



FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

Optimalisering av
Romanowsky-farging
på serøse væsker

Optimization of
Romanowsky- staining
on serous fluids

Av/by Marthine Kalsaas & Ingrid Berntsen

Trondheim, 2019

Forord

Denne bacheloroppgaven ble gitt av seksjon for Cytologi, avdeling for Patologi ved St. Olavs Hospital i Trondheim. Oppgaven er skrevet i forbindelse med bachelorgrad i Bioingeniørfag ved Norges tekniske-naturvitenskaplige universitet - NTNU (Trondheim). Vi ønsker med dette å takke våre faglige veiledere seksjonsleder Maj Liv Eide og cytodiagnostiker Camilla Skånøy Buan for god veiledning og hjelp under utførelse av prosjektet, og vår prosessveileder Asle Andreas Grislingås for god skriveveiledning. Takk til seksjon for Cytologi for lån av laboratoriearealer og laboratorieutstyr, samt nødvendig materiale til utførelse av oppgaven.

Sammendrag

Bakgrunn: Hensikten med denne oppgaven gitt av seksjon for cytologi, avdeling for patologi, St. Olav Hospital, var å optimalisere forbehandling av pasientprøver med serøse væsker, samt å optimalisere den eksisterende Romanowsky- fargemetoden May- Grünwald- Giemsa for dette prøvematerialet. Det var ønsket å oppnå en kvalitet som tilfredsstillende en score på minst 4 (god) i UK-NEQAS Staining Criteria Handbook –Non Gynae Diagnostic Cytology.

Metode: Det ble foretatt utprøving av ulike Romanowsky fargemetoder både på preparat laget med Megafunnel og på direktestryk fra serøse væsker. Ut i fra både innhentet teori og trinn i fargeprotokoller for Romanowsky- farging tilsendt fra andre sykehus, så ble det satt sammen utkast til ulike fargeprotokoller for en rask forprøving. De mest vellykkede og lovende av disse utkastene ble så valgt ut til å bli testet mer nøye videre. Fargeprotokollene ble da kalt henholdsvis ny May- Grünwald- Giemsa (ny MGG), Giemsa i 15 minutter (G15) og Giemsa i 20 minutter (G20), og disse ble programmert inn i fargemaskinen Gemeni AS. I tillegg ble fargekvaliteten til hurtigfargen Color Rapid også vurdert på dennes oppnådde fargekvalitet på lik linje med de nye fargeprotokollene.

Preparater og direktestryk ble laget i to store batcher fra åtte ulike pasientprøver. Det ble gjennomført farging hver ukedag i en hel uke, med to preparat fra hver pasientprøve til hver protokoll, dette gjaldt også den protokollen som er til daglig bruk ved seksjonen. Fargerresultat fra den nåværende brukte protokollen ble brukt som sammenligningsgrunnlag for de andre nye fargeprotokollene, men ble også brukt for å undersøke hva som skjer med fargene dersom man ikke har nylagde farger hver dag, men i stedet bare lager nye farger to ganger i uken.

Resultater: Både ny MGG og G15 viste gode resultater i forhold til den nåværende brukte MGG protokollen. G20 gav for mørk kjernefarge. Hurtigfargemetoden gav et utilfredsstillende resultat.

Konklusjon: Både protokoll for ny MGG og G15 oppnådde et bedre fargerresultat enn den nåværende brukte fargeprotokollen ved seksjon for cytologi. Fargeprotokollen for ny MGG anbefales, da denne gav en mer dimensjonal og tonet visualisering av cellebildet, enn det fargeprotokollen G15 klarte. Begge oppnådde en helhetlig score på 4, mens den nåværende brukte fargeprotokollen oppnådde en score på 3.

Abstract

Background: The purpose of this task given by Section for Cytology at the Department of Pathology at St. Olav Hospital, was to optimize pretreatment of patient samples with serous fluids, as well as to optimize the existing Romanowsky staining method, May- Grünwald-Giemsa for this material. It was wanted to achieve a quality that meets a score of at least 4 (good) in the UK-NEQAS Staining Criteria Handbook –Non Gynae Diagnostic Cytology.

Method: Various Romanowsky- staining methods were tested on both preparations made with Megafunnel and on direct smears from serous liquids. Based on both obtained theory and steps in staining protocols sent to us from other hospitals, drafts to different new staining protocols were put together for a quick preview. The most successful and promising of these drafts were then selected to be more carefully tested, in the staining protocols called new_May-Grünwald-Giemsa (new MGG), Giemsa for 15 minutes (G15) and Giemsa for 20 minutes (G20), and was programmed into the Gemeni AS staining machine. In addition, the fast stain Color Rapid was also assessed on its achieved staining quality, similar to the new staining protocols. Preparations and direct smears were made in two large batches from eight different patient samples. Staining was carried out every weekday for a whole week, with two preparations from each patient sample for each protocol, this also applied to the daily used protocol at the section of Cytology. Staining results from the current used protocol were used as a basis not only for comparison for the other new protocols, but were also used to examine what happens to the staining result if one does not use freshly prepared stains every day, but only prepare these two times a week instead.

Results: Both new MGG and G15 showed good results compared to the current used MGG protocol. G20 gave a too dark nuclear stain. The fast staining method gave an unsatisfactory staining result.

Conclusion: Both of the new Romanowsky- staining protocols, MGG and G15, achieved a better staining result than the current used staining protocol at section of Cytology. The new MGG staining protocol is recommended as it provided a more dimensional and toned visualization of the cell image than the G15 staining protocol. Both achieved an overall score of 4, while the current used staining protocol achieved a score of 3.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	II
Sammendrag.....	III
Abstract	IV
Innholdsfortegnelse	V
1 Innledning.....	7
<i>1.1 Kreft.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2 Diagnostikk av kreft.....</i>	<i>9</i>
<i>1.3 Hva er cytologi.....</i>	<i>9</i>
<i>1.4 Serøse hinner.....</i>	<i>10</i>
<i>1.5 Cytologisk undersøkelse av serøse væsker</i>	<i>13</i>
<i>1.6 Romanowsky fargemetode</i>	<i>13</i>
<i>1.7 Problemstilling – Bakgrunn og hensikt med oppgaven</i>	<i>23</i>
2 Materiale og metode.....	24
<i>2.1 Preparering</i>	<i>24</i>
<i>2.2 Farging.....</i>	<i>26</i>
<i>2.3 Vurdering</i>	<i>32</i>
3 Resultater	34
<i>3.1 Preparering.....</i>	<i>34</i>
<i>3.2 Den nåværende fargeprotokollen for May- Grünwald- Giemsa</i>	<i>38</i>
<i>3.3 Resultat av farging med ny May- Grünwald- Giemsa fargeprotokoll.....</i>	<i>43</i>
<i>3.4 Giemsa farging</i>	<i>45</i>
<i>3.5 Hurtigfargens resultater med bruk av Color Rapid</i>	<i>49</i>
<i>3.6 Farging med buffer som har fått endret pH.....</i>	<i>51</i>
<i>3.7 Sammenligning av fargerresultat</i>	<i>52</i>

