

ThinPrep 2000 vs. Shandon CytoSpin 3

- Præparering og May-Grünwald-Giemsa Farvning af Non-Gynækologisk Cytologi.

Artiklen er skrevet på baggrund af et bachelorprojekt udført af Bolette Bangsbo og Line Brandt Kronborg.

I dette studie sammenlignes præparering og May-Grünwald-Giemsa (MGG) farvning af non-gynækologisk cytologi på både ThinPrep 2000 og Shandon CytoSpin 3.

Der blev medtaget 30 prøver i forsøget, heraf 20 Bronkie Alveolære Lavager (BAL), 4 pleuravæsker, 4 ascitesvæsker og 2 cystevæsker. Alle væsker blev præpareret på både ThinPrep 2000 og Shandon CytoSpin 3, hvorefter de blev farvet med MGG. Ved præparering af de serøse væsker, samt cystevæskerne opnåedes den bedste diagnostiske kvalitet ved anvendelse af CytoSpin. Men ved præparering af BAL-væskerne gav begge præparationsmetoder en god diagnostisk kvalitet, dog fremgik det tydeligt, at cellerne var meget bedre bevarede ved præparering på ThinPrep.

Derudover kunne konkluderes, at det efter en optimering af MGG-farvningen, var muligt at farve non-gynækologisk materiale præpareret på ThinPrep, og stadig opnå samme farvekvalitet, som på konventionelt præpareret materiale.

Formålet med forsøget var at indføre præparering af non-gynækologisk cytologi på ThinPrep med henblik på, at der ønskedes indført en standardisering af præpareringen af non-gynækologisk cytologi på Rigshospitalets Patologiafdeling. Desuden var formålet at udføre en optimal MGG-farvning på non-gynækologisk cytologi præpareret på ThinPrep med henblik på at opnå samme eller bedre farvekvalitet, i forhold til den farvekvalitet, der opnås ved anvendelse af Rigshospitalets Patologiafdelings nuværende MGG-farvemetode.

Baggrund

Ved præparering af non-gynækologisk cytologi på CytoSpin er der flere parametre, der har betydning for det færdige præparats kvalitet. Præparering på CytoSpin resulterer ofte i autolyse, hvilket blandt andet er et problem ved præparering af BAL-væsker, idet det færdige præparat differentialtælles. Hvorfor det er vigtigt, at der kan skelnes mellem de forskellige celletyper. Derudover har det været et problem, at der kan forekomme forstyrrende elementer i baggrunden såsom blod og slim, samt at cellerne ofte er lejret i flere lag, hvilket vanskeliggør mikroskoperingen af præparatet.

Disse problemstillinger påvirker vurderingen af cellerne under mikroskopering, og dermed også den efterfølgende diagnosticering.

På Rigshospitalets Patologiafdeling anvendes hovedsageligt MGG til farvning af non-gynækologi. Producenten af ThinPrep anbefaler dog, at der anvendes Papanicolaou-farvning (PAP). Men da man på Rigshospitalets Patologiafdeling gerne vil beholde MGG-farvningen, kunne det være interessant at undersøge, om det er muligt at farve MGG på BAL, pleura-, ascites- og cystevæsker præpareret på ThinPrep.

Shandon Cytospin 3

Ved præparering af non-gynækologisk cytologi på Shandon CytoSpin 3 benyttes centrifugalkraft. Princippet er kraftig centrifugering, hvilket resulterer i en opkoncentration af cellerne¹, hvorefter disse tvinges ud på et objektglas. Centrifugalkraften flader cellerne ud, hvormed cellekernens morfologi bliver mere tydelig. Resultatet skulle være ét cellelag indenfor et defineret område på et objektglas².

ThinPrep 2000

ThinPrep er en væskebaseret tyndtlagsteknik, der bl.a. anvendes til præparering af non-gynækologisk cytologi. Det overordnede princip for ThinPrep er, at prøvematerialet homogeniseres og forstyrrende elementer, såsom blod og slim, fjernes. Under præpareringen anvendes CytoLyt Solution – en opløsning der lyser erythrocytter og opløser slim. Dermed resulterer præparering på ThinPrep i, at cellerne lejres jævnt i ét lag og at baggrunden bliver mere ren³.

