen, motsvarande 9 glas, som preparerats med konventionell metod och inget glas alls saknar bakgrundsmaterial helt. Endast 27% av glasen, motsvarande 4 glas, har sparsamt med bakgrundsmaterial bland de som preparerats med konventionell metod. Inkluderas samtliga värden för alla preparat som har tillsatts ättiksyra är skillnaden ännu större då 52% av fallen, motsvarande 11 glas, helt saknar bakgrundsmaterial och 43%, motsvarande 9 glas, endast har sparsamt med bakgrundsmaterial (se tabell 3). Det bör jämföras med de preparat som har preparerats med konventionell och vätskebaserad metod där endast 6% av de konventionella och 9% av de vätskebaserade saknar bakgrundsmaterial helt då samtliga preparerade prover betraktas (se tabell 1 och 2). I figur 2C i bilaga 1 visas två glas preparerade med tillsatts av ättiksyra, vilka bör jämföras med figur 2A-B i samma bilaga som är preparerade med konventionell respektive direkt vätskebaserad metod. I bilaga 2 illustreras hur bakgrundsmaterialet har renats bort med översiktsbilder (Figur 3A-C).

Ättiksyrans inverkan

Tillsats av ättiksyra tycks ha positiv effekt då CytoLyt[®] Solution och ThinPrep[®] 5000 processor används för vätskebaserad preparering av etanolfixerade exsudat. CytoLyt[®] Solution är inte att rekommendera på etanolfixerade preparat, vilket medför ogynnsamma resultat (se tabell 2 och 5 samt bilaga 1-2), men tillsammans med ättiksyra elimineras problem som förekomst av ring på objektglasen samt oönskat bakgrundsmaterial (se tabell 3 och 6 samt bilaga 1-2). Tillsammans med CytoLyt[®] Solution hemolyserar ättiksyran erytrocyterna och lyserar även slem i

mycket högre grad då provmaterialet är fixerat med etanol. Det får till följd att provmaterialet blir mycket renare, vilket följaktligen inte ger upphov till en ring på objektglaset. Då erythrocyter och slem lyserats medför det även mindre bakgrundsmaterial. Kombinationen av CytoLyt® Solution och ättiksyra bevarar även cellernas morfologi mycket väl då bedömligheten av cellmorfologin inte har förändrats nämnvärt (se tabell 2-3 och 5-6).

Volymens inverkan

Förutom tillsats av ättiksyra skiljer volymen provmaterial som användes mellan den direkta vätskebaserade metoden och den ättiksyrabehandlade vätskebaserade metoden. Till den direkta vätskebaserade metoden användes approximativt 50 ml provmaterial medan till den ättiksyrabehandlade användes endast 7 ml. Då även olika storlekar på centrifugrören användes bör den bildade pelleten efter den första centrifugeringen rimligtvis vara olika stor mellan de två metoderna. Det innebär i så fall att det absoluta antalet celler (inklusive inflammatoriska) är olika likväl mellan de två metoderna, vilket även bör gälla mängden erythrocyter och slem. Det är möjligt att volymen har betydelse för huruvida ring och bakgrundsmaterial framträder på de färdiga objektglasen, men eftersom antalet celler (inklusive inflammatoriska) inte skiljer nämnvärt mellan de olika metoderna misstänks ändå ättiksyran vara den främsta faktorn som påverkar ringen och bakgrundsmaterialet. Dock kan inte volymen uteslutas som faktor i nuläget.

Cytopatologens preferenser

Det framgår av tabell 7 att cytopatologen prefererade att diagnostisera utifrån de glas som tillsatts ättiksyra. I protokollet fanns även utrymme för kommentarer där cytopatologen har skrivit många kommentarer till förmån för de ättiksyrabehandlade preparaten. Av kommentarerna framgår att cytopatologen är tillfreds med såväl morfologin som infärgningen på de glas som behandlats med ättiksyra och föredrog dem framför de glas som preparerats med de två andra metoderna. Det framgår även att de glasen har marginellt mer celler exklusive inflammatoriska, vilket inte scorevärdena visar i tabell 4-6, samt betydligt mindre bakgrundsmaterial.

Rekommendation för en poster

Cytopatologen var mycket tillfreds med resultaten från de ättiksyrabehandlade preparaten. Resultaten har därför blivit rekommenderade av cytopatologen för att göra en framtida poster där studien och resultaten presenteras tillsammans med mikroskopbilder på de färdiga preparaten.