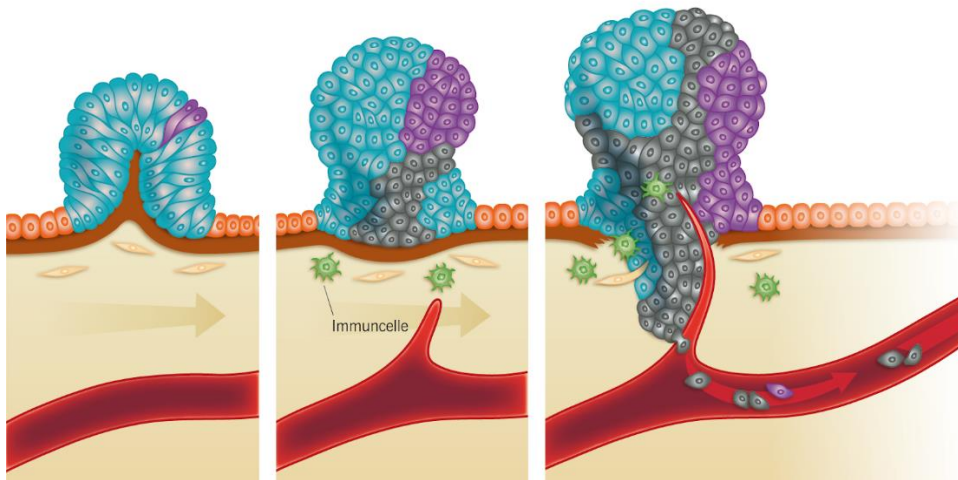
4	Diskusjon.....	58
4.1	<i>Preparering.....</i>	58
4.2	<i>Resultat av avdelingens nåværende protokoll for May- Grünwald- Giemsa.....</i>	60
4.3	<i>Ny MGG farging.....</i>	62
4.4	<i>Giemsa farging.....</i>	62
4.5	<i>Hurtigfarge.....</i>	63
4.6	<i>Endret pH av buffer og farger.....</i>	64
4.7	<i>Sammenligning av store grupper.....</i>	64
4.8	<i>Vurdering av fargekvalitet og å gi score.....</i>	65
5	Konklusjon.....	66
6	Referanser.....	67
7	Vedlegg.....	69

1 Innledning

1.1 Kreft

Globalt er kreft en av de vanligste dødsårsakene, og hvert år dør nesten ni millioner mennesker av kreft (“Verdens kreftdag” n.d.). I Norge får mer en 30 000 mennesker hvert år beskjed om at de har kreft, og ut fra dagens kreftbilde, antas det at omtrent hver tredje nordmann vil få en kreftdiagnose innen fylte 75 år. En høyere levealder og en befolkningsøkning er hovedårsakene til at antallet krefttilfeller øker, og dette gjør at det også forventes en fortsatt økning frem til 2025. I 2016 døde 10 994 personer i Norge av kreft og halvparten av disse dødsfallene skyldtes kreft i enten prostata, bryst, lunge, tykk- og endetarm. De vanligste kreftformene hos menn, er kreft som oppstår i prostata, tykktarm, lunge, blære og urinveier, mens de vanligste kreftformene hos kvinner er kreft i tykktarm, lunge, bryst og føflekker i hud. Lungekreft er den kreftformen som tar flest liv blant menn og kvinner sammenlagt (Roald, Sauer, and Klepp 2018)(“Kreft” n.d.). I 2016 var lungekreft (sammen med kreft i trachea- og bronkie) den sjette mest vanlige dødsårsaken på verdensbasis med hele 1,7 millioner dødsfall. (“The Top 10 Causes of Death” n.d.).

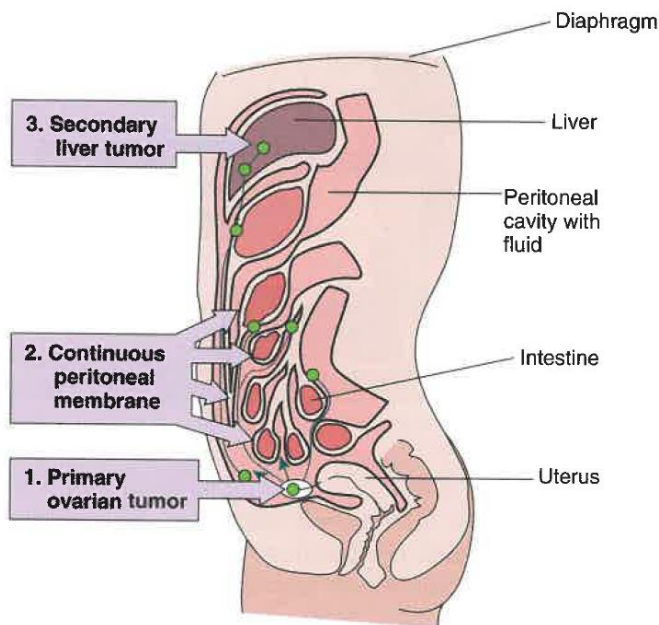
Kreftceller kan spre seg til de fleste organer, men veldig ofte så sprer de seg først til primærtumorens nærliggende lymfeknuter. Vanlige spredningsmål er organer som lymfeknuter, skjelett, lunger, lever og hjerne, se figur 1.1i. Ulike krefttyper har en tendens til å spre seg til bestemte organer (“Hva er kreft?” n.d.).



Figur 1.1i: Viser hvordan kreftceller etterhvert klarer å spre seg til underliggende vev og komme over i blodbanen, noe som muliggjør metastase- dannelse (“Hva er kreft?” n.d.)

