



JÖNKÖPING UNIVERSITY

School of Health and Welfare

Jämförelse mellan konventionell utstryksmetod och vätskebaserad ThinPrepmetod vid preparering av etanolfixerade exsudat

HUVUDOMRÅDE: *Biomedicinsk laboratorievetenskap*

FÖRFATTARE: *Emma Andersson och Andréa Lindh*

HANDLEDARE: *Anna-Karin From, Ulla Antila Ljungquist och Renate Slind Olsen*

JÖNKÖPING 2018 Maj

Sammanfattning

Vid cytologisk bedömning av celler i exsudat kan olika metoder användas vid preparering. Vid konventionell utstryksmetod stryks provet ut manuellt på objektglas medan vätskebaserad ThinPrepmetod preparerar provet i en automatiserad process. Studiens syfte var att jämföra konventionell utstryksmetod och vätskebaserad ThinPrepmetod med tillsats av ättiksyra vid preparering av etanolfixerade exsudat. I studien användes totalt 34 prover av pleuravätska och ascites. Proverna preparerades med konventionell utstryksmetod och två varianter av ThinPrepmetod, ThinPrepmetod 1 och ThinPrepmetod 2. Preparaten bedömdes av två cytodiagnostiker utifrån fem kriterier; cellförekomst, förekomst av inflammatoriska celler, cellmorfologi, bakgrundsmaterial och förekomst av atypiska eller maligna celler. Resultaten visade på att ThinPrepmetod 2 gav likvärdiga, och i vissa avseenden bättre, resultat än konventionell utstryksmetod. ThinPrepmetoden har generellt fler fördelar jämfört med konventionell utstryksmetod, framförallt innebär den en tidsbesparing för de som bedömer preparaten vilket också gynnar patienter. En mer omfattande studie rekommenderas för att konfirmera resultaten i denna studie.

Nyckelord: Ascites; Cytologi; Pleuravätska; ThinPrep®; Ättiksyra

Summary

Comparison of conventional smears and liquid-based ThinPrep preparations of effusions fixated with ethanol

Preparation of effusions for cytological evaluation can be performed with different methods. Conventional smears are performed by spreading the sample directly onto a slide while liquid-based ThinPrep method prepares the sample in an automated process. The aim of this study was to compare conventional smears with liquid-based ThinPrep preparation, with additional acetic acid, of effusions fixated with ethanol. A total of 34 samples of pleural effusions and ascites were included. The samples were prepared with conventional smears and two versions of the ThinPrep method, ThinPrep method 1 and ThinPrep method 2. The preparations were examined by two cytotechnologists based on five criteria; occurrence of cells, occurrence of inflammatory cells, cell morphology, background material and the presence of atypical or malignant cells. The results showed that ThinPrep method 2 obtained equivalent and, in some aspects, even better results compared to conventional smears. In general, the ThinPrep method has several advantages compared to the conventional smears. In particular, it is timesaving when examining the slides, which also benefits the patients. A more comprehensive study is recommended to confirm the results of this study.

Keywords: Ascites; Cytology; Pleura effusion; ThinPrep®; Acetic acid

Innehållsförteckning

Inledning	1
Bakgrund	1
Exsudat	1
Prepareringsmetoder och färgning	2
Konventionella utstryk.....	3
ThinPrep®	3
Bedömning	4
Cytologilaboratoriet, Region Jönköpings län	5
Syfte	6
Material och metod	7
Provmaterial	7
Prepareringsmetoder	7
Konventionell utstryksmetod.....	7
ThinPrepmetod med tillsats av ättiksyra	7
ThinPrepmetod 1.....	8
ThinPrepmetod 2.....	8
Färgning och montering	8
Bedömning av preparat	9
Etiska överväganden	10
Resultat	12
Diskussion	16
Provmaterial	16
Val av utförande och bedömningskriterier	17
Konventionell utstryksmetod jämfört med ThinPrepmetod	18
För- och nackdelar med ThinPrep®	20
Rekommendationer till cytologilaboratoriet, Region Jönköpings län ...	21
Slutsatser	22
Omnämningen	23
Referenser	24

Inledning

Cytologi är en gren inom området patologi där cellers utseende studeras med hjälp av ljusmikroskop för att upptäcka sjukliga förändringar (1). Cytologisk provtagning är ett alternativ till ett mer komplicerat ingrepp som en operation. Provtagningen är enkel, kostnadseffektiv och innebär färre komplikationer än ett kirurgiskt ingrepp (2, 3). Provmaterial kan erhållas med olika typer av tekniker; aspirationscytologi och exfoliativ cytologi. Vid aspirationscytologi, som även kan kallas finnålspunktion, förs en nål in i vävnaden för att aspirera celler. Denna teknik används t.ex. vid misstänkt tumör i bröst eller tyreoida. Inom den exfoliativa cytologin undersöks celler som stöts bort naturligt eller skrapas av med hjälp av ett instrument (1). Undersökningen av celler från gynekologiska prover, blås- och buksköljväska samt från kroppsvätskor som pleuraväska, perikardvätska och ascites ingår i den exfoliativa cytologin (1, 4).

Bakgrund

I kroppen finns hålrum såsom lungsäck, hjärtsäck och bukhåla. Dessa hålrum är beklädda med två hinnor, den inre visceral och den yttre parietal (4). Hinnorna är försedda med ett lager skivepitelceller som kallas mesotelceller. Tillsammans med basalmembranet och omgivande bindväv utgör mesotelcellerna serosan. Normalt finns en liten mängd serös vätska mellan hinnorna som bildas genom filtration av plasma genom kapillärväggarna. Den serösa vätskan minskar friktion och underlättar organens rörelse (3).

Exsudat

Vid patologiska tillstånd kan obalans mellan produktion och reabsorption leda till att vätska ansamlas i kroppens hålrum. Vätskeansamlingen kan orsakas av en ökad permeabilitet i kapillären i serosan (5). Den vätskan kallas exsudat och är rik på proteiner. Beroende på var den bildas benämns den pleuraväska, perikardvätska eller ascites. Celler såsom mesotelceller, makrofager och lymfocyter finns representerade i nästan alla exsudatprover. Erytrocyter kan också förekomma antingen som en del av exsudatet eller som en kontamination vid provtagningen (1). Mesotelcellerna är de enda specifika cellerna hos de serösa hinnorna. Normalt är de runda till formen och har en stor, rund eller oval kärna. Kärnan har ofta en nukleol och i exsudat förekommer cellerna ofta i kluster men också som enstaka celler (5).