ThinPrep anvender et softwareprogram og en Non-gyn filtermembran, der kan kontrollere homogenisering, opsamling og overførsel af diagnostiske celler fra prøve til objektglas (se figur 1 side 17). Dermed fås et aftryk af celler på objektglasset, der er repræsentativt for hele prøven.

May Grünwald Giemsa

MGG-farvningen er primært en cytologisk oversigtfarvning, der består af to farveopløsninger: May-Grünwald, der indeholder anionfarvestoffet Eosin Y og kationfarvestoffet Methylenblå, og Giemsa, der indeholder anionfarvestoffet Eosin Y og kationfarvestofferne Methylenblå, Azur A og B.

Eosin Y farver rødt og Methylenblå, Azur A og B farver blåt^{4,5}.

Det specielle ved MGG-farvningen er Romanowsky-Giemsa(RG)-effekten, som forekommer i Giemsa-farveopløsningen mellem Eosin Y og Azur B⁶. RG-effekten opstår kun, hvor der er tæt relation mellem polyanioner (negative cellekomponenter) og polykationer (positive cellekomponenter) (se figur 2 side 17). Denne tætte relation findes bl.a. i cellekerner mellem DNA (polyanion) og histoner (polykationer).

Der opstår meget stærke bindinger mellem disse, hvormed elektronerne skal anslås med mere energirigt lys. Dette vil re-



Af bioanalytikere // Bolette Bangsbo og Line Brandt Kronborg Patologisk Afdeling, Rigshospitalet.

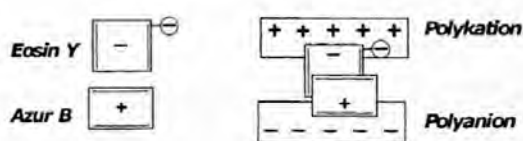
Vejledere // Camilla Qvist, bioanalytikerunderviser Patologisk afdeling, Rigshospitalet. Susanne Wahl, lektor Bioanalytikeruddannelsen KBH.



ThinPrep 2000



FIGUR 1. Overførsel af prøvemateriale fra ThinPrep-beholder til objektglas. ThinPrep® 2000 Operator's Manual. © Cytoc Corporation, 1995.



FIGUR 2. RG-effekten; Azur B og Eosin Y bindes til forskellige cellekomponenter i kernen, hvorefter de lejres tæt mod hinanden, hvilket skaber RG-effekten. Prentø P. et al.: "Kompendium i Kemiske og Biokemiske Analyseprincipper". Bioanalytikeruddannelsen København, 2002.

Resultatvurdering

TABEL 1. Den diagnostiske kvalitet (DK) for hvert præparat blev vurderet ud fra følgende scoresystem:

DIAGNOSTISK KVALITET	
Score	
2	Optimal diagnostisk kvalitet indebærer, at alle de celletyper, der karakteriserer den enkelte prøvetype, er til stede, hvormed prøven kan anvendes til at stille en diagnose. Desuden skal prøven have opnået en gennemsnitlig score på 2-3 i diagnostisk relevant cellebillede samt en score på 3 i farveresultatet.
1	Acceptabel diagnostisk kvalitet indebærer, at en eller flere af de celletyper, der karakteriserer den enkelte prøvetype, er til stede, hvormed prøven kan anvendes til at stille en diagnose. Prøven skal desuden have opnået en gennemsnitlig score på 1-2 i diagnostisk relevant cellebillede samt en score på 2 i farveresultatet.
0	Dårlig diagnostisk kvalitet indebærer få eller ingen tilstedeværelse af de celletyper, som karakteriserer den enkelte prøvetype. Prøven vil derudover have opnået en gennemsnitlig score på 0-1 i diagnostisk relevant cellebillede samt en score på 0-1 i henhold til farveresultatet. Denne prøve er uegnet og kan ikke anvendes.

Alle præparater fik desuden tildelt en score inden for diagnostisk relevant cellebillede og farveresultat. Her gik scoringsværdierne fra 0-3, hvor 3 var det optimale resultat.

sultere i en kortere bølgelængde, hvormed der fremkommer en purpurfarvning af cellekerne. Denne purpurfarve er karakteristisk for RG-effekten^{4,5,6,7}.

Metoder

Der blev indsamlet prøvemateriale over en periode på 4 uger på Rigshospitalets Patologiafdeling.