Har man fått spredning til de serøse hulrom, stammer primærtumor ofte fra mamma eller eggstokker (Davidson and Berner n.d.). Seeding refererer til den spredning av kreftceller som oppstår enten via kroppsvæsker eller langs membraner, og da oftest i kroppshulrom.

Eggstokkreft kan for eksempel spre seg til bukhinnen (peritoneum), se figur 1.1ii. (VanMeter, Hubert, and Askews & Holts Library Services 2018)



Figur 1.1ii: Viser hvordan ovarial kreft spres via seeding over den peritoneale hinnen. (VanMeter, Hubert, and Askews & Holts Library Services 2018)

1.2 Diagnostisering av kreft

For å diagnostisere kreft brukes en kombinasjon av metoder. Metodene som brukes er en vanlig klinisk undersøkelse, bildeundersøkelser som CT/MR/ultral lyd/røntgen, kjemiske prøver samt en patologisk undersøkelse. Den patologiske undersøkelsen går ut på å ta en biopsi, noe som er en bit av kreftsvulsten, for så å preparere denne gjennom fiksering, innstøpning, snitting og farging, for så å tilslutt undersøke det histologiske preparatet lysmikroskopisk (Klepp 2018). Histologi er læren om den normale oppbyggingen av vev, altså anatomien til vevet sett mikroskopisk (“histologi” 2019). Patologen som vurderer det histologiske preparatet kan som regel se om svulsten er benign eller malign, og de patologiske undersøkelsene er derfor vesentlig for å kunne stille diagnosen kreft. Klinisk cytologi er også viktig, og undersøkelsen som da gjøres er å ta ut celler ved hjelp av et nålestikk eller ved å ta ut, dvs. ta ut prøvemateriale fra en kroppsoverflate hvor dette avstøtes (eksfolieres) (Klepp 2018). Cytologiske undersøkelser kan i noen tilfeller hjelpe til med å klare å stille en diagnose veldig tidlig, og dermed gjøre behandlingen enklere og gi gode helbredelsesutsikter.

1.3 Hva er cytologi

Diagnostisering av sykdom ved hjelp av cytologi kan forstås som en lysmikroskopisk undersøkelse av celler som er overført til objektglass, fiksert og farget med relevante fargemetoder. Dette kalles heretter et preparat. Preparatet blir undersøkt for å se om det finnes maligne eller premaligne celler (Roald 2016). Ved cytologisk vurdering studeres detaljer i cellenes kjerne og cytoplasma. God kvalitet på prepareringen er essensielt for optimal diagnostikk. Cytologiske preparat vurderes først av spesialutdannede bioingeniører, som merker av unormale celler på objektglasset og foreslår en diagnose. Deretter vurderer en patolog preparatet og stiller endelig diagnose. Cytologi kan deles inn i to områder, gynekologisk og ikke gynekologisk.

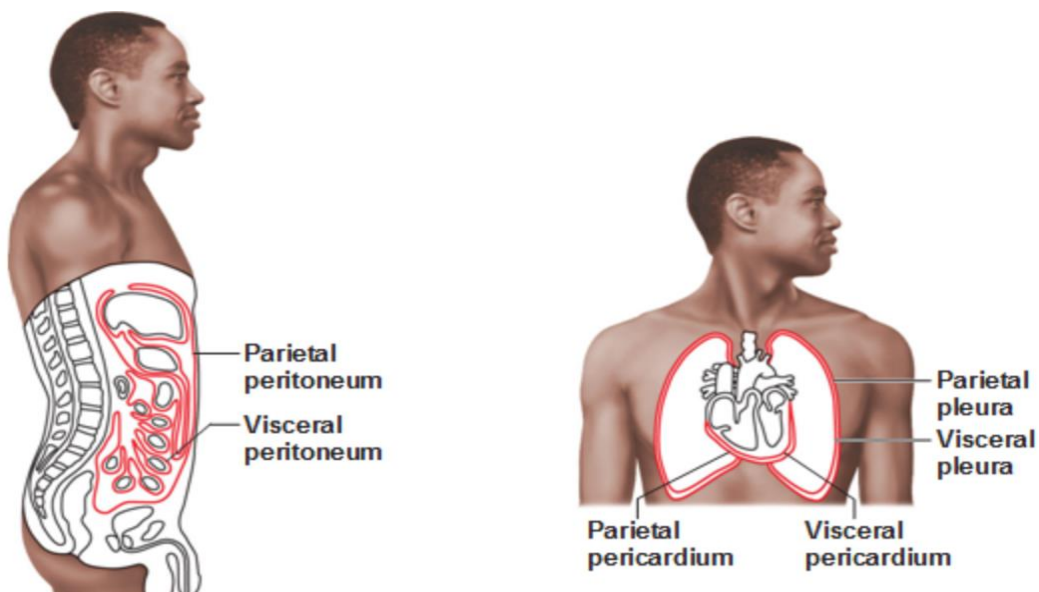
Ofte bygges diagnosen på en kombinasjon av funn i både celleprøven til cytologisk undersøkelse og den histologiske undersøkelsen av vev fra en biopsi (Roald 2018). Dette er fordi det ofte sendes prøver både til cytologi og histologi samtidig. Dette gjelder først og fremst ikke gynekologiske prøver. Den cytologiske prøven gir som regel både et noe hurtigere svar og en videre indikasjon, noe som hjelper patologen med å raskt også kunne rekvirere immunprøver.

Biopsien til histologisk undersøkelse går sin gang samtidig, men det tar mer tid å behandle vevsbiter før de kan vurderes mikroskopisk. Innen de histologiske snitt er klare til å se på, så vil det kanskje samtidig på grunn av den cytologiske prøvens svar, kunne foreligge immunprøvesvar. Det skjer altså en kombinasjon av en rask metode sammen med en noe langsommere metode, noe som effektiviserer diagnostiseringen.

1.4 Serøse hinner

Både i brysthulen (området mellom lungene og brystveggen), i bukhulen (området mellom bukorganene og bukveggen), og mellom hjertet og hjerteposen er det doble serøse hinner. Mellom hinnene befinner det seg litt vevsvæske, og denne gjør at hinnene glir lett mot hverandre (Holck 2018). Alle de tre serøse hinnene er fullstendig lukkede og danner en kontinuerlig dobbeltlaget beskyttelse for organene. Unntak er den peritoneale hinnen, som ikke er fullstendig lukket, der hvor den mottar de fimbrierte endene av egglederne (Bibbo and Wilbur, 2008).