Maligniteter kan vara en orsak till att exsudat bildas. Primära tumörer i mesotelet kallas mesoteliom men många tumörceller som återfinns i exsudat är metastaser som har sitt ursprung i andra vävnader (3). Hos män har metastaser i pleuravätska vanligen sitt ursprung i lung- eller gastrointestinala tumörer medan de hos kvinnor oftast kommer från bröst- eller lungtumörer. Hos män kommer metastaser i bukhålan ofta från lymfom och gastrointestinal tumörer medan metastaserna hos kvinnor ofta har sitt ursprung i lymfom, ovariecancer, bröst- och gastrointestinal tumörer (1). Metastaser i perikardvätska är mindre vanligt och de har oftast sitt ursprung i lungtumörer eller bröstcancer (6). Förutom maligniteter kan exsudat också orsakas av infektioner, bindvävssjukdomar t.ex. systemisk lupus erythematosus samt inflammatoriska tillstånd t.ex. pleurit, perikardit och peritonit (1, 3). Vid dessa tillstånd kan mesotelcellerna bli reaktiva och de genomgår då en aktiv delning som svar på skada eller stimuli. De reaktiva mesotelcellerna liknar maligna celler och de kan vara svåra att skilja vid mikroskopisk bedömning (1). Immuncytokemi kan användas för att avgöra om cellerna är maligna eller reaktiva och kan även identifiera de maligna cellernas ursprung (3).

Prepareringsmetoder och färgning

För att kunna studera celler i exsudat krävs att provmaterial prepareras på objektglas och detta kan utföras med olika metoder. Vid vätskebaserad cytologi sätts provmaterialet till en fixeringslösning och prepareras i en automatiserad process. Vätskebaserad cytologi t.ex. ThinPrep® (Hologic Inc., Marlborough, Massachusetts, USA) har använts till icke-gynekologiska prover i mer än två decennier men konventionella, dvs. traditionella, metoder används fortfarande (7). Till de konventionella metoderna räknas bland annat cellutstryk där provmaterialet stryks ut direkt på ett objektglas. Oavsett prepareringsmetod måste preparaten färgas så att cellerna kan studeras och bedömas. En färgningsmetod inom cytologi är Papanicolaou som innefattar färgerna hematoxylin, orange G och eosin azure. Hematoxylin färgar in cellkärnan mörkt blå. Orange G färgar keratin i cytoplasman orange och eosin azure färgar in cytoplasman i olika nyanser av rosa eller grön beroende på förhållanden i cellen t.ex. pH (1). Med Papanicolaou färgas mesotelcellernas kärna mörkblå och cytoplasman grön (5).



Figur 1 Exsudat preparerade med konventionell utstryksmetod (till vänster) och ThinPrepmetod (till höger). På preparatet till vänster är områden med avvikande celler markerade med blå cirklar.

Konventionella utstryk

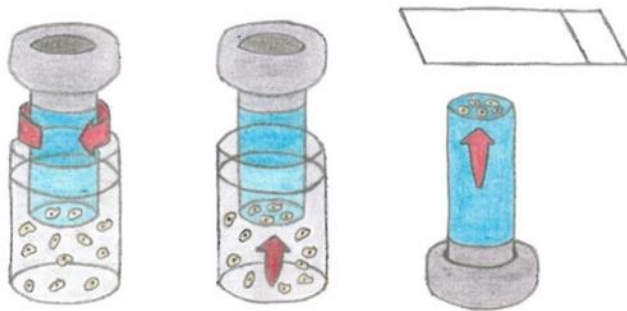
Exsudat innehåller ofta exfolierade celler och lämpar sig väl för konventionella utstryk. För att koncentrera cellerna centrifugeras provmaterialet och stryks därefter ut på objektglas. Preparatet fixeras och färgas för att sedan undersökas samt bedömas med hjälp av mikroskop (3), se figur 1. Konventionella utstryk är billiga och enkla att utföra. Däremot behövs teknisk färdighet för att utföra ett utstryk med hög kvalitet. Även om prepareringen är väl genomförd krävs att hela objektglaset studeras systematiskt, vilket är tidskrävande (8). Den konventionella utstryksmetoden kan ge upphov till ett tjockt utstryk och celler som överlappar varandra, dessa faktorer gör preparatet svårbedömt. Inflammatoriska celler och bakgrund, såsom blod och mucus, kan förekomma vilket kan dölja cellerna som ska granskas (7).

ThinPrep®

Den vätskebaserade cytologin utvecklades till en början för preparering av gynekologiska prover, men har därefter också applicerats på icke-gynekologiska prover. Metoden blev på så sätt ett alternativ till konventionella metoder (6). Inom den vätskebaserade cytologin finns flera metoder, en av dessa är ThinPrep® (Hologic Inc). Vid preparering av exsudat med ThinPrep® rekommenderar tillverkaren, Hologic Inc., att färska prover alternativt prover fixerade i CytoLyt® Solution (Hologic Inc.) används. CytoLyt® Solution (Hologic Inc.) är en metanolbaserad, buffrad konserveringslösning som har till uppgift att lysa erythrocyter, motverka proteinprecipitation, lösa upp mucus och bevara cellernas morfologi. Provet

koncentreras genom centrifugering och överförs till en behållare med PreserveCyt[®] Solution (Hologic Inc.) som är en metanolbaserad, buffrad lösning som bevarar cellerna under prepareringen (9).

ThinPrep-processen inleds med att ett ThinPrep-filter sänks ner i provbehållaren. Filtret roterar och skapar därmed en ström i vätskan som sönderdelar bakgrundsmaterial. Ett lätt vakuum i ThinPrep-filtret medför att cellerna sugs upp och fastnar på filtrets membran. Flödes hastigheten kontrolleras av instrumentet och när ett visst motstånd uppnås och hastigheten minskar överförs cellerna till ett objektglas. Cellerna förs över med hjälp av ett lätt övertryck och fördelas jämnt över ett cirkulärt och avgränsat område (9), se figur 1 och figur 2.



Figur 2 Principen för ThinPrep[®]-processen modifierad utifrån ThinPrep[®]5000 Processor Operator's Manual (9).

Att cellerna är belägna i ett mindre, avgränsat område sparar tid vid bedömningen jämfört med om hela glaset ska studeras. ThinPrep-filtret reducerar bakgrunden t.ex. avlägsnas erythrocyter och mucus. Dessutom erhålls ett tunt lager celler på objektglaset. Dessa faktorer medför att cellerna är lättare att studera och bedöma (7).

Bedömning

Oavsett prepareringsmetod bedöms exsudat utifrån cellkärnans morfologi och cytoplasmans utseende. Dessutom granskas förhållandet mellan kärnan och cytoplasman samt hur cellerna ligger i förhållande till varandra. Vid bedömning tas även hänsyn till bakgrund och inflammatoriska celler. Även makroskopisk bedömning av exsudaten t.ex. färg kan användas för att bekräfta de fynd som upptäckts vid mikroskopisk bedömning (1).

Cytologilaboratoriet, Region Jönköpings län

På cytologilaboratoriet, Laboratoriemedicin, Region Jönköpings län, används i nuläget den konventionella utstryksmetoden vid preparering av exsudat. Preparaten förgranskas av cytodiagnostiker och områden med celler som bedöms vara avvikande markeras (Figur 1). Ett preliminärt utlåtande lämnas till en cytopatolog som granskar cellerna inom det markerade området och gör en slutgiltig bedömning.

Cytologilaboratoriet önskar att byta prepareringsmetod av exsudat från konventionell utstryksmetod till vätskebaserad ThinPrepmetod. På laboratoriet finns all nödvändig utrustning eftersom ThinPrep® (Hologic Inc.) redan används som prepareringsmetod för gynekologiska cellprover och blåssköljvätskor (Ulla Antila Ljungquist, personlig kommunikation, 2018-03-08).

