

Collodion bag til præparering af cytologisk materiale

Bachelorprojekt har vist, at der er flere fordele ved at skifte fra plasma/trombin-metode til Collodion bag-metode

På Patologiafdelingen på Rigshospitalet (RHPA) anvendes rutinemæssigt plasma/trombin-metoden (PT) til at lave kunstige koagler af serøse væsker samt skrabe-koagler. PT præpareres ved, at der tilføjes plasma til prøvematerialet og derefter trombin for at danne et kunstigt koagel, som hældes i en koagelpose. Cellerne bliver på denne måde samlet, så det kan fikseres. Efter fiksering skræbes koaglet af posen og indstøbes i paraffin. Herved kan der skæres snit til rutine-, immun- og specialfarvninger.

Det, vi ønskede med dette bachelorprojekt, var at afdække, om præparationsmetodens egnethed til at stille en diagnose ud fra cellemorfologi, cellularitet, farvekvalitet og immunreaktioner ville påvirkes af at udskifte plasma/trombin-metoden med en alternativ teknik, collodion bag-metoden (CB).

Resultaterne fra forsøget viste, at bevaring af morfologi, cellularitet og egnethed til diagnostik var det samme eller bedre i prøver præpareret ved CB-metoden sammenlignet med PT-metoden. Desuden var farvningerne upåvirkede af metoden.

Baggrund

Hver tredje dansker får cancer, og det er den hyppigste dødsårsag blandt personer under 65 år. [1] Det betyder, at der er stort fokus på forebyggelse, diagnosticering og behandling af denne gruppe af sygdomme. Cytologiske undersøgelser er et vigtigt redskab i diagnose, prognose og opfølgning af behandling af patientprøver med formodet cancer. Ofte undersøges serøse væsker fra eksempelvis bughulen (ascitesvæske) eller pleurahulen (pleuravæske), som kan indeholde celler, der er diagnostisk relevante, såsom cancer-, mesotel- og inflammatoriske celler, hvilket kan give en identifikation af den primære certype, der eventuelt er metastaseret. [2] Der fremstilles celleudstrygninger og kunstigt koagel på de serøse væsker samt skrabe-koagler, og ud fra det kunstige koagel laves celleblokke, hvoraf der skæres snit til mikroskopi.

Der er nogle udfordringer ved PT-metoden. En af dem er, at man kunne forestille sig, at der går diagnostisk relevante celler tabt, når koaglet fra posen skræbes sammen i forbindelse med

indstøbningen [3]. Derved kan det formodes, at de ligger yderst i koagelposen. Det kan ses makroskopisk ved, at der er prøvemateriale tilbage på posen, hvilket antyder, at en væsentlig mængde celler ikke medtages (figur 1). Især kunne man risikere, at tumorceller ikke kommer med, da det kan tænkes, at de er tungere og større end almindelige celler, da de indeholder mere kromatin. [4] Koagelposen, der bliver brugt ved PT-metoden, kan ikke indstøbes, men det kan collodionposen, da mikrotomet kan skære igennem den. Ud over den oplagte fordel, at ingen celler går tabt, vil det også lette arbejdet for bioanalytikeren, som kan udføre indstøbning og skæring hurtigere med CB- end PT-metoden. En anden fordel ved CB-metoden er, at det, der skal indstøbes, vil være samlet. Derfor vil prøvematerialet også ligge mere samlet på objektglasset, og derved er det lettere og hurtigere at mikroskopere for lægen, som ikke skal lede efter cellerne. Det er også vigtigt at undgå tilblanding mellem prøverne, hvilket der er en væsentlig risiko for ved indstøbning af kunstige koagler præpareret ved PT-metoden. Dette vil man undgå ved CB-metoden.

Immunfarvninger er vigtige i forhold til diagnostik, da de kan be- eller afkræfte nogle forudninger om en certype ret specifikt og dermed målrette behandlingen. Antistofferne er specifikke for bestemte antigener, og det giver derfor lægen vigtig information omkring celletyper og oprindelsesorgan. Derfor var det også af afgørende betydning, at CB-metoden ikke ville påvirke immunfarvningerne.