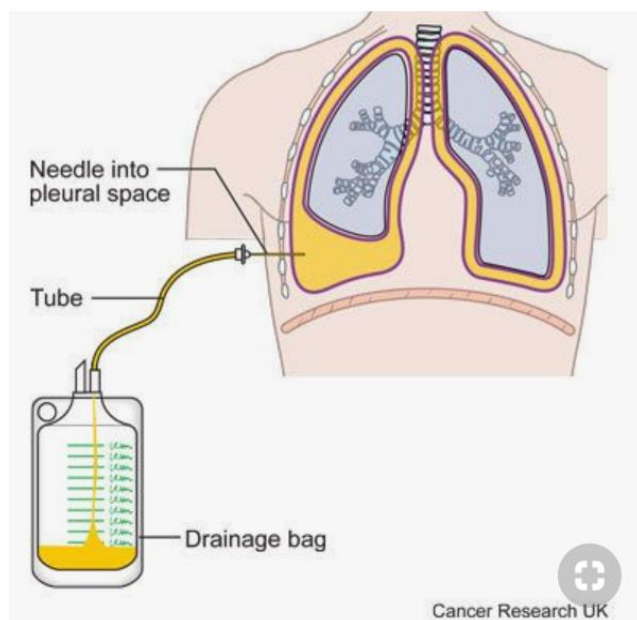
Under normale forhold er det så lite vevsvæske mellom de to serøse hinnene at de to hinnene er i kontakt med hverandre (Bibbo and Wilbur, 2008). Den innerste hinnen, som ligger vendt mot og som kler organene kalles det viscerale lag, mens hinnen som kler de eksterne veggene kalles det parietale laget. De serøse hinnene som omgir lungene og kler brystveggen kalles pleura, hinnen i buken som kler veggen og omgir bukorganene kalles peritoneum og hjerteposen kalles pericardium (Holck 2018). Figur 1.4i viser hvordan pleura, pericardium og peritoneum ligger i kroppen og hvordan de kler organene som de beskytter og kroppsveggen rundt.



Figur 1.4i: Viser de serøse hinnene peritoneum i bukhulen, pleura i brysthulen og pericardium som omgir hjertet (“Three Types of Membrane” n.d.)

De serøse hinnene består alle av et enlaget flatt eller kuboid plateepitel kalt mesotel. Mesotelet støttes igjen opp av bindevev som inneholder et nettverk av nerver, kapillærer og lymfatiske årer (Mecsei 2007). De serøse hinnene er semipermeable, noe som betyr at de tillater en kontinuerlig filtrasjon av blodplasma. Det tynne mesotelet tillater altså at vevsvæske kan trenge gjennom til overflaten, og dette medfører både at overflatecellene får næring, samt at hinnen holdes fuktig. Fuktigheten fungerer lubrikerende og nedsetter friksjon mot organene (Holck 2018). Samlebetegnelsen på vevsvæsken i hulrommet mellom de to hinnene (pericardium, peritoneum og pleura) er serøse væsker.

Enhver skade på den mesoteliale membranen i de serøse hinnene vil medføre en reaksjon, som videre gjør at det blir dannet et flerlaget plateepitel (mesotel) i stedet for det opprinnelige enlagede plateepitelet. Cellelagene som dannes som reaksjon på skaden har ofte en kuboid form, og samtidig som det enlagede mesotelet erstattes av et flerlaget mesotel, så vil det også skje en akkumulering av mer beskyttende væske. Økt væskedannelse mellom det viscerale og det parietale laget av hinnen, kalles en effusjon, og vil være en indikasjon på sykdom (Mecsei 2007). Figur 1.4ii viser hvordan en effusjon i pleura blir tappet ved aspirasjon.



Figur 1.4ii: Tapping av opphopning av pleuravæske fra hinnen som omkranser lungene, bilde hentet fra: (“Pinterest (Norge / Norway)” n.d.)

Benigne celler som ofte er å finne i serøse effusjoner er som regel blodceller som erythrocytter, leukocytter og histiocytter, samt mesotelceller. Effusjoner klassifiseres i transudat og eksudat. Et transudat oppstår som følge av et økt hydrostatisk venøst eller lymfatisk trykk, og kan skyldes tilstander som funksjonsforstyrrelser i hjertet, levercirrhose, nyresykdom eller feilernæring. Transudat har ofte en klar strågul farge og har en lav proteinkonsentrasjon, et lavt innhold av mesoteliale celler og leukocytter. Eksudat oppstår som følge av en irritasjon av den serøse hinnen og er assosiert med skade på årene, noe som resulterer i en endring av hinnens permeabilitet. Eksudatet vil ofte være en uklar/blakket væske, og med en variasjon av ulike farger. En dannelse av dette skyldes ofte enten inflammasjon eller kreft. (Mecsei 2007)

Ved cytologisk vurdering av en serøs væske benyttes ulike preparerings metoder for å øke den diagnostiske treffsikkerheten. Ved seksjon for cytologi, avdeling for patologi, St. Olavs Hospital, lages det to cytologiske preparat vha. en trakt og cytosentrifugering. Ett preparat lufttørkes og farges med en Romanowsky fargemetode og det andre fikseres i etanol og farges med Papanicolaous fargemetode. I tillegg lages det en celleblokk av materialet som støpes inn i voks, snittes og som videre farges med Hematoksylin og Eosin (HE). Dersom man finner mulige kreftceller i noen av disse preparatene ved mikroskopering, så kan man foreslå en diagnose.

1.5 Cytologisk undersøkelse av serøse væsker

Cytologisk undersøkelse av effusjoner gjøres i hovedsak ved mistanke om kreftceller i den serøse væsken. Ved funn av kreftceller vil dette som regel bety at pasienten ikke bare har kreft, men også at kreften allerede er så fremskredet at den har kommet til metastase- (sprednings-) stadiet. Det er sjeldent at funn av kreftceller i serøse væsker skyldes mesoteliom (kreft med opprinnelse i mesotelceller) eller sarkom (kreft med opprinnelse i serøs hinne), (Mecsei 2007).