På cytologilaboratoriet används etanolfixerade exsudatprover. Hologic Inc. rekommenderar färska prover vid exsudatpreparering men cytologilaboratoriet önskar dock att även i fortsättningen använda sig av etanolfixerade prover. Orsaken är att färska prover skulle innebära förändringar i provhanteringen eftersom de innebär t.ex. en smittorisk för laboratoriepersonalen (Ulla Antila Ljungquist, personlig kommunikation, 2018-03-08).

Tidigare har ett liknande examensarbete utförts på cytologilaboratoriet i syfte att utveckla den vätskebaserade metoden vid preparering av etanolfixerade exsudat. Konventionell utstryksmetod jämfördes med vätskebaserad ThinPrepmetod. När etanolfixerade exsudat preparerades enligt anvisningar från Hologic Inc., som rekommenderar färska prover, erhöles ingen förbättring. För ett flertal av proverna preparerade med den vätskebaserade metoden uppkom dessutom en ring av provmaterial på objektglaset. Denna företeelse orsakades av att exsudaten var tjocka eller blodiga vilket försvårade bedömningen. Eftersom ingen förbättring erhöles samt att ringar förekom testades vätskebaserad ThinPrepmetod med tillsats av ättiksyra. Ättiksyran hade till uppgift att lysa erythrocyter och reducera mucus. Metoden gav tillfredsställande resultat som var bättre än de prov som hade preparerats med konventionell utstryksmetod. Eftersom få prover preparerades med tillsats av ättiksyra rekommenderades en mer omfattande studie för att bekräfta resultatet (10).

Syfte

Syftet med studien var att jämföra konventionell utstryksmetod och vätskebaserad ThinPrepmetod med tillsats av ättiksyra vid preparering av etanolfixerade exsudat.

Material och metod

Provmaterial

Studien genomfördes på cytologilaboratoriet, Laboratoriemedicin, Region Jönköpings län. Patientprover av exsudaten pleuravätska och ascites användes. Proverna fixerades direkt efter provtagningen med lika mycket 70 % etanol som exsudat och några droppar heparin tillsattes. På laboratoriet förvarades exsudatproverna i +4 °C. Totalt ingick 34 prover i studien varav 25 pleuravätskor och 9 ascites vilket motsvarade samtliga prover som inkommit till laboratoriet under elva veckor.

Prepareringsmetoder

Varje prov preparerades enligt två metodprinciper, konventionell utstryksmetod samt vätskebaserad ThinPrepmetod med tillsats av ättiksyra. För ThinPrepmetoden utfördes två varianter. Det som skiljde dem åt var olika proportioner av prov, CytoLyt[®] Solution (Hologic Inc.) och ättiksyra. För respektive metod preparerades ett glas. Erhållna preparat färgades med Papanicolaou och bedömdes av två cytodiagnostiker.

Konventionell utstryksmetod

De konventionella utstryken utfördes enligt instruktioner för exsudatpreparering från cytologilaboratoriet, Laboratoriemedicin, Region Jönköpings län (11). Provet blandades väl, 10 ml överfördes till ett 15 ml konat centrifugrör och centrifugerades i 10 min vid 620 g (Rotanta 460, Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Tyskland). Därefter dekanterades supernatanten genom att provröret vändes upp och ned. Pelleten resuspenderades med vortex och en droppe av provmaterialet sattes nära mitten av ett objektglas (TOMO, IHC adhesive Glace Slide, Osaka, Japan). På droppen lades ett täckglas så att materialet flöt ut. Utstryket gjordes genom att täckglaset drogs parallellt med objektglaset med jämn hastighet. Preparatet fixerades i 95 % etanol i minst 1 tim och lufttorkades innan det färgades med Papanicolaou.

ThinPrepmetod med tillsats av ättiksyra

Preparering med ThinPrepmetoden utgick från tillverkarens (Hologic Inc.) instruktioner för preparering av serösa exsudat (9). Metoden modifierades genom tillsats av ättiksyra, 5 ml i ThinPrepmetod 1 (TP 1) och 10 ml i ThinPrepmetod 2 (TP 2). Dessutom användes etanolfixerade prover vilket tillverkaren (Hologic Inc.) avråder från.

ThinPrepmetod 1

Provet blandades väl, 10 ml fördes över till ett 15 ml konat centrifugrör. Materialet centrifugerades i 10 min vid 620 g. Supernatanten dekanterades och pelleten resuspenderades med hjälp av vortex. Till provet sattes 5 ml CytoLyt[®] Solution (Hologic Inc.) och lösningen blandades. Sedan tillsattes 5 ml 10 % ättiksyra (VWR international, Paris, Frankrike) och provet blandades väl med vortex. Provet centrifugerades i 10 min vid 620 g. Därefter dekanterades supernatanten. Pelleten resuspenderades med hjälp av vortex och cellpelletens storlek utvärderades. Om pelleten var klart synlig och volymen var mindre än 1 ml överfördes 4 droppar till en ThinPrepbehållare innehållande PreserveCyt[®] Solution (Hologic Inc.). Var pelleten knappt synlig eller inte syntes alls sattes 1 ml PreserveCyt[®] Solution (Hologic Inc.) till pelleten. Därefter blandades lösningen med hjälp av vortex och hela mängden överfördes till en ThinPrepbehållare innehållande PreserveCyt[®] Solution (Hologic Inc.). Om pelletens volym översteg 1 ml sattes 1 ml CytoLyt[®] Solution (Hologic Inc.) till pelleten. Efter blandning överfördes 2 droppar av lösningen till en ThinPrepbehållare innehållande PreserveCyt[®] Solution (Hologic Inc.).

Oavsett pelletens volym blandades lösningen i ThinPrepbehållaren väl efter att provet hade tillsatts och fick stå i 15 min. Därefter preparerades provet med ThinPrep[®] 5000 Processor (Hologic Inc.) med icke-gynekologisk sekvens. De filter som användes var ThinPrep[®] Non Gynecological Filters (Hologic Inc.) och objektglasen var av typen ThinPrep[®] Imaging System Microscope Slides (Hologic Inc.). Preparatet fick stå i fixeringsbad med 95 % etanol i 15 min och lufttorkades innan de färgades med Papanicolaou.

ThinPrepmetod 2

I TP 2 användes samma provmängd, dvs. 10 ml, som i TP 1. Samma tillvägagångssätt följdes förutom att 10 ml CytoLyt[®] Solution (Hologic Inc.) och 10 ml 10 % ättiksyra (VWR international) sattes till provet. Ett 50 ml konat centrifugrör användes.

Färgning och montering

Preparaten färgades med Papanicolaou (Hologic Inc.) enligt rutinen för färgning av exsudat vid cytologilaboratoriet, Laboratoriemedicin, Region Jönköpings län (12). Färgning och montering utfördes av laboratoriets personal. Färgningen gjordes med instrumentet Leica Autostainer XL (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Tyskland) och monteringen med Leica CV5030 Coverslipper (Leica Biosystems).