Vidare studier

Eftersom försöken med ättiksyran införlivades först halvvägs igenom arbetet har den metoden inte kunnat testas på fullt lika många prover som den konventionella och vätskebaserade metoden. Då även antalet filter var begränsat var selektion nödvändigt för vilka prover som skulle tillsättas ättiksyra. Tjocka och blodiga prover prioriterades då för att se om de överhuvudtaget gick att preparera framgångsrikt. Dock för att kunna jämföra preparaten som preparerats med olika metoder krävs att de är av samma ursprungsprov. Det medförde att endast 15 preparat av de sammanlagt 61 preparerade proverna kunde jämföras fullt ut. Resultaten tyder dock på en tydlig trend där kombinationen av ättiksyra och CytoLyt[®] Solution tycks ge goda resultat även på etanolfixerat material, men en större och mer omfattande studie vore att rekommendera för att fastslå resultaten.

Då volymen provmaterial som har använts har varit olika i den här studien för de prover som har preparerats direkt med vätskebaserad metod och för de som har preparerats efter tillsats av ättiksyra, vore det även att rekommendera en studie där volymerna är standardiserade till en och samma för de olika metoderna. Likväl rekommenderas att samma centrifugrörsstorlek används för att pelleten ska bli lika stor för båda metoderna. Det för att kunna utesluta volymen som en faktor för förekomsten av ring och bakgrundsmaterial.

Fördelar och nackdelar

Om resultaten kan bekräftas i en vidare studie samtidigt som volymen kan uteslutas som faktor hade det inneburit att den vätskebaserade metoden med tillsats av ättiksyra hade kunnat införas som ny rutinmetod för provberedning av exsudat på Länssjukhuset Ryhov. Det hade inneburit att ingen förändring hade behövt ske vid provtagningen ute på avdelningarna. Då etanol fortsatt kan användas som fixeringslösning och uppsamlingsmedium innebär det heller ingen ny kostnad och heller ingen ökad smittorisk eller tidspress för personalen på cytologilaboratoriet. Åtgången av ättiksyra skulle dock öka, vilket utgör en mindre kostnad i sammanhanget. Problemet med fällning i färgbaden hade minskats samtidigt som provvolymen som krävts för analys hade minskats till 7 ml jämfört med 10 ml för konventionell metod. Reduceringen av ring och bakgrundsmaterial vore dock den största fördelen.

Slutsatser

Det förekom ingen skillnad mellan konventionell och vätskebaserad metod då etanolfixerade exsudat användes som provmaterial. Då ättiksyra tillsattes i samband med den vätskebaserade prepareringen uppnåddes däremot stor skillnad jämfört med både konventionell och enkel vätskebaserad metod. Förekomsten av ring och bakgrundsmaterial uteslöts nästan helt vid tillsatsen av ättiksyra. Då volymen inte var densamma inom de olika metoderna kan dock inte volymen uteslutas som en möjlig faktor. En vidare studie vore att rekommendera.

Omnämmanden

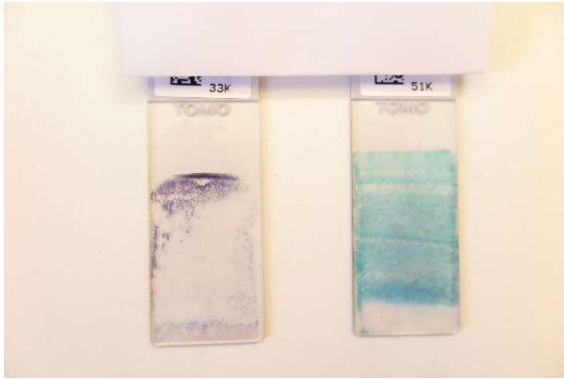
Vi önskar tacka vår metodhandledare Anna-Karin From som har varit en mycket bra handledare genom hela vårt examensarbete. Hon har varit mycket tillmötesgående och hjälpsam. Vi önskar även tacka Bodil Isén som i egenskap av cytodiagnostiker har hjälpt oss att bedöma samtliga glas, trots tidsbrist från hennes sida. Likaså önskar vi tacka Ute Engel som i egenskap av cytopatolog gjorde en översiktlig bedömning av våra glas och fyllde i protokollet vi gav henne. Vi önskar även tacka patologen och inte minst cytologen som avdelning för att vi har fått göra vårt examensarbete hos dem och lånat deras lokaler och instrument. Till sist önskar vi förstås även tacka vår vetenskapliga handledare och tillika lärare under flera år, Jan Strindhall, för hans vägledning under uppsatsskrivandet och för att han alltid har varit lika uppmuntrande och tillmötesgående.