Diagnostisering av maligne celler i effusjoner, gjøres på grunnlag av en kombinasjon av bestemte kriterier som må være oppfylt. Viktige kriterier er at disse cellene varierer veldig i størrelse og form. De vil også ha en annen N/C ratio (ratio på areal av kjerne i forhold til areal av cytoplasma) enn de normale cellene i effusjonen. Både mesotelceller og maligne celler kan vokse og fungere selv om de har blitt eksfoliert, da væsken de befinner seg i er et næringsrikt medium. Det at mediet cellene befinner seg i er næringsrikt betyr også at de forblir god bevart, og cellene viser derfor ofte den samme cellulære anordningen/strukturen som de har hatt i organet de har opphav fra. Dette gjelder spesielt for adenokarsinomer som er kreft utgått fra kjertelepitel. Det kan iblant være vanskelig å vite lokalisasjonen til primærtumor ved oppdagelse av maligne celler. En cytologisk undersøkelse kan gi en indikasjon på for hvor de maligne cellene stammer fra, men for å kunne stille en diagnose må det i tillegg suppleres med bruk av immunocytojemiske metoder. (Mecsei 2007)

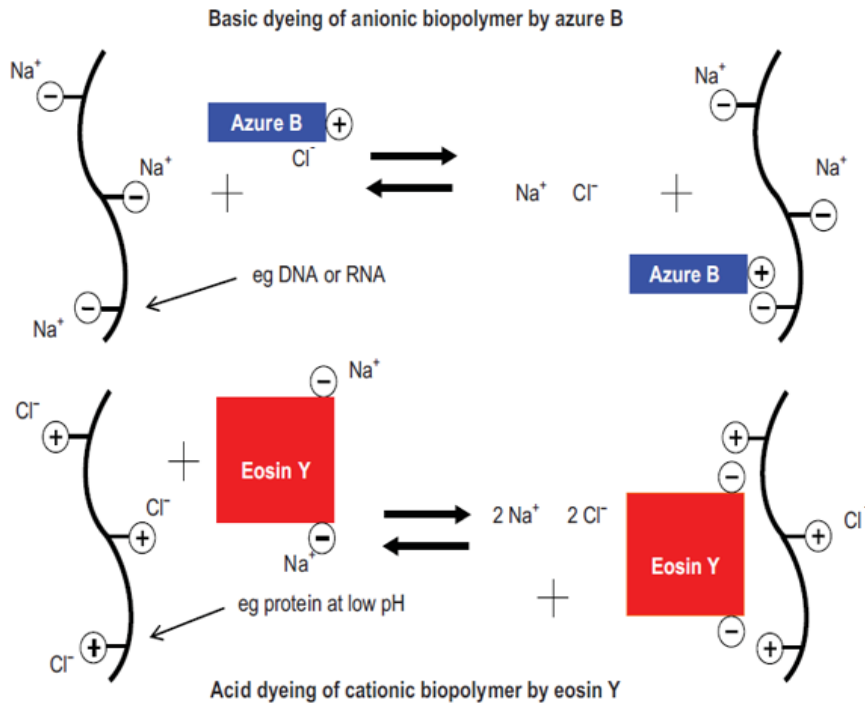
1.6 Romanowsky fargemetode

Det er mange ulike metoder som hører inn under Romanowsky- fargemetoder, blant annet Giemsa, Leishman- Giemsa, Riu, May-Grünwald-Giemsa (MGG), Wright, Wright-Giemsa og Diff- Quik. Alle disse nevnte metodene har det til felles at de til et minimum inneholder det sure fargestoffet eosin og det basiske fargestoffet azur B, som begge er nødvendig for å oppnå en Romanowsky- effekt. Det er bare azur B pluss ulike halogenerte fluoresciner, som f.eks eosin Y, som klarer å vise en variasjon av farger i fargespekteret for de ulike cellulære komponentene, kalt Romanowsky- polykromi, samt inkludert å gi lilla farge. Andre komponenter av polykrom metylenblå mislykkes i å enten gi lillafarge eller i å klare å gi kontrast mellom kjerne og

cytoplasma. Metylenblå alene er ikke stand til å gi lilla kjerner, men er derimot i stand til å gi himmelblå basofilt cytoplasma. Det er noe variasjon i hvilken Romanowsky- metode som er foretrukket i de ulike deler av verden. I Europa foretrekkes MGG, i Asia foretrekkes Riu eller Lishman- Gimsa, mens det i Nord- Amerika foretrekkes Wright- Giemsa eller Diff- Quick (Krafts and Pambuccian 2011).

MGG er en rutine-fargemetode i cytopatologi ved mange norske sykehus, blant annet ved St. Olavs Hospital i Trondheim. Metoden benyttes til å farge både imprint (vevsprøve som presses forsiktig på overflate av et objektglass slik at det dannes et avtrykk), lufttørket preparat laget ved hjelp av cytosentrifugering eller lufttørkede direkteutstryk av enten finnålsaspirasjon, materiale fra lymfeknute eller andre sentrifugerte kroppsvæsker. May-Grünwald Giemsa metoden innebærer bruk av tre farger, og disse fargene er azur B, eosin Y og metylenblått. I denne Romanowsky- metoden farges preparater først med May-Grünwald- fargeløsning, for så å etterfølges direkte med Giemsa- fargeløsning. May-Grünwald- fargeløsning inneholder ikke- oksidert metylenblått og eosin Y, mens Giemsa- fargeløsningen inneholder fargekomponentene eosin Y og oksidert metylenblått som kalles azur B.

Både metylenblå i May-Grünwald og azur B i Giemsa danner kationer (positivt ladede molekyler) og vil binde seg til negativt ladede cellekomponenter. Eksempler på negativt ladede cellekomponenter er blant annet nukleinsyrer, mastcellegranuler, slim og bruskmatriks. Bundet metylenblå eller azur B vil gi en blå farge på cellekomponenten. Eosin, i både May-Grünwald- og Giemsa- fargeløsningene, er derimot et anion (et negativt ladet molekyl) og binder seg til positivt ladede proteiner. Det sure fargestoffet eosin Y farger derfor elementer som er acidofile (har en affinitet for de sure elementene), og gir disse en fargevariasjon mellom rød-orange til rosa-orange (Piaton et al. 2016). Figur 1.6i viser henholdsvis hvordan kationfargen azur B binder seg til negativt ladede komponenter og hvordan anionfargen eosin Y binder seg til positivt ladede komponenter av en celle/vev.