Collodion bag

Collodion bag er en metode, hvor alle celler bliver samlet i en "pose" fremstillet af collodionopløsning. Collodion er en sirupagtig klar væske bestående af 0,04 gram pyroxylin (også kaldet nitrocellulose) pr. mL, 75 % ether og 25 % ethanol, som bliver til en ret stærk, gennemsigtig hinde, når den tørrer (figur 2). CB-posen er en semi-permeabel membran med en masse små porer, hvor vand og små molekyler ($< \sim 5000$ g/mol) kan passere frit, mens større molekyler, som eksempelvis celler, bliver inde i posen.

Collodionopløsningen er sundhedsskadelig, kan forårsage



Af bioanalytiker //
Line Hejmdal
Patologiafdelingen, Rigshospitalet

Vejledere:
Camilla Qvist, bioanalytikerunderviser,
Patologiafdelingen, Rigshospitalet
Susanne Wahl, lektor, Professions-
højskolen Metropol, København



Figur 1 Indstøbning af kunstigt koagel præpareret ved plasma/trombin-metoden.



Figur 2 Collodionposen.

sløvhed og kan være eksplosiv i fast form. Dog er det ikke problematisk at arbejde med under de vejledende forholdsregler.

Metode

Der blev indsamlet 25 patientprøver til studiet. Metoderne blev afprøvet på diverse prøvetyper (serøs væske, peritoneal skyllevæske og skrabe koagler fra lunge-, mamma- og thyreoidea væv), og følgende farvninger blev udført: Hæmatoxylin/Eosin (HE), Alcian Blue Van Gieson (ABVG), Periodsyre-Schiff

Tabel 1 Oversigt over, hvilke farvninger der blev udført på hvilke prøvetyper.

Ascites- og pleuravæske	HE ABVG PAS PAS-d CALRET TTF-1
Peritoneal skyllevæske	HE ABVG PAS PAS-d CALRET CD68KP1
Skrabe koagel, thyreoidea	HE TPO CK19 HBME-1
Skrabe koagel, lunge	HE CALRET CK7 TTF-1
Skrabe koagel, mamma	HE CK7 ER TTF-1

(PAS), Periodsyre-Schiff-diastase (PAS-d) og udvalgte immunfarvninger (tabel 1). Valget af immunfarvninger blev foretaget af overlæge Katalin Kiss. De valgte farvninger er dem, der på nuværende tidspunkt ofte laves på PT på RHPA, som CB eventuelt kan erstatte. Det var således interessant at se, om og hvordan CB-metoden påvirker disse farvninger.

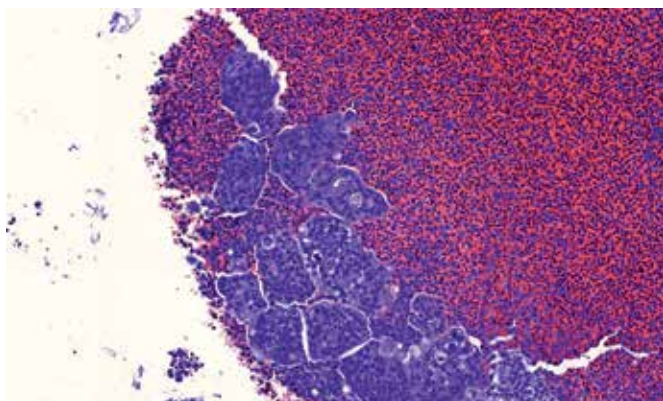
Inspirationen til metoden er videoen "The Collodion Cell Block Bag Technique – The Method of Mah" [5], som vores fremgangsmåde tog udgangspunkt i. Dog tilpassede vi nogle få ting, bl.a. anvendte vi en anden collodionopløsning, SIGMA Aldrich, end i videoen. I videoen fortæller de heller ikke, hvilken tråd de bruger til at binde collodionposen sammen med, så vi valgte at bruge sytråd, da det er tyndt og nemt at binde en knude med samt uproblematisk kan skæres igennem af mikrotomet.