Til hver prøve blev der lavet 2 præpareringer af pågældende prøvemateriale. Hver prøve blev derfor delt i to, dvs. der laves en split-sample. Én prøve blev præpareret på CytoSpin (her anvendes det præparat, som også bruges til rutinemæssig diagnosticering på Rigshospitalets Patologiafdeling.), og én prøve blev præpareret på ThinPrep. Til MGG-farvning af ThinPrep-præparaterne var det nødvendigt at ændre farvemethoden for at opnå et optimalt farveresultat.

For at kunne finde frem til en farvemethode, som gav et optimalt farveresultat, eksperimenteredes med ændring af forskellige parametre, såsom koncentration, pH, farvetid og fiksering.

Resultater og diskussion

Vi har i denne artikel valgt at lægge vægt på resultaterne for

Bronkie Alveolær Lavage (BAL), da det var indenfor for denne prøvetype, at vi opnåede de bedste resultater (se figur 3 side 18).

Baggrundsdebris

85 % af BAL-væskerne præpareret på ThinPrep fik en acceptabel score i forhold til mængden af baggrundsdebris. Hertil fik kun 40 % af BAL-væskerne præpareret på CytoSpin en acceptabel score.

Ud fra dette ses, at præparering på ThinPrep mindsker mængden af baggrundsdebris i forhold til præparering på CytoSpin. Dette skyldes formentlig, at der under præpareringen på ThinPrep anvendes CytoLyt Solution, som fjerner forstyrrende baggrundselementer i prøvematerialet såsom blod, hvilket ofte ses i serøse væsker pga. indstikket ved udtagning af prøvematerialet³ (se billede 2A og 2B side 18).

Monolag

100% af BAL-væskerne præpareret på ThinPrep fik en acceptabel score i forhold til monolag. Derimod fik kun 40% af BAL-væskerne præpareret på CytoSpin en acceptabel score.

Stort set alle 30 ThinPrep-præparater havde tydeligt mono-

Shandon CytoSpin BAL



95 % acceptabel score
5 % optimal score

ThinPrep 2000 BAL

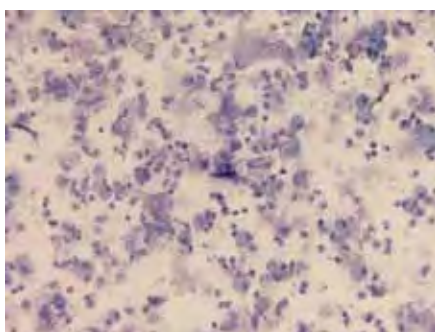


85 % acceptabel score
55 % optimal score

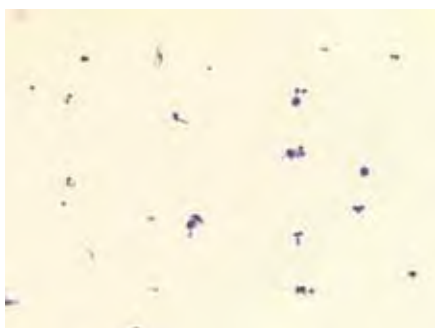
FIGUR 3. Diagnostisk kvalitet for Bronkie Alveolær Lavage (BAL) præpareret på både CytoSpin og ThinPrep.

DK = 0; dårlig diagnostisk kvalitet, DK = 1; acceptabel diagnostisk kvalitet, DK = 2; optimal diagnostisk kvalitet.

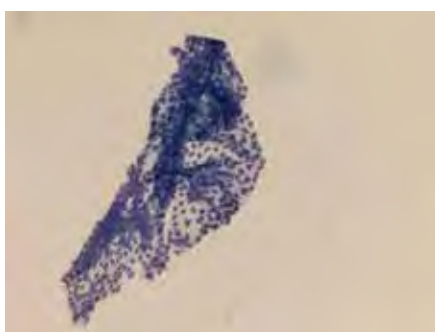
Sammenligning af indholdet af baggrundsdebris i non-gynækologisk prøvemateriale præpareret på både CytoSpin og ThinPrep.



BILLEDE 2A. Baggrundsdebris i prøve præpareret på CytoSpin. Forstørrelse 10 x.



BILLEDE 2B. Baggrundsdebris i prøve præpareret på ThinPrep. Forstørrelse 10 x.



BILLEDE 3. ThinPrep-præparat med mesotelcellegruppe. Forstørrelse 10 x.

lag, der var dog tilfælde, hvor cellerne havde tendens til at samles i klumper (se billede 3).