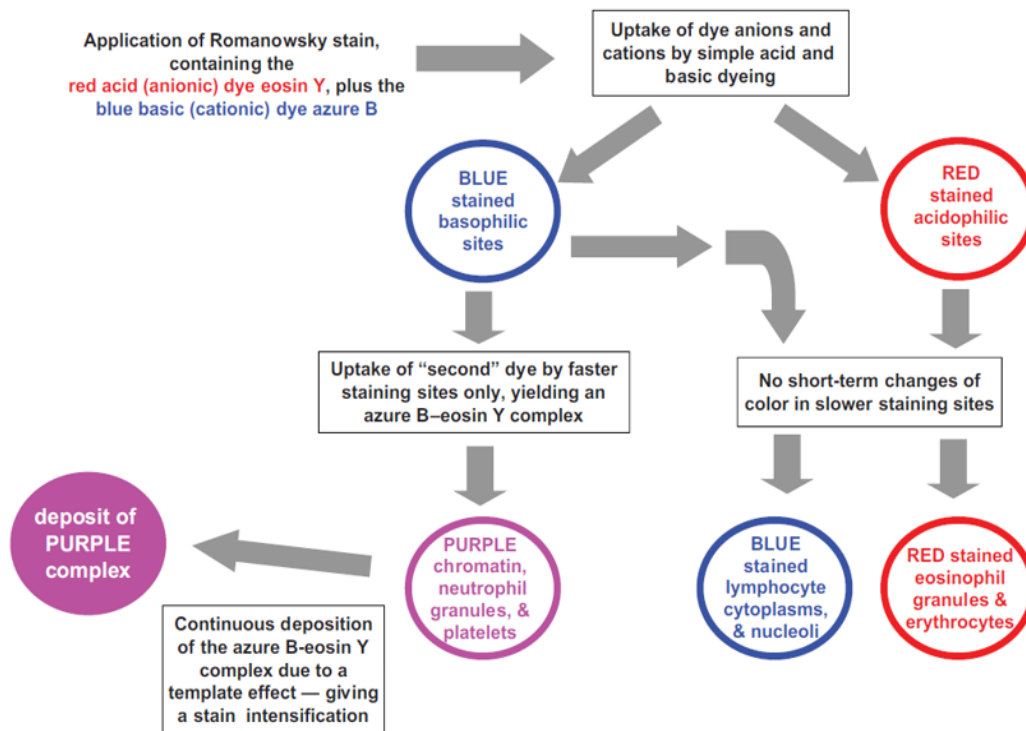


Figur 1.6i: Farging ved hjelp av syre og base, her forklart som ionebytte. Azur B, som er blå fester seg til DNA eller RNA (negativt ladet), og Eosin Y som er rød, fester seg til proteiner som er positivt ladet. (Horobin 2011)

Cellekjernene vil derimot i de fleste tilfeller farges lilla på grunn av vekselvirkninger som skjer mellom både eosin Y, azur B og DNA, og man får noe som antas å være en kompleksdannelse. Komplekset som dannes er et såkalt azur B-eosin- kompleks eller et azur B- eosin- biologisksubstrat- kompleks, og dette skjer som en konsekvens av den såkalte Romanowsky-effekten. Det er altså en kombinasjon av både eosin Y og azur B som muliggjør dannelsen av Romanowsky-effekt, og visuelt ses effekten ved at blant annet kjerner farges lilla. De to enkeltstående fargekomponentene azur B og eosin Y klarer ikke å oppnå denne effekten alene (Piaton et al. 2016), og det behøves derfor tilstedeværelse av både azur B og eosin i samme region av preparatet for å oppnå effekten. Det antas at det dannes et kompleks fordi mange bestander av et preparat som f.eks slim, kromatin og granula hos nøytrofile ikke har noe signifikant affinitet for eosin i et fravær av azur B (Horobin 2011).

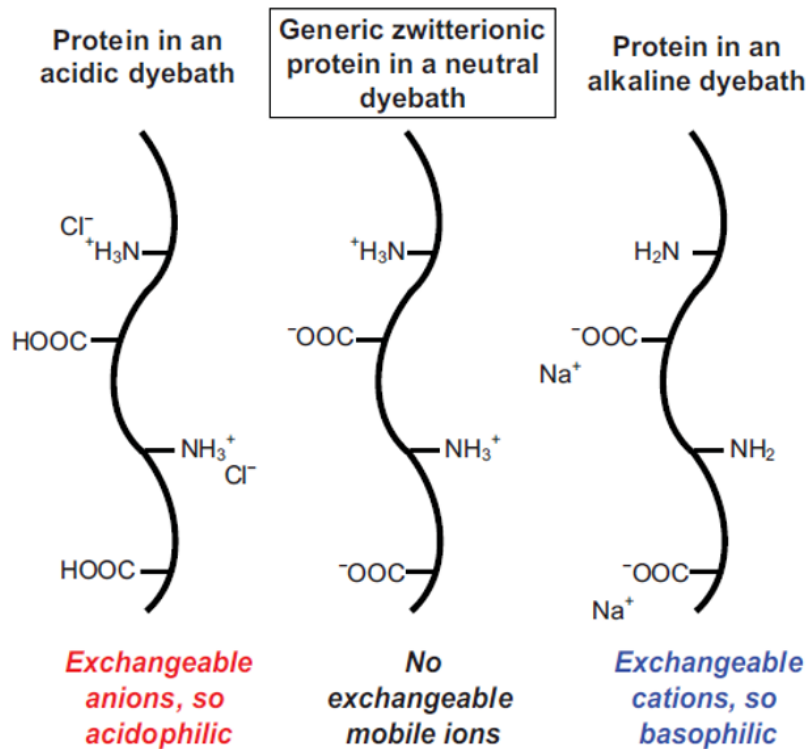
Dannelse av kompleks er et hastighetskontrollert trinn, og er helt avhengig av det i første omgang skjer en azur B- farging, som så igjen etterhvert transformeres og at det så dannes et azur B- eosin- kompleks. Det er på grunn av dette at det er to standardiserte Romanowsky-fargemetoder som har blitt utviklet, hvorav den ene metoden er en metode med bare to farger, azur B og eosin Y, mens den andre metoden er en metode med tre farger, som inneholder de to nevnte fargene i tillegg til metylenblå. Tilsatsen av metylenblå og dens blåfarge til den opprinnelige to-farge metoden ble sett på som en løsning for å kunne kompensere for en grålig farge på cytoplasma som kan oppstå på grunn av at azur B blir kontaminert av andre oksidasjonsprodukter (Horobin 2011). En to- fargemetode med bare azur B og Eosin Y, en såkalt Giemsa farging, uten May- Grünwald kan altså brukes, men det er da viktig at preparatene fikseres i 10 minutter i metanol før farging, og at buffer brukt til fortynning av farge-stockløsninger og skylling etter farging har pH 6,8 (Piaton et al. 2016).