Alt prøvemateriale kom ufikseret fra de medicinske afdelinger, hvor prøven blev taget, så eventuel forskel på fiksering eller mangel på samme ikke influerede på resultaterne. De celleudstrygninger, der blev brugt til at lave skrabe koagler, var lavet af overlæge Katalin Kiss til projektet ved at "skrabe" ned i en frisk tumor, afsætte materialet på et objektglas og stryge det ud. Prøvematerialet anvendt til CB og PT var for celleudstrygningerne det samme, hvorved direkte sammenligning var mulig.

Bevarelsen af morfologien, cellularitet og egnethed til diagnostik på snit præpareret med CB-metoden blev vurderet ud fra scorerne "dårligere", "det samme" eller "bedre" sammenlignet med PT. Kvaliteten af farvningerne blev vurderet ud fra definitioner om optimal farvning.

Resultater og diskussion

Vores resultater viste, at morfologisk og cellularitetsmæssigt er prøver præpareret med CB-metoden af samme eller bedre kvalitet end PT for både væsker og skrabe koagler. I cirka en tredjedel af prøverne blev morfologien endda vurderet bedre end ved prøver præpareret vha. PT-metoden. Det virker til, at prøver fra CB-metoden er bedre bevaret i forhold til k/c ratio



Figur 3 En samling af tumorceller (HE-farvning, forstørrelse $\times 11,55$).

samt afgrænsning af kerne og cytoplasma. Det kan skyldes, at præpareringsmetoden og indstøbning i collodion bag er mildere ved cellerne end plasma/trombin. Desuden ligger cellerne enkeltvis – tumorcellerne også i små grupper (figur 3) – mens cellerne i prøver præpareret ved PT-metoden ligger mere rodet og klumpet sammen.

Alle prøverne præpareret ved CB-metoden er fuldt egnede til diagnostik. Dog virker det til, at CB-metoden viser bedre resultater i forhold til PT ved cellefattige prøver, hvilket kan skyldes, at man med denne metode får næsten alle celler med, og at der ikke går nogen tabt ved overføring af det kunstige koagel til koagelposen og igen ved indstøbning.

Indstøbning

Indstøbningen er et centralt tema i sammenligningen af de to præpareringsmetoder. Når det kunstige koagel, som er præpareret ved PT-metoden, indstøbes, så er det ikke muligt at lægge det fuldstændigt ensartet i indstøbningsformen. Cellerne kommer derved til at ligge i lidt forskellige lag i blokken. Det betyder, at de snit, der skæres, ikke er helt ensartede, hvilket de vil være i snit fra en prøve præpareret ved CB-metoden. Ved CB-metoden er det også muligt at orientere prøvematerialet, da man med pincetten kan vende posen, som man ønsker (figur 4). Man kan derved få størst mulig celleoverflade på snitene. Derudover kan indstøbningen af CB posen være mere sikker, da en af de større risici ved indstøbning af PT-præparerede prøver er tilblending fra andre patientprøver.

Farvninger

De histologiske farvninger HE, PAS, PAS-d og ABVG påvirkes ikke. Dog blev collodionposen farvet turkis af Alcian Blue i ABVG-farvningen, hvilket ikke i sig selv er noget problem, men det kan give udfordringer, hvis posen ligger over cellerne (figur 5 og 6). Morfologien er ikke ændret, men det kan være svært at



Figur 4 Indstøbning af collodion bag-posen.

se cellerne, eller de er utydelige. Hvis prøven er cellerig, udgør det ikke et stort problem. Dog kan man i yderste konsekvens risikere, at lige netop de få tumorceller, der eventuelt er i prøven, ligger under posen. I dette tilfælde risikerer man at overse dem.

Overordnet set var immunfarvningerne på prøverne præpareret med CB-metoden tilfredsstillende. Bortset fra én havde alle væsker og skrabeagler minimum fuldt acceptabel immunreaktion og var således egnede til diagnostik. Det var ikke muligt at sammenligne med PT-metoden, da der ikke var lavet immunfarvninger på de prøver.