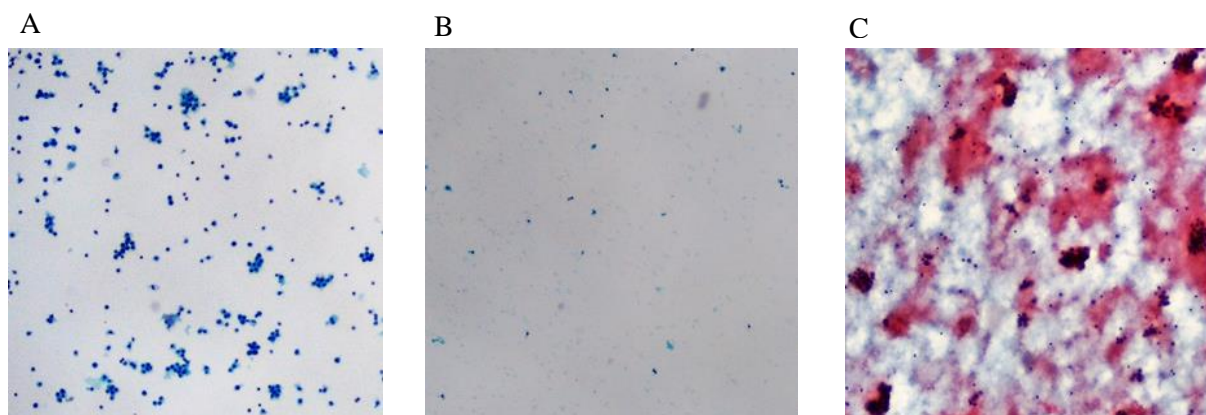
Bedömning av preparat

Preparaten bedömdes av två cytodiagnostiker oberoende av varandra med hjälp av ljusmikroskop med 10x och 40x objektiv. För varje prov jämfördes de olika prepareringsmetoderna utifrån fem bedömningskriterier. Kriterierna och scorevärdenas innebörd togs fram tillsammans med cytodiagnostikerna. Det första kriteriet avsåg förekomst av celler t.ex. mesotelceller. Detta kriterium innefattade inte inflammatoriska celler. Det andra kriteriet innefattade förekomst av inflammatoriska celler t.ex. granulocyter och makrofager. Det tredje kriteriet avsåg hur väl cellmorfologin, dvs. kärnans detaljer och cytoplasmas utseende, bevarats efter preparering. I första hand bedömdes bevarandet av cellmorfologin hos mesotelceller, atypiska eller maligna celler men i de fall de saknades studerades inflammatoriska celler. Mängden bakgrundsmaterial som t.ex. erythrocyter och proteiner ingick i det fjärde kriteriet. Det femte kriteriet innefattade förekomst av atypiska eller maligna celler och bedömdes med ”ja” eller ”nej”. Till de övriga kriterierna gavs ett scorevärde mellan noll och tre. Innebörden av samtliga kriterier redovisas i tabell 1 och några exempel på bedömningar gällande cellförekomst (exklusive inflammatoriska celler) och bakgrundsmaterial visas i figur 3.

Tabell 1 Bedömningskriterier för exsudatpreparat samt innebörden av respektive scorevärde.

Cellförekomst*	Förekomst av inflammatoriska celler	Cellmorfologi	Bakgrundsmaterial	Förekomst av atypiska/maligna celler
0: Ingen/enstaka	0: Ingen/enstaka	0: Obedömlig	0: Inget	Ja
1: Sparsam	1: Sparsam	1: Ej tillfredsställande	1: Sparsamt	Nej
2: Måttlig	2: Måttlig	2: God	2: Måttligt	
3: Riklig	3: Riklig	3: Optimal	3: Rikligt	

*exklusive inflammatoriska celler



Figur 3 Exempel på studiens bedömningskriterier. Fotografierna visar preparat med 10x objektiv. Pleuravätska preparerad med TP 2. "Riklig" cellförekomst exklusive inflammatoriska celler och "sparsamt" bakgrundsmaterial (A). Pleuravätska preparerad med TP 1. "Ingen/enstaka" cellförekomst exklusive inflammatoriska celler och "sparsamt" bakgrundsmaterial (B). Ascites preparerad med konventionell utstryksmetod. "Måttlig" cellförekomst exklusive inflammatoriska celler och "rikligt" bakgrundsmaterial (C).

För varje prov och kriterium beräknades medelvärdet av scorevärdena från de två cytodiagnostikerna. Därefter bestämdes medianen av medelvärdena inom varje kriterium. För kriteriet förekomst av atypiska eller maligna celler jämfördes prepareringsmetoderna för varje prov.

Etiska överväganden

Forskning måste alltid prövas av en regional etikprövningsnämnd (EPN). Examensarbete är en typ av studie som vanligen inte ingår i forskning och måste hanteras på ett särskilt sätt. Enligt Hälsohögskolan, Jönköping University, skall en etisk egengranskning utföras i början av studien. Inga etiska problem kunde identifieras vid genomgången etisk egengranskning. Ett etiskt godkännande från EPN krävdes inte för denna studie eftersom det inte är en forskningsstudie utan en del av en metodutveckling vid cytologilaboratoriet, Laboratoriemedicin, Region Jönköpings län.

I studien användes patientprover som var aidentifierade och de kunde därmed inte spåras till patienterna. Proverna hade sedan tidigare preparerats med konventionell utstryksmetod, bedömts och provsvaren hade lämnats ut. Patienterna påverkades således inte av studien. Materialet som inte behövdes för vård, diagnostik och behandling och som ingick i studien skulle kasserats och omfattas därmed inte av biobankslagen (2002:297). Lagen reglerar hur

prover inom hälso- och sjukvården får sparas och användas och har till uppgift att skydda patienters integritet vid insamling, förvaring och nyttjande av patientprover (13).

Eftersom preparering med ThinPrep[®] (Hologic Inc.) innebär en tidsbesparing vid bedömning, jämfört med konventionell utstryksmetod, kan ett provsvar erhållas från laboratoriet fortare. Om ThinPrepmetoden införs i rutinverksamheten kan denna studie gynna framtida patienter eftersom ett snabbt provsvar kan få betydelse för prognos och behandling.

Resultat

I studien bedömdes totalt 34 exsudatprover utifrån bedömningskriterierna cellförekomst (exklusive inflammatoriska celler), förekomst av inflammatoriska celler, cellmorfologi, bakgrundsmaterial och förekomst av atypiska eller maligna celler, av två cytodiagnostiker. För de fyra första kriterierna skiljde sig scorevärdena som mest ett steg mellan cytodiagnostikernas bedömning (Tabell 1) för respektive prov.

I tabell 2 redovisas antalet exsudatpreparat som fått respektive medelscorevärde för kriteriet cellförekomst (exklusive inflammatoriska celler). Resultaten presenteras för varje prepareringsmetod. Den konventionella utstryksmetoden och TP 1 erhöll medianvärdet 1, vilket innebär en ”sparsam” cellförekomst. TP 2 fick medianvärdet 1,5 som motsvarar en ”sparsam till måttlig” cellförekomst (Figur 4).