Fargemolekyler av ulik størrelse diffunderer gjennom prøvematerialet med ulik hastighet. Store molekyler vil trenge inn i cellen langt tregere, både som følge av selve partikkelstørrelsen, men også på grunn av at fargestoffets affinitet. Affiniteten blir større både på grunn av større konjugerte systemer, men også på grunn van der Waals tiltrekning mellom farge og vev. Farge kan diffundere raskt inn i basofile molekyler, som f.eks. sure glycosaminoglycaner (GAG) som finnes i lysosomer, granula, og i nøytrofile lymfocytter, da de blir veldig oppsvulmet i vandige medier. Mens RNA i ribosomer i cytoplasma og nukleoler vil farges mye saktere med basisk farge. DNA i kromatin vil farges en del raskere, og dette kommer av at det er den helhetlige permeabiliteten til nukleoprotein- komplekset som kontrollerer fargestoffets tilgang. Dersom det ses på den relative molekylære massen til fargestoffene som en indikasjon på deres størrelse, så vil eosin Y være nesten tre ganger så stor som azur B (Horobin 2011). Noe som kan være med på å forklare hvorfor azur B forventes å farge mye raskere enn eosin Y, se figur 1.6ii.



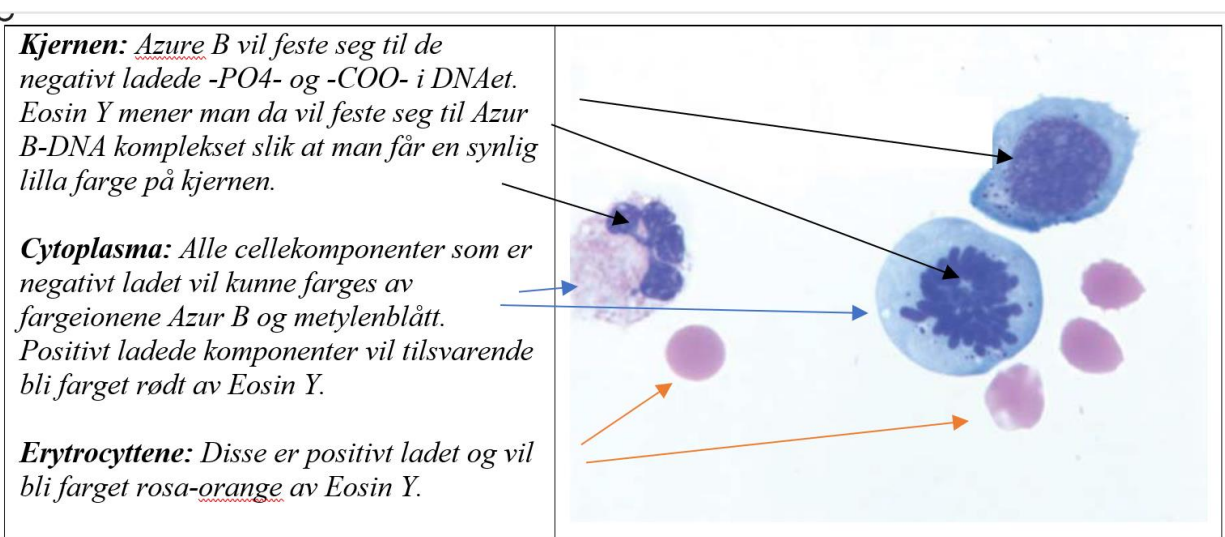
Figur 1.6ii: Mekanismen for Romanowsky fargemetode, hvor diagrammet viser hvordan de ulike komponentene i en celle vil ta til seg de ulike fargemolekylene etter hvilken ladning de har og hvor tilgjengelig de er (Horobin 2011)

Affinitet og hastighet for opptak av både azur B og eosin inn i substratet er viktig for å få lilla farge, og det er derfor viktig med rett fargetid for å oppnå et godt resultat. Et eksempel på dette er kromatin, visse granula i nøytrofile granulocytter og trombocytter, som først farges blå før det så etterhvert farges lilla. Når kromatin farges lilla, så vil basofilt cytoplasma fortsatt være blått, men hvis fargetiden derimot forlenges lenge nok, så vil også dette bli farget lilla. Ved ekstremt forlenget fargetid, så vil mange andre substrater få lillafarge (Horobin 2011). Figur 1.6iii viser hvordan endring av pH i de ulike fargeløsningene vil ha innvirkning på hvilken ladning de ulike cellulære- komponentene man ønsker å farge får. Ladning på de ulike cellulære komponentene er helt nødvendig for at fargemolekyler, som er enten anioner eller kationer, skal kunne binde seg.



Figur 1.6iii: Illustrasjonen viser den effekten som endring av pH vil ha på ladningen til biopolymerer, dette vil videre påvirke om det er en sur eller basisk fargekomponent som binder seg. (Horobin 2011)

Romanowsky- fargemetode gir både en god visualisering og differensiering mellom de cytoplasmatiske- komponentene, cellebakgrunn, mucus og den intracellulære matrix. Intracellulære bestanddeler vil farges ulikt alt etter hvilken affinitet de har til de ulike fargekomponentene, se bilde 1.6iV. (Piaton et al. 2016, 365).



Figur 1.6iv: Viser hvilke anionfarge de ulike cellekomponentene tar til seg (Krafts and Pambuccian 2011)

For å få et mer nyansert bilde farges preparater av serøse væsker både med May- Grünwald-Giemsa (MGG) og Papanicolaous på seksjon for cytologi ved St. Olavs Hospital. De to fargemetodene visualiserer ulike detaljer på preparatene noe forskjellig. Papanicolaous fargemetode gir både bedre kjernedetaljer, men også et bedre fargerresultat dersom preparatet er tykt, og har flere celledag oppå hverandre fordi det ikke er oppnådd det ønskelige enkle monolaget under preparering. MGG eller andre Romanowsky- fargemetoder vil derimot gi en bedre detaljoversikt over cytoplasma og dets indre komponenter, samt at luftfikseringen av preparatet før farging vil medføre en viss forstørrelseeffekt av både cellekjernen og dens cytoplasma (Piaton et al. 2016).