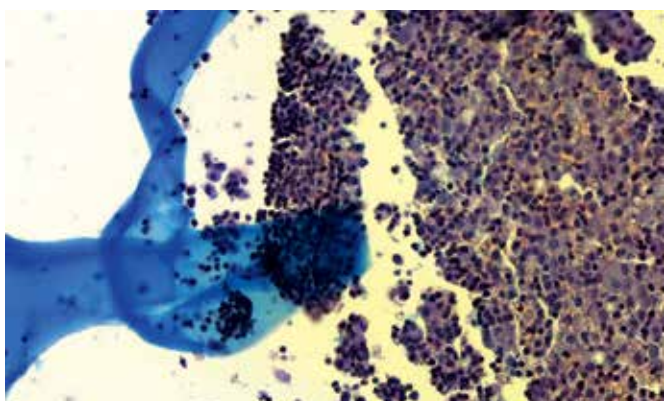
Andre faktorer

Om indstøbningen af posen i CB-metoden kan påvirke skæringen, blev vurderet af tre forskellige rutinerede bioanalytikere. 31 ud af 35 snit blev vurderet til at være ens at skære med kommentarer om, at der ikke var problemer med at skære i posen eller sytråden. Alle fire snit, der blev vurderet dårligere at skære end PT, blev skåret af samme bioanalytiker, som ikke skar andre CB-snit. Vi havde et ønske om at blinde prøverne, så de, der skulle skære snitene, ikke blev påvirket af tidligere erfaringer om, hvad der er nemt og svært at skære, eller forudindtagede meninger. Det viste sig dog ikke muligt i praksis, da man på blokkene kunne se, hvilken metode der er anvendt, i og med at CB-metoden har posen og tråden med i paraffinblokken. Der virker ikke til at være nogen fællesnævner for de fire prøver, der blev vurderet dårligere at skære, da det var to serøse væsker og to skrabeagler. Det kan eventuelt skyldes, at man er vant til at skære én type materiale og skal vænne sig til noget nyt.

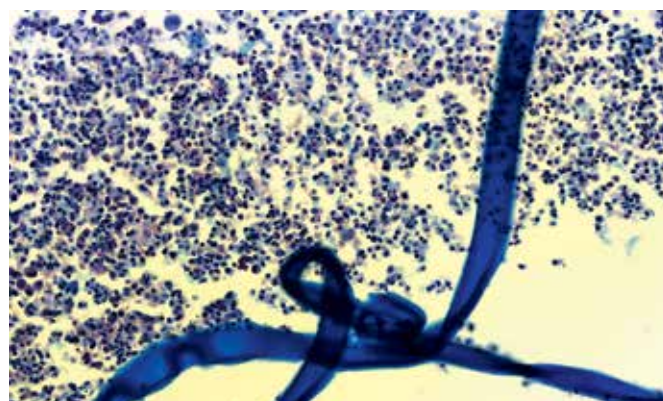
Coatning af glas tager tid, men man kan coate flere ad gangen, da de kan stå i mindst en måned. [6] På baggrund af erfaringer om, hvor mange prøver der modtages i en tidsperiode, kan man eksempelvis coate en gang om måneden. Der er en væsentlig forskel på, hvor lang tid det tager at indstøbe prøver



Præparering af cytologisk materiale ved collodion bag-metoden.



Figur 5 CB-poseden ligger over cellerne ved ABVG-farvning.



Figur 6 CB-poseden ligger over cellerne ved ABVG-farvning.

af de to præpareringsmetoder. Gennemsnitstiden for indstøbning af PT-præparerede prøver viste sig således næsten dobbelt så lang som CB-præparerede prøver.

Selvfølgelig har alle metoder både fordele og ulemper. CB-opløsningen er eksplosiv og brandfarlig, men det virker dog ikke farligt i videoen [5], og oplevelsen ved at arbejde med den var ligeledes ukompliceret. Det er klart, at den skal opbevares og håndteres korrekt og med varsomhed. Den skal opbevares i brandskab, og der skal arbejdes med den i stinkskab iført handsker og uden antændelseskilder i nærheden. På en patologiafdeling anvendes der mange andre væsker med et kompliceret sikkerhedsdatablad som eksempelvis pikrinsyre, der bruges i Van Gieson-farvningen, eller formalin, der bruges til fiksering.