Tabell 2 För kriteriet cellförekomst (exklusive inflammatoriska celler) redovisas antalet exsudatprov (n=34) som fått respektive medelscorevärde för varje prepareringsmetod.

Scorevärde*	Konventionell utstryksmetod	ThinPrepmetod 1	ThinPrepmetod 2
0	4	5	3
0,5	3	2	1
1	14	13	10
1,5	6	3	6
2	4	7	4
2,5	2	3	4
3	1	1	6

* Medelvärde av de två cytodiagnostikernas bedömningar

För kriteriet förekomst av inflammatoriska celler redovisas antalet exsudatpreparat som fått respektive medelscorevärde för varje prepareringsmetod i tabell 3. Kriteriet gav den konventionella utstryksmetoden medianvärdet 1,5 som motsvarar ”sparsam till måttlig” förekomst. TP 1 och TP 2 fick medianvärdet 1 vilket innebär en ”sparsam” förekomst (Figur 4).

Tabell 3 För kriteriet förekomst av inflammatoriska celler redovisas antalet exsudatprov (n=34) som fått respektive medelscorevärde för varje prepareringsmetod.

Scorevärde*	Konventionell utstryksmetod	ThinPrepmetod 1	ThinPrepmetod 2
0	–	–	–
0,5	–	2	–
1	13	22	18
1,5	9	5	7
2	12	5	8
2,5	–	–	1
3	–	–	–

*Medelvärde av de två cytodiagnostikernas bedömningar

Antalet exsudatpreparat som erhöll respektive medelscorevärde, för bedömningskriteriet cellmorfologi, för varje prepareringsmetod redovisas i tabell 4. För kriteriet fick den konventionella utstryksmetoden medianvärdet 2,5 vilket motsvarar en ”god till optimal” morfologi. TP 1 fick medianvärdet 2 som innebär en ”god” morfologi. Medianvärdet för TP 2 blev 2,5 vilket motsvarar en ”god till optimal” morfologi (Figur 4).

Tabell 4 För kriteriet cellmorfologi redovisas antalet exsudatprov (n=34) som fått respektive medelscorevärde för varje prepareringsmetod.

Scorevärde*	Konventionell utstryksmetod	ThinPrepmetod 1	ThinPrepmetod 2
0	–	–	–
0,5	–	2	–
1	2	3	–
1,5	2	6	3
2	7	21	7
2,5	9	2	12
3	14	–	12

* Medelvärde av de två cytodiagnostikernas bedömningar

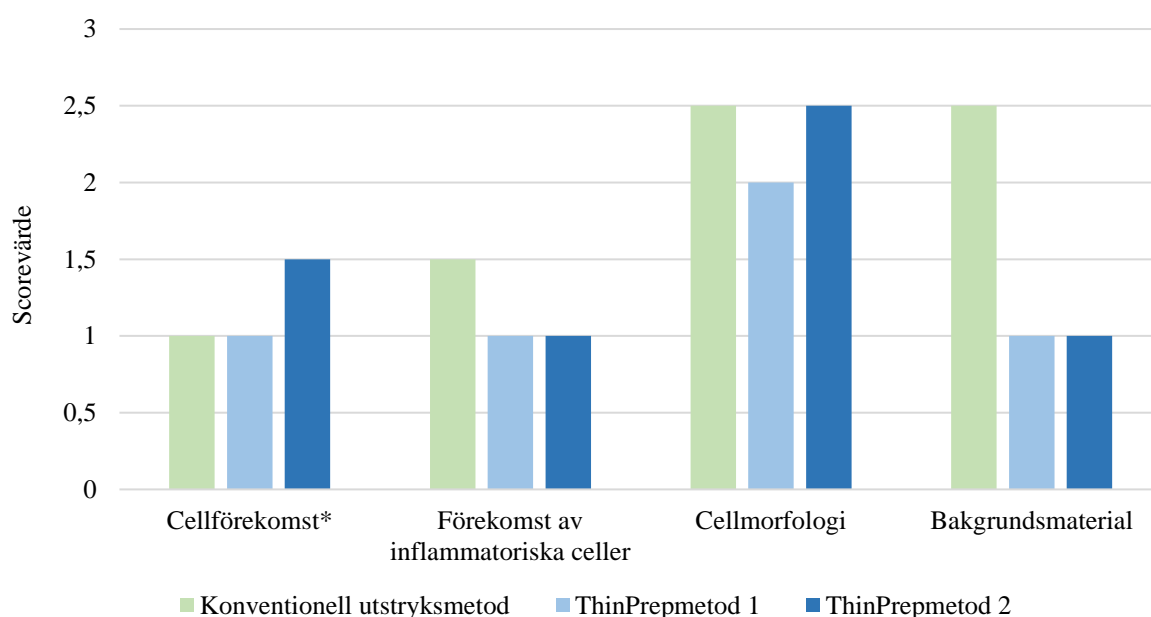
I tabell 5 redovisas antalet exsudatpreparat som fått respektive medelscorevärde för kriteriet bakgrundsmaterial. Kriteriet gav den konventionella utstryksmetoden ett medianvärde på 2,5

som motsvarar ”måttligt till rikligt” bakgrundsmaterial. TP 1 samt TP 2 fick medianvärdet 1 vilket innebär ”sparsamt” bakgrundsmaterial (Figur 4).

Tabell 5 För kriteriet bakgrundsmaterial redovisas antalet exsudatprov (n=34) som fått respektive medelscorevärde för varje prepareringsmetod.

Scorevärde*	Konventionell utstryksmetod	ThinPrepmetod 1	ThinPrepmetod 2
0	–	4	5
0,5	–	4	7
1	–	15	10
1,5	1	4	4
2	14	7	8
2,5	12	–	–
3	7	–	–

* Medelvärde av de två cytodiagnostikernas bedömningar



Figur 4 Metodernas medianvärde för kriterierna cellförekomst *(exklusive inflammatoriska celler), förekomst av inflammatoriska celler, cellmorfologi och bakgrundsmaterial.

För 28 av exsudatproverna var bedömningen av kriteriet förekomst av atypiska eller maligna celler densamma för samtliga metoder, i 10 prover bedömdes celler vara atypiska eller

maligna medan i 18 av proverna bedömdes inga celler vara avvikande. För ett av proverna (nummer 22) såg cytodiagnostikerna atypiska/maligna celler i preparatet med TP 2 men inte med konventionell utstryksmetod eller TP 1. För resterande fem prover gjorde cytodiagnostikerna olika bedömningar och skillnaderna redovisas i tabell 6.

Tabell 6 Skillnader i bedömningen mellan cytodiagnostikerna för kriteriet förekomst av atypiska eller maligna celler.