1.6.1 Fargekvalitet

Det er ulike faktorer som er med på å styre hvordan Romanowsky-fargekvaliteten blir. Faktorer som har innvirkning er f.eks. pH på bufferløsning, fikseringen av utstryk/preparat, den kjemiske sammensetningen av fargeløsningen og selve fargetiden. Et av kjennetegnene for en god MGG-farging vil være at erytrocytter som er acidofile på grunn av hemoglobinnholdet vil farges rosa-oransje, nøytrofile granulocytter og nukleært kromatin farges lilla, samt at de eosinofile granulocytterne farges rød-oransje. Den viktigste faktoren for å oppnå disse kjennetegnene er korrekte pH-forhold i både farge- og skylle- karene. Dersom erytrocytter farges grønne eller blå

kan dette skyldes for høy pH i fortynnings- og skylle-løsningene. Hvis det oppstår en for sterk blåfarge kan dette skyldes en for høy pH i bufferløsningen, for lang tid i fargekar eller at man har hatt en utilstrekkelig skylling. Dersom det derimot oppstår en for sterk rosa farge kan dette skyldes for lav pH i bufferløsningen, for kort fargetid eller at man har hatt for lang skylling mellom karene (Piaton et al. 2016).

Ved tillaging av fargeløsninger blir det anbefalt å bruke en bufferløsning med pH 6,8, men pH kan også ligge mellom 6,5-7,0. Hva som er den korrekte pH bestemmes av blant annet hvilken produsent man har valgt å kjøpe fargeløsning fra. Årsaken til dette er at det ikke eksisterer en standardisert oppskrift på den kjemiske sammensetningen av fargene. Produsentene velger selv hva de vil fokusere på å få frem med deres valg av kjemisk sammensetning på løsningene, og valg av hvilken produsent som gjøres innkjøp fra har derfor stor innvirkning på hvilket fargerresultat som oppnås (Piaton et al. 2016).

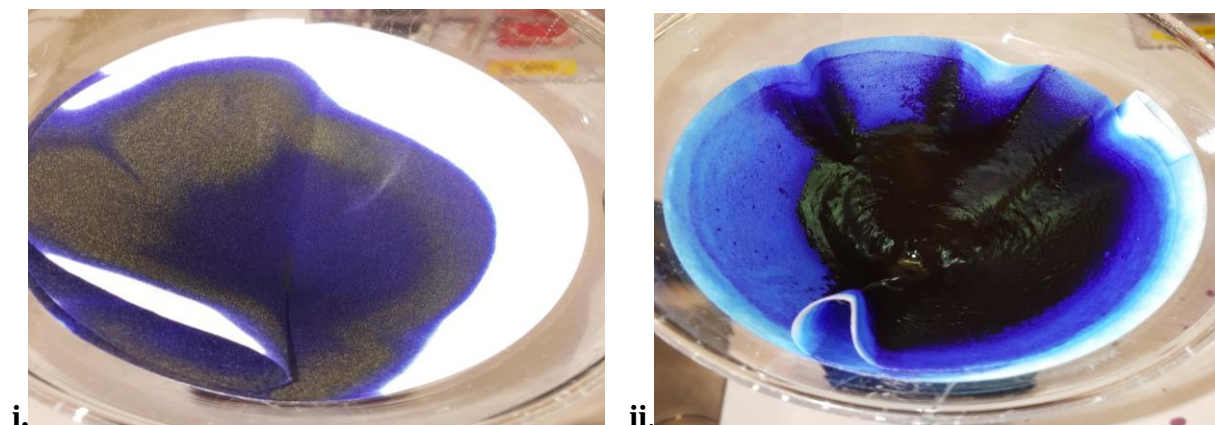
Det kan være vanskelig å standardisere selve fargeløsningene, da fargeløsningene også kan variere fra batch til batch. Grunnen til variasjonen kan ligge i ting som at f.eks stock- løsningen er ustabil ved at den er sensitiv for både lys og luft, og at den har blitt eksponert nettopp for dette, noe som har ført til en progressiv oksidasjon av metylenblå- fargeløsningen. En indre kontaminering kan også være med på å spille inn på selve variasjonen i fargeløsningene. Stock-fargeløsningene bør derfor holdes mest mulig beskyttet for luft og fuktighet, da dette kan oksidere og ødelegge fargeløsningene (Piaton et al. 2016).

1.6.2 Presipitattdannelse

Når en sur (anion) og en basisk (kation) fargeløsning blandes til én felles fargeløsning, kaller man det en polykrom fargeløsning. En slik blanding gir mulighet for at det kan dannes et uløselig salt. I en polykrom metylenblå- løsning, så vil alle de tilstedeværende kation- fargestoffene i en vandig løsning ved tilsats av eosin (anion) presipiterere. Det dannede presipitatet inneholder basisk fargestoff og surt fargestoff i en omtrent molar ratio på 2:1, noe som korresponderer til et nøytralt salt. Organiske løsemidler som er blandbart med vann, som for eksempel dimethylsulfoxid, glycerol eller metanol, reduserer de hydrofobiske effektene mellom de

hydrofobiske artene i vandige løsninger slik som Romanowsky fargeløsninger, og reduserer dermed presipitat- dannelse.

Etter tillaging av en vesentlig mer vandig bruksløsning for farging er gjort, så starter presipitering av materiale tilnærmet azur- eosinater. Mengde presipitat kan minskes ved å ta hensyn til faktorer som tid før fargeløsningen tas i bruk, samt opprettholdelse av både en lav temperatur og en lav fargekonsentrasjon. I tillegg er både en tilstedeværelse av et overskudd av sur eller basisk farge, og en større proporsjon av organisk løsemiddel som dimethylsulfoxid og glycerol, effektive inhibitorer for dannelse av presipitat (Horobin 2011). Det anbefales at fargeløsningene filtreres og erstattes etter én dags bruk, og at stock-bufferløsningen oppbevares i kjøleskap ved 4°C (Piaton et al. 2016). Figur 1.6.2i viser hvordan en ubrukt konsentrert Giemsa fargeløsning er blitt filtrert, og at det der ikke er dannet noe presipitat, mens figur 1.6.2ii derimot viser hvordan det har blitt dannet presipitat i en bruksløsning av Giemsa etter en dags bruk.