Referenser

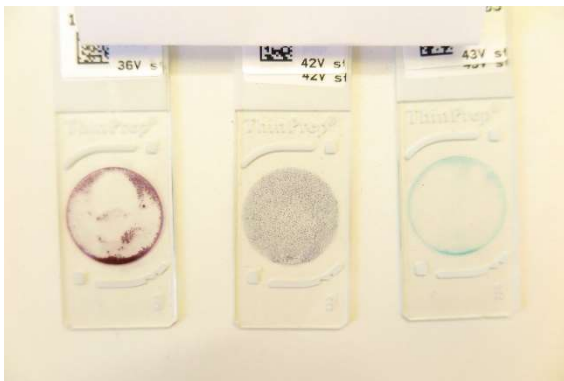
- [1] T. Taira, A. Kawahara, T. Yamaguchi, H. Abe, Y. Ishida, Y. Obake, Y. Naito and M. Kage, "Morphometric Image Analysis of Pancreatic Disease by ThinPrep Liquid-Based Cytology," *Diagnostic Cytopathology*, vol. 40, pp. 970-975, 2012.
- [2] Y. Lee, J. Hwang, S. Son, S. Choi, H. Lee, E. Kim, H. Han, J. Y. An, J. Han och O. Lee, "Comparison of diagnostic accuracy between CellprepPlus® and ThinPrep® liquid-based preparations in effusion cytology," *Diagnostic Cytopathology*, pp. 384-390, 2014.
- [3] S. Yamada, T. Fujii, M. Kanda, H. Sugimoto, S. Nomoto, S. Takeda, A. Nakao och Y. Kodera, "Value of peritoneal cytology in potentially resectable pancreatic cancer," *British Journal of Surgery*, pp. 1791-1796, 2013.
- [4] L. Bala, A. Sharma, R. K. Yellapa, R. Roy, G. Choudhuri och C. L. Khetrpal, "1 H NMR spectroscopy of ascitic fluid: discrimination between malignant and benign ascites and comparison of the results with conventional methods," *NMR in Biomedicine*, pp. 606-614, 2008.
- [5] A. Fischer, A. Clayton, J. Bentz, P. Wasserman, M. Henry, R. Souers and A. Moriarty, "Performance Differences Between Conventional Smears and Liquid-Based Preparations of Thyroid Fine-Needle Aspiration Samples," *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, vol. 137, pp. 26-31, 2013.
- [6] H. Rana, "Non-gynecologic cytology on liquid-based preparations: A morphologic review of facts and artifacts," *Diagnostic Cytopathology*, vol. 35, pp. 621-634, 2007.
- [7] R. Esther and F. Guido, "Thin-layer liquid-based preparation of non-gynaecological exfoliative and fine-needle aspiration biopsy cytology," *Diagnostic Histopathology*, vol. 14, pp. 563-570, 2008.
- [8] M. Pérez-Sayáns, M. Reboiras-López, P. Gayoso-Dizbc, F. Seijas-Nayaa, J. Antúnez-Lópezd, J. Gándara-Reya and A. Garcia-Garcíaab, "Non-computer-assisted liquid-based cytology for diagnosis of oral squamous cell carcinoma," *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 87, pp. 59-65, 2012.
- [9] Hologic Inc., *ThinPrep®5000 Processor Operator's Manual*, Marlborough, MA, USA, 2008.
- [10] Landstinget i Kalmar län, *Metodbeskrivning Exsudat*, Kalmar: Landstinget i Kalmar län, 2015.
- [11] Länssjukhuset Ryhov, *ThinPrep5000Processor*, Jönköping, Sverige, 2015.
- [12] Hologic, "ThinPrep 5000 Processor," [Online]. Available: <http://www.hologic.com/products/clinical-diagnostics-and-blood-screening/instrument-systems/thinprep-5000-processor>. [Accessed 26 03 2016].

- [13] P. Konofaos, P. Tomos, K. Malagari, A. Karakatsani, D. Pavlopoulos, E. Lachanas, M. Flessas, A. Kostakis and P. Karakitsos, "The role of ThinPrep cytology in the investigation of lung tumors," *Surgical Oncology*, vol. 15, pp. 173-178, 2006.
- [14] S. Dawod och V. Warda, "Jämförelse mellan vätskebaserad cytologi med hjälp av ThinPrep® 5000 Processor och konventionell metod baserad på blåssköljväska," Hälsöhögskolan i Jönköping, Jönköping, 2010.
- [15] B. Strander, A. Andersson-Ellström, I. Milsom, T. Rådberg and W. Ryd, "Liquid-based Cytology Versus Conventional Papanicolaou Smear in An Organized Screening Program," *Cancer Cytopathology*, vol. 111, no. 5, pp. 285-291, Oktober 2007.
- [16] Länssjukhuset Ryhov, *Exsudat preparering*, Jönköping, 2015.