Provnummer	Konventionell utstryksmetod		ThinPrepmetod 1		ThinPrepmetod 2	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2
13	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Ja
23	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja	Ja
29	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja	Ja
30	Nej	Ja	Nej	Nej	Ja	Ja
32	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja	Nej

C1, cytodiagnostiker 1; C2, cytodiagnostiker 2

Diskussion

Syftet med studien var att jämföra konventionell utstryksmetod och vätskebaserad ThinPrepmetod med tillsats av ättiksyra vid preparering av etanolfixerade exsudat. Genom att preparera exsudatproverna med den konventionella utstryksmetoden samt med två varianter av ThinPrepmetoden, för att sedan bedöma dessa utifrån fem bedömningskriterier, och beräkna medianen för kriteriernas medelscorevärden kunde metoderna jämföras. Eftersom cytologilaboratoriet, Laboratoriemedicin, Region Jönköpings län, önskar att byta prepareringsmetod för exsudatprover var förhoppningen att ThinPrepmetoden skulle ge preparat med likvärdig eller bättre kvalitet än konventionell utstryksmetod.

Provmaterial

I studien användes provmaterialen pleuravätska och ascites. Målet var att 50 prover, inklusive eventuella bortfall, skulle ingå i studien. Ett stort provmaterial är att föredra då det ökar studiens tillförlitlighet. Cytodiagnostikerna hade en begränsad tid för bedömning av preparaten i studien eftersom de också hade rutinprover att granska. Detta tillsammans med studiens omfattning begränsade antalet prover. För att kunna dra en slutsats som inkluderar båda provmaterialen, pleuravätska och ascites, krävs också en tillräcklig stor mängd av respektive material. Av den anledningen uteslöts perikardvätska från studien. Perikardvätska är mindre vanlig än de övriga exsudaten och ett tillräckligt stort antal ansågs inte kunna samlas in under projektiden (Anna-Karin From, personlig kommunikation, 2018-03-08). Trots att insamlingen av exsudatprover påbörjades sju veckor innan studien startade erhöles endast 34 prover, 25 pleuravätskor och 9 ascites. Eftersom rutinprover användes kunde inte antalet eller fördelningen förutses eller påverkas.

Etanolfixerade prover användes i studien trots att Hologic Inc. rekommenderar färska exsudatprover vid preparering med ThinPrep®. Cytologilaboratoriet vill även i fortsättningen använda etanolfixerade prover och därför frångicks rekommendationen. För t.ex. färsk pleuravätska finns en risk för *Mycobacterium tuberculosis* som är en luftburen smitta tillhörande riskklass 3. Färsk prover innebär förändringar i hanteringen och ställer högre krav på t.ex. skyddsutrustning (14). Ett annat argument mot att använda färsk prover som framförts från cytologilaboratoriet är att hållbarheten hos exsudat minskar om de inte fixeras. Enligt Kvalitets- och standardiseringskommittén (KVASt) bör ofixerad pleuravätska omhändertas relativt snart efter ankomst till laboratoriet (15). Emellertid används färsk

exsudatprover t.ex. vid Klinisk patologi och cytologi, Region Östergötland. Där kan vid undantagsfall proverna förvaras i +4 °C och prepareras upp till en vecka efter ankomst till laboratoriet (Lucin Jacob, personlig kommunikation, 2018-04-18).

Val av utförande och bedömningskriterier

Konventionell utstryksmetod, som också används i rutinen på cytologilaboratoriet, Laboratoriemedicin, Region Jönköpings län, utfördes och fungerade därmed som referensmetod i studien. I rutinverksamheten utförs två preparat per prov med konventionell utstryksmetod för att tillräckligt många celler ska kunna studeras. Eftersom granskning av preparaten är tidskrävande och cytodiagnostikernas tid var begränsad gjordes endast ett utstryk per prov i studien. För den vätskebaserade ThinPrepmetoden utfördes två varianter, TP 1 och TP 2. I det tidigare examensarbetet användes en vätskebaserad ThinPrepmetod med tillsats av ättiksyra (10). I TP 1 användes en mindre mängd CytoLyt® Solution (Hologic Inc.) och ättiksyra än i det tidigare arbetet. Anledningen till att TP 1 testades var att minimera användandet av kemikalier vilket är en fördel utifrån ekonomiska såväl som miljömässiga skäl. När 20 prover hade preparerats med TP 1 tyckte cytodiagnostikerna, efter mikroskopering av preparaten, att det fanns en tendens till att metoden inte uppfyllde förväntningarna. Preparaten såg inte ut att bevara cellmorfologin tillräckligt bra och alltså verkade TP 1 inte vara likvärdig eller bättre än konventionell utstryksmetod. Därför infördes TP 2 som hade samma mängd av prov, CytoLyt® Solution (Hologic Inc.) och ättiksyra som ThinPrepmetoden i det tidigare examensarbetet (10).

Bedömningskriterierna, som jämförelsen av metoderna grundades på, samt de optimala scorevärdena diskuterades fram tillsammans med cytodiagnostikerna. Kriterierna är faktorer som är viktiga vid bedömning av exsudat (Ulla Antila Ljungquist, personlig kommunikation, 2018-04-04). Bedömningarna gjordes inte genom kvantifiering av t.ex. celler vid kriteriet cellförekomst utan var uppskattningar. Cytodiagnostikernas bedömningar skiljde sig ibland åt och därför kunde medelscorevärdet hamna mellan två bedömningskriterier. I det tidigare examensarbetet eliminerades nästan förekomst av ring helt med ThinPrepmetod med tillsats av ättiksyra (10). Därför exkluderades detta kriterium i denna studie.

Konventionell utstryksmetod jämfört med ThinPrepmetod

För att hitta atypiska eller maligna celler i ett preparat behövs en tillräcklig mängd celler. Om cellmängden är för stor kan celler däremot överlappa och skymma varandra vilket kan försvåra bedömningen. Optimalt för kriteriet cellförekomst (exklusive inflammatoriska celler) är ”måttlig”. För kriteriet fick TP 2 ”sparsam till måttlig” vilket var bättre än konventionell utstryksmetod och TP 1 som båda fick ”sparsam”.

Förekomst av inflammatoriska celler kan ge vägledning vid diagnos men bör förekomma i en mindre mängd för att inte störa bedömningen av andra typer av celler. För kriteriet är ”sparsam” optimalt. TP 1 och TP 2 fick det optimala värdet ”sparsam” medan konventionell utstryksmetod erhöll ”sparsam till måttlig”. Tidigare forskning bekräftar att inflammatoriska celler reduceras med ThinPrep® (Hologic Inc.) (16).

För att detaljer i cellerna ska kunna ses eftersträvas en mycket god bibehållen morfologi vilket motsvarar ”optimal”. Konventionell utstryksmetod och TP 2 fick ”god till optimal” vilket var bättre än TP 1 som fick ”god”.

Bakgrundsmaterial som erythrocyter och proteiner kan dölja celler och försvåra bedömningen. Därför eftersträvas ”inget” för detta kriterium. Den konventionella utstryksmetoden fick ”måttligt till rikligt” medan TP 1 och TP 2 erhöll ”sparsamt”. De båda ThinPrepmetoderna reducerade alltså bakgrundsmaterialet vilket är önskvärt. Att ThinPrep® (Hologic Inc.) minskar bakgrundsmaterial har även visats i tidigare studier (7, 17).