Konklusion og perspektivering

Med dette projekt har vi vist, at collodion bag-metoden er bedre end plasma/trombin-metoden på en række punkter, men pga. tidsrammen, som følger et bachelorprojekt, er der brug for at undersøge området nærmere inden en eventuel implementering af metoden rutinemæssigt. Der udføres i efteråret 2014 et bachelorprojekt af bioanalytikerstuderende Ditte Sonne Wridt og Karen Jacobsen på samme patologiafdeling, hvor de vil undersøge metoden specifikt i forhold til thyreoidea-finnåle og cystevæsker fra halsen.

Det kunne også være interessant at udføre undersøgelsen med kendte diagnoser. I vores studie vidste vi ikke, om vi kun fik benigne eller maligne prøver, da vi skulle have friskt prøvemateriale og således ikke kunne vente på diagnosticering.

CB-metoden vil umiddelbart kunne anvendes på en patologiafdeling. Implementering af metoden vil dog kræve oplæring af personale samt eventuelt ændring af immunprotokoller. Desuden skal der måske også en holdningsændring til i forhold til den umiddelbare tanke, at "det er farligt!" Det er op-

til det enkelte laboratorium at tage stilling til, hvorvidt man vil vurdere at få en umiddelbart højere diagnostisk kvalitet i forhold til det laboratoriesikkerhedsmæssige. Det er ikke nødvendigvis farligere eller mere problematisk end meget andet, vi som bioanalytikere bruger i laboratoriet for at hjælpe en patient til at blive diagnosticeret hurtigt og præcist. Det vil altid være en afvejning mellem bioanalytikerens sikkerhed, og hvad der er bedst for patienten.

Tak

Bachelorprojektet er udført i samarbejde med bioanalytikerne Tina Svendsen og Sandra Wattenburg, til hvem jeg siger en stor tak for godt samarbejde og sparring i forbindelse med projektet og efterfølgende udarbejdelse af poster til Rigshospitalets Symposium for Bioanalytikere 2014. Vores vejledere har været en stor hjælp og støtte i forbindelse med projektet og de skal have en særlig tak for deres engagement og værdifulde vejledning. Jeg vil også sige tak til overlæge Katalin Kiss, Patologiafdelingen, Rigshospitalet, for hendes bidrag til vores projekt. □

Referencer:

- 1 Kræftens Bekæmpelse. Til fagfolk: Nøgletal og baggrundsviden. 15. dec 2013. http://www.cancer.dk/fagfolk/noegletal_og_baggrundsviden/
- 2 Thomsen U, Ringsholt M, Wahl S, Kopke P, Balslev E og Nielsen K. Basisbog i Eksfoliativ Cytologi. Bioanalytikeruddannelsen i København; 2002.
- 3 Hecht SA and McCormack M. Comparison of three cell block techniques for detection of low frequency abnormal cells. Pathology and Laboratory Medicine International. 2013 Jan 3rd;5:1-7.
- 4 Vyberg M. Patologi og farmakologi. 2. udgave. Munksgaard Danmark: 2008.
- 5 The Collodion Cell Block Bag Technique – The Method of Mah [video on the Internet]. California, USA: California University San Francisco; 2013 [published 2013 March 5; cited 2013 June 18]. Available from: <http://www.youtube.com/watch?v=nfR17d5-boI>
- 6 Fahey C and Bedrossian UK. Collodion Bag: A cell block technique for enhanced cell collection. Laboratory Medicine. 1993 Feb;24(2):94-6.



Se videoen "The Collodion Cell Block Bag Technique".



dbio MED I FÆLLESSKAB FOR EN HALV MILLION OFFENTLIGT ANSATTE

Når du fremover ser navnet Forhandlingsfællesskabet nævnt, handler det også om bioanalytikere. Danske Bioanalytikere stiftede nemlig den 8. oktober sammen med 52 andre organisationer Danmarks største forhandlingsfællesskab. Det foregik i Arbejdermuseets festsal i København. På talerstolen ses Grete Christensen, formand for DSR, for Sundhedskartellet og nu også næstformand i Forhandlingsfællesskabet. Yderst til venstre står Anders Bondo, formand for Danmarks Lærerforening og for det nye fællesskab. Danske Bioanalytikeres formand Bert Asbild og forhandlingschef Joy Strunck sidder ved bord to fra venstre.

Følg med i OK 15
korturl.dk/tpk

FORHANDLINGSFORLØBET