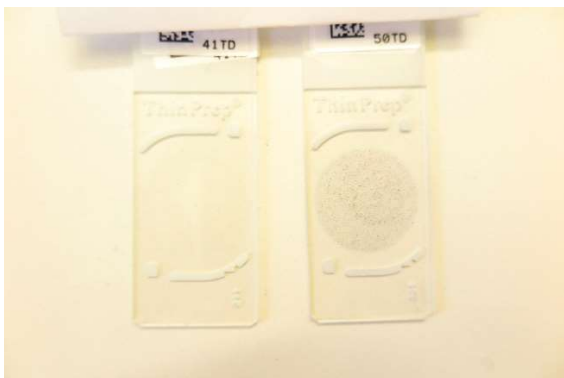
Bilaga 1 Makroskopiska översiktsbilder på ett urval av glasen



Figur 2A Två glas preparerade med konventionell metod. På det högra glaset (prov 33) ses ett exempel på hur fällning kunde se ut.



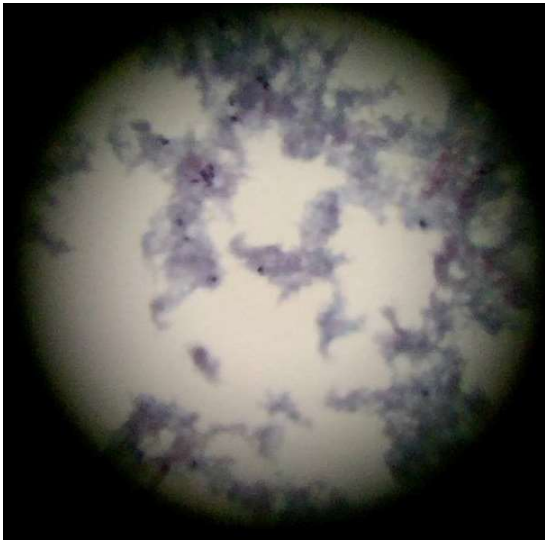
Figur 2B Tre glas preparerade med vätskebaserad metod. De båda yttersta glasen påvisar ring.



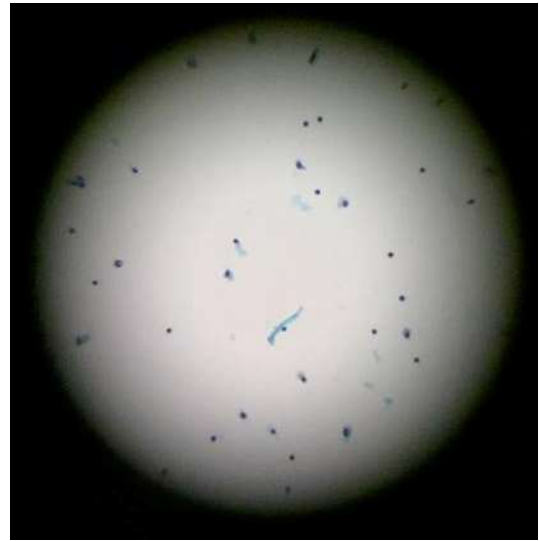
Figur 2C Två glas som tillsatts ättiksyra i samband med vätskebaserad metod. Det högra är blodigt medan det vänstra är rent.

Bilaga 2 Mikroskopiska översiktsbilder på ett urval av glasen

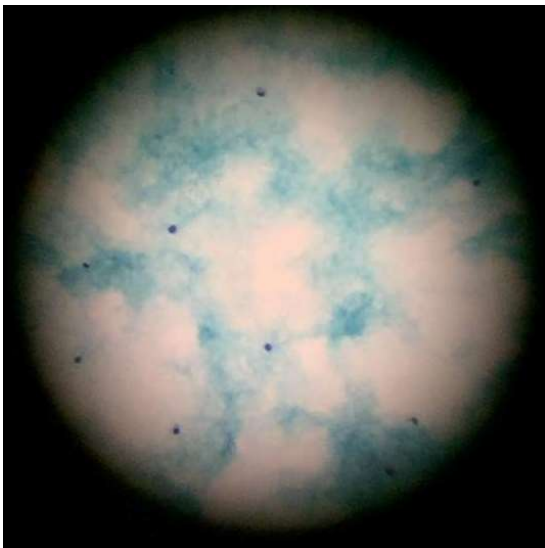
Notera: Bilderna är tagna genom ett okular med en mobilkamera.



Figur 3A Ett glas preparerat med konventionell metod. Notera bakgrundsmaterialet.



Figur 3C Ett glas med tillsatt ättiksyra i samband med preparering med vätskebaserad metod. Notera avsaknad av bakgrundsmaterial.



Figur 3B Ett glas preparerat med vätskebaserad metod. Notera bakgrundsmaterialet.