Andre videnskabelige artikler^{8,9} angiver at de ligeledes har oplevet celleansamlinger på trods af celledispersionen under præpareringen. Dog finder de også, at der i ThinPrep-præparaterne er en øget forekomst af enkeltliggende celler.

CytoSpin-præparaterne er præget af større mængder baggrundsdebris, hvilket kan påvirke monolaget, da cellerne vil

kunne ligge under, ovenpå eller imellem denne baggrundsdebris. Dette kan gøre det umuligt at skelne de enkelte celler. Da ThinPrep-præparaterne indeholder mindre baggrundsdebris, kan dette også medvirke til et bedre monolag.

En anden mulighed kunne være, at ThinPrep generelt er bedre til at fremstille præparater med monolag sammenlignet med CytoSpin, formentlig pga. celledispersionen, som er en del af ThinPrep præpareringsmetoden. Dispersionen har til funktion at adskille sammenklummet materiale, samt sprede evt. slim i prøvematerialet, således at de færdige ThinPrep-præparater har monolag.

Morfologi

I forhold til cellemorfologien fik 80% af BAL-væskerne præpareret på ThinPrep en acceptabel score. Derimod fik kun 40% af BAL-væskerne præpareret på CytoSpin en acceptabel score.

I flere af ThinPrep-præparaterne var der velbevarede respiratoriske epitelceller med tydelige cilier (se billede 4A og 4B). Tilstedeværelse af cilier er et tegn på raske celler, hvormed disse er diagnostisk vigtige¹⁰. Andre videnskabelige artikler^{8,11,12,13} angiver alle, at de har oplevet bedre bevarede celler, med bedre morfologi ved præparering på ThinPrep frem for præparering på CytoSpin.

Der ses en tydelig skrumpning af cellerne, i alle 30 prøver præpareret på ThinPrep, sammenlignet med cellerne i prøver præpareret på CytoSpin. Denne skrumpning af celler kan skyldes fiksativerne PreservCyt- og CytoLyt Solution, der anvendes ved præparering på ThinPrep, da disse indeholder methanol. Ved fiksering i methanol, kan der ske en dehydrering af cellerne, hvilket kan resultere i, at cellerne skrumper. Det faktum at cellerne skrumper, kan medføre at det bliver sværere at skelne de intracellulære elementer, hvilket kan have indvirkning på den diagnostiske kvalitet. Denne skrumpning af cellerne ses uanset om prøvematerialet er præpareret lige efter modtagelse, eller om det er blevet opbevaret i enten PreservCyt- eller CytoLyt Solution, i et ubestemt tidsrum, inden præparering.

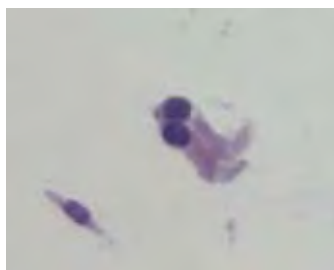
Diagnostisk kvalitet

10 BAL-væsker præpareret på ThinPrep fik en optimal score inden for diagnostisk kvalitet, hvor ingen BAL-væsker præpareret på CytoSpin opnåede en optimal score.

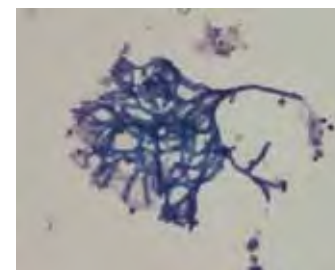
85% af BAL-væske præpareret på ThinPrep fik en acceptabel eller optimal score i diagnostisk kvalitet, hvor 95% af BAL-væske præpareret på CytoSpin fik en acceptabel score (se figur 3).



BILLEDE 4A OG 4B. Prøver præpareret på ThinPrep. Der ses tydelige velbevarede ciller, der er tegn på raske celler.



BILLEDE 5. Adenokarcinom i ThinPrep-præparat. Forstørrelse 40 x.



BILLEDE 6. Svamp i ThinPrep-præparat. Forstørrelse 20 x.

Den diagnostiske kvalitet gives ud fra den samlede scoring af det diagnostisk relevante cellebillede, samt farvescoren, hvilket giver et godt indblik i, hvor god den enkelte præpareringsmetode er for de forskellige prøvetyper.