I jämförelse med konventionell utstryksmetod hade TP 1 likvärdig cellförekomst (exklusive inflammatoriska celler), visade sämre bibehållen cellmorfologi samt reducerade inflammatoriska celler och bakgrundsmaterial. I likhet med det examensarbete som tidigare utförts på cytologilaboratoriet visade resultaten på att TP 2 gav en reducerad bakgrund jämfört med konventionell utstryksmetod (10). I denna studie tyder resultatet dessutom på att en högre förekomst av celler (exklusive inflammatoriska celler), mindre förekomst av inflammatoriska celler samt likvärdig cellmorfologi erhöles med TP 2. TP 1 var inte bättre än TP 2 i något avseende och därför föredras TP 2. En möjlig anledning till att TP 1 inte gav tillfredställande preparat är att en för liten mängd CytoLyt® Solution (Hologic Inc.) och ättiksyra användes i förhållande till mängden prov. Vid prepareringen noterades dessutom att det var svårare att resuspendera pelleten i TP 1 eftersom ett mindre rör användes jämfört med

TP 2. Detta är en nackdel eftersom en välblandad lösning eftersträvas. En fördel är dock att de mindre rören innebär en lägre kostnad.

Om atypiska eller maligna celler finns i ett prov ska de oavsett prepareringsmetod kunna påvisas (2). För att kunna säkerställa att avvikande celler kan hittas med den nya metoden inkluderades bedömningskriteriet förekomst av atypiska eller maligna celler i denna studie. Om den konventionella utstryksmetoden påvisar avvikande celler måste de också kunna ses i preparat som gjorts med ThinPrepmetoden för att metoden ska kunna användas. För TP 1 fanns två prover (nummer 23 och 29) där cellerna inte bedömdes vara atypiska eller maligna enligt en av cytodiagnostikerna. Däremot upptäcktes atypiska eller maligna celler med den konventionella utstryksmetoden och TP 2 för samma prover. För ett prov (nummer 30), som var preparerat med konventionell utstryksmetod, bedömdes celler som atypiska eller maligna av en cytodiagnostiker. Med TP 2 bedömdes celler som atypiska eller maligna av båda cytodiagnostikerna men inte av någon med TP 1. Resultaten för proverna 23, 29 och 30 tyder på att TP 1 inte är tillförlitlig eftersom avvikande celler som hittades med konventionell utstryksmetod inte hittades med TP 1. För två av proverna (nummer 13 och 22) hittades atypiska eller maligna celler av minst en cytodiagnostiker i TP 2 men inte med de andra prepareringsmetoderna. Detta kan bero på att TP 2 gav cellrikare preparat, än konventionell utstryksmetod och ThinPrepmetod 1, vilket ökar chansen att påträffa avvikande celler. En annan möjlig förklaring till att atypiska eller maligna celler inte kunde hittas med konventionell utstryksmetod är att endast ett glas preparerades medan det i rutinen alltid görs två. Det förekommer att två glas från samma prov kan skilja sig mycket t.ex. att den ena har medan det andra helt saknar avvikande celler (Ulla Antila Ljungquist, personlig kommunikation, 2018-05-15).

För ett av proverna (nummer 32) skiljde sig bedömningen mellan cytodiagnostikerna för samtliga prepareringsmetoder. Den ena cytodiagnostikern bedömde celler som atypiska eller maligna med samtliga prepareringsmetoder medan den andra inte gjorde det. Detta har dock en mindre betydelse för studien eftersom den jämför metoderna och inte cytodiagnostikernas bedömning. Provet var svårbedömt och hade en sparsam cellmängd vilket kan vara en förklaring till varför bedömningarna inte överensstämde. I rutinen händer det också att cytodiagnostikerna inte bedömer på samma sätt och att detta belyser svårigheten att granska cytologiprover. En cytopatolog gör alltid den avgörande bedömningen och har då också immuncytokemi som hjälpmedel. Resultaten visade att TP 2 kunde påvisa atypiska eller

maligna celler i samtliga preparat där de även hittades med konventionell utstryksmetod. I två fall (nummer 13 och 22) har TP 2 dessutom visat atypiska eller maligna celler trots att de inte kunde ses med konventionell utstryksmetod. Denna studie visar på att TP 2 var likvärdig eller bättre för samtliga prover gällande kriteriet förekomst av atypiska eller maligna celler jämfört med konventionell utstryksmetod och TP 1.

För- och nackdelar med ThinPrep®

Litteraturen beskriver många fördelar med ThinPrep® (Hologic Inc.) jämfört med konventionell utstryksmetod. Vid granskningen av preparaten sparas tid eftersom ett tunt lager celler på en mindre yta bedöms. På cytologilaboratoriet, Laboratoriemedicin, Region Jönköpings län, bereds och granskas dessutom två preparat med konventionell utstryksmetod för varje exsudatprov i rutinverksamheten. Yrkesgrupper som cytodiagnostiker och cytopatologer har en hög arbetsbelastning och därför blir tidsbesparingen viktig. Jämförelser visar att trots att ThinPrep® (Hologic Inc.) innebär en högre kostnad jämfört med konventionella utstryk är den kostnadseffektiv eftersom preparaten håller en högre kvalitet och är mindre tidskrävande vid bedömningen (6, 7).

När konventionella utstryk utförs krävs en viss teknisk färdighet. Lagom mycket material ska placeras på glaset och utstryket måste göras med en jämn hastighet. Preparatet kan annars bli för tjockt eller ojämnt. Vid ThinPrep® (Hologic Inc.) är preparatens kvalitet inte beroende av en manuell utstryksteknik eftersom processen är automatisk (8). Fördelen med en automatiserad process är att prover behandlas enhetligt och risken för mänskliga misstag minskar. Däremot kan problem med den automatiska processen uppkomma. När t.ex. prover med mycket proteiner prepareras med ThinPrep® 5000 Processor (Hologic Inc.) uppstår ett motstånd snabbare och filtret tyngs ned. Detta ger en ring av provmaterial på objektglaset och ett stort område som saknar celler i mitten av ringen. När detta uppkommer har inte allt material på filtret överförts till objektglaset och det finns en risk för att celler som är relevanta för diagnostiken inte kommer med på glaset (Bodil Isén, personlig kommunikation, 2018-05-18). På ett flertal av preparaten i denna studie noterade cytodiagnostikerna förekomst av ring. Detta var oväntat eftersom förekomst av ring nästan uteslutits med ThinPrepmetod med tillsats av ättiksyra i det tidigare examensarbetet (10).

ThinPrep® (Hologic Inc.) har inte bara fördelar utan också nackdelar. I metoden ingår kemikalierna CytoLyt® Solution (Hologic Inc.) och PreserveCyt® Solution (Hologic Inc.) som

är metanolbaserade. Dessa är giftiga och ångorna är skadliga (9). Ur ett arbetsmiljöperspektiv är därför den konventionella utstryksmetoden bättre eftersom den inkluderar färre kemikalier. Under studien noterades att preparering med ThinPrepmetod tar längre tid jämfört med konventionell utstryksmetod. Detta bekräftar av en tidigare studie som belyser den ökade prepareringstiden men även tidsbesparingen för den mer kvalificerade personalen som bedömer proverna (17). ThinPrep® (Hologic Inc.) ger även förändringar i cellernas morfologi t.ex. minskar cellernas storlek vilket granskaren behöver vara medveten om (18). På cytologilaboratoriet, Laboratoriemedicin, Region Jönköpings län, anses detta inte vara ett problem då granskarna är vana att bedöma gynekologiska cellprover och blåskölvätskor preparerade med ThinPrep® (Hologic Inc.).