I ét præparat fandtes adenokarcinom, hvor cellerne var tydeligt lejret i tumorbolde, både efter præparering på CytoSpin og ThinPrep (se billede 5). Hvormed det ud fra dette forsøg fremgår, at præparering på ThinPrep ikke påvirker cellerne i sammenhænge, hvor fx lejringen af cellerne er diagnostisk vigtigt. Derudover fandtes svamp og svampesporer i en BAL-væske præpareret på ThinPrep (se billede 6).

Præparering på ThinPrep virker umiddelbart til at være mere skånsom, end præparering på CytoSpin, på trods af, at cellerne under celleindsamling og celleoverførsel, suges op og sprøjtes over på objektglasset³.

MGG-farvning

BAL-væskerne præpareret på både Cytospin og ThinPrep fik 95 % af prøverne en acceptabel farvescore.

Det forventede resultat var, at begge præpareringsmetoder ville opnå en acceptabel farvescore for alle præparaterne, da de anvendte farvemetoder, var tilpasset efter præpareringsmetoderne. Som Wittekind⁵ antyder kan resultater for MGG-farvningen være svingende, og derfor kan farveresultatet for MGG-farvning variere.

Konklusion

Ud fra dette forsøg, kan det konkluderes, at præparering af både serøse væsker og cystevæsker på ThinPrep, ikke forbedrer den diagnostiske kvalitet, i forhold til præparering på CytoSpin.

Ved præparering af BAL-væsker, ses det derimod, at begge metoder resulterer i en god diagnostisk kvalitet. Men det er tydeligt, at cellerne er langt bedre bevaret ved præparering på ThinPrep, hvormed der ses en øgning af præparater med en optimal diagnostisk kvalitet. □

Ordliste & Referencer

Differentialtælling – tælling af leukocytter i blodudstrygningspræparat med bestemmelse af, hvor stor en procentdel hver enkelt type af leukocyt udgør.

Monolag – lejring af celler i ét lag.

Morfologi – cellestruktur.

- 1 Thomsen U. et al.: "*Basisbog I Eksfoliativ Cytologi*". Odontologisk Boghandel & Forlag. København, 2008.
- 2 Cytospin® *Cell Preparation System Operator Guide*. Shandon Scientific Limited.
- 3 ThinPrep® *2000 Operator's Manual*. © Cytyc Corporation, 1995.
- 4 Hallager K.: "*Histokemi og Histologisk Teknologi*". Bioanalytikeruddannelsen Århus, 2001.
- 5 Wittekind, D. H.: "*On the nature of Romanowsky-Giemsa staining and its significance for cytochemistry and histochemistry: an overall view*". *Histochemical Journal*, 15, 1029-1047, 1983.
- 6 Horobin R.W. et al.: "*Conn's Biological Stains*". Kapitel 21, Wittekind D.H.: "*Romanowsky-Giemsa Stains*". BIOS Scientific Publishers Ltd., 10th Edition, 2002.
- 7 Schulte E.: "*Air Drying as Preparatory Factor in Cytology: Investigation of its Influence on Dye Uptake and Dye Binding*". 1986.
- 8 Rana. S Hoda: "*Non-gynecologic Cytology on Liquid-Based Preparations: A Morfologic Review of Facts and Artifacts*", *Diagnostic Cytopathology*, Vol 35, No 10, 2007.
- 9 Michael, Claire W. et Al: "*Comparison of ThinPrep and Tri-Path PREP Liquid-Based Preparations in Nongynecologic Specimens: A Pilot Study*", *Diagnostic Cytopathology*, Vol 25, No 3, 2001.
- 10 Demay, Richard M.: "*The art and science of cytopathology*" American Society for Clinical Pathology Press, Vol. 2. 2007.
- 11 Rana, D.N. et Al: "*A comparative study: conventional preparation and ThinPrep® 2000 in respiratory cytology*", *Cytopathology*, 12, 2001.
- 12 Nasuti J.F., Tam D., Gupta P.K.: "*Diagnostic Value of Liquid-Based (ThinPrep®) Preparation in Nongynecologic Cases*", *Diagnostic Cytopathology*, Vol 24, No 2, 2000.
- 14 Leung, Chung Shan et Al: "*Comparison of ThinPrep and Conventional Preparations: Nongynecologic Cytology Evaluation*", *Diagnostic Cytopathology*, Vol 6, No 4, 1997.