Rekommendationer till cytologilaboratoriet, Region Jönköpings län

Inom hälso- och sjukvården är alltid patientens bästa i fokus. Det är för deras skull prover tas, bearbetas och bedöms. Ett snabbt provsvar är ofta viktigt eftersom det t.ex. kan påverka prognos och behandling. Det är av största vikt att metoden för t.ex. preparering av exsudat är av god kvalitet för att rätt diagnos ska kunna ställas. Denna studie visade på att TP 1 i vissa avseenden gav sämre preparat än konventionell utstryksmetod. Dessutom tydde studien på att ThinPrepmetod med lika delar prov, CytoLyt® Solution (Hologic Inc.) och ättiksyra (TP 2) gav likvärdiga, och i vissa avseenden bättre, resultat än konventionell utstryksmetod. Därför är TP 2 att föredra men eftersom studien har begränsningar rekommenderas vidare studier där ett större provmaterial används. Dessutom bör studien inkludera alla typer av exsudat; pleuravätska, perikardvätska och ascites. Även förekomst av ring bör inkluderas som ett bedömningskriterium eftersom denna förekomst noterades i studien. Vidare rekommenderas att, i likhet med denna studie, två cytodiagnostiker granskar preparaten eftersom det är en styrka att fler bedömer. Det är dessutom viktigt att en cytopatolog inkluderas vid bedömningen eftersom dennes godkännande krävs för att byta metod. Om den mer omfattande studien kan bekräfta att ThinPrepmetoden ger exsudatpreparat med likvärdig eller bättre kvalitet än konventionell utstryksmetod rekommenderas att ThinPrepmetoden införs i rutinverksamheten på cytologilaboratoriet, Laboratoriemedicin, Region Jönköpings län.

Slutsatser

I denna studie, där konventionell utstryksmetod jämfördes med vätskebaserad ThinPrepmetod med tillsats av ättiksyra vid preparering av etanolfixerade exsudat, tydde resultaten på att TP 2 med lika delar prov, CytoLyt[®] Solution (Hologic Inc.) och ättiksyra reducerade bakgrundsmaterial. Dessutom visade TP 2 på en högre förekomst av celler samt mindre förekomst av inflammatoriska celler. Med TP 2 och den konventionella utstryksmetoden erhöles en likvärdig cellmorfologi. Med TP 2 hittades atypiska eller maligna celler i samtliga prov där de kunde upptäckas med konventionell utstryksmetod. För att konfirmera resultaten från denna studie rekommenderas en mer omfattande studie.

Omnämmanden

Vi riktar ett stort tack till vår vetenskapliga handledare Renate Slind Olsen som har väglett och stöttat oss genom hela projektet. Vi är också mycket tacksamma för den kunskap och expertis som våra metodhandledare Ulla Antila Ljungquist, Anna-Karin From samt cytodiagnostikern Bodil Isén delgivit oss. Ni har alla visat ett stort engagemang och vi uppskattar alla givande och utvecklande diskussioner som vi haft tillsammans.

Vi vill också tacka personalen på cytologi- och patologilaboratoriet som hjälpt oss att färga och montera preparaten. Vi har alltid känt oss välkomna och inkluderade, vi värdesätter ert trevliga bemötande och uppmuntran under studiens gång.

Referenser

1. Shambayati B. Cytopathology. New York: Oxford University Press; 2011. p. 2, 8, 13-6, 21, 32-3, 180-2, 210-1, 213, 216-22, 225, 292, 299-301.
2. Rossi ED, Bizzarro T, Schmitt F, Longatto-Filho A. The role of liquid-based cytology and ancillary techniques in pleural and pericardic effusions: an institutional experience. *Cancer Cytopathol.* 2015;123(4):258-66.
3. Cook DJ, Warren PJ. Cellular Pathology. Third ed. Banbury: Scion Publishing Limited; 2015. p. 245-6, 241, 274-7, 282-5.
4. Gattuso P, Reddy VB, Masood S. Differential diagnosis in cytopathology. New York: Cambridge University Press; 2010. p. 100-1.
5. Gray W, McKee GT. Diagnostic Cytopathology. Second ed. London: Churchill Livingstone; 2003. p. 136-7.
6. Rossi ED, Mule A, Russo RM, Pierconti F, Fadda G. Application of liquid-based preparation to non-gynaecologic exfoliative cytology. *Pathologica.* 2008;100(6):461-5.
7. Hoda RS. Non-gynecologic cytology on liquid-based preparations: A morphologic review of facts and artifacts. *Diagn Cytopathol.* 2007;35(10):621-34.
8. Fischer AH, Clayton AC, Bentz JS, Wasserman PG, Henry MR, Souers RJ, et al. Performance differences between conventional smears and liquid-based preparations of thyroid fine-needle aspiration samples: analysis of 47,076 responses in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Non-Gynecologic Cytology. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(1):26-31.
9. Hologic I. ThinPrep® 5000 Processor Operator`s Manual. Marlborough: Hologic, Inc.; 2008. p. 2, 3.1, 3.4, 5.3-5.11.
10. Jonsson A, Said M. Metodutveckling av en vätskebaserad cytologisk metod vid preparering av exsudat - En jämförelse med konventionell cytologi: Jönköping University; 2016.

11. Patologilaboratoriet, Laboratoriemedicin, Region Jönköpings län. Exsudat preparering. 2015.
12. Patologilaboratoriet, Laboratoriemedicin, Region Jönköpings län. Papanicolaou färgning. 2015.
13. Lag (2002:297) om biobanker i hälso- och sjukvården m.m (SFS). Stockholm: Socialdepartementet.
14. Mikrobiologiska arbetsmiljörisker - smitta, toxinpåverkan, överkänslighet (AFS 2005:1), föreskrifter. Stockholm: Arbetsmiljöverket.
15. Svensk Förening för Patologi – Svensk Förening för Klinisk Cytologi. Pleura. http://www.svfp.se/foreningar/uploads/L15178/kvast/thorax/Pleura_v1.2_171130.pdf, 2017. [2018-05-03]
16. Linder J. Recent advances in thin-layer cytology. *Diagn Cytopathol.* 1998;18(1):24-32.
17. Leung CS, Chiu B, Bell V. Comparison of ThinPrep and conventional preparations: nongynecologic cytology evaluation. *Diagn Cytopathol.* 1997;16(4):368-71.
18. Ren S, Solomides C, Draganova-Tacheva R, Bibbo M. Overview of nongynecological samples prepared with liquid-based cytology medium. *Acta Cytol.* 2014;58(6):522-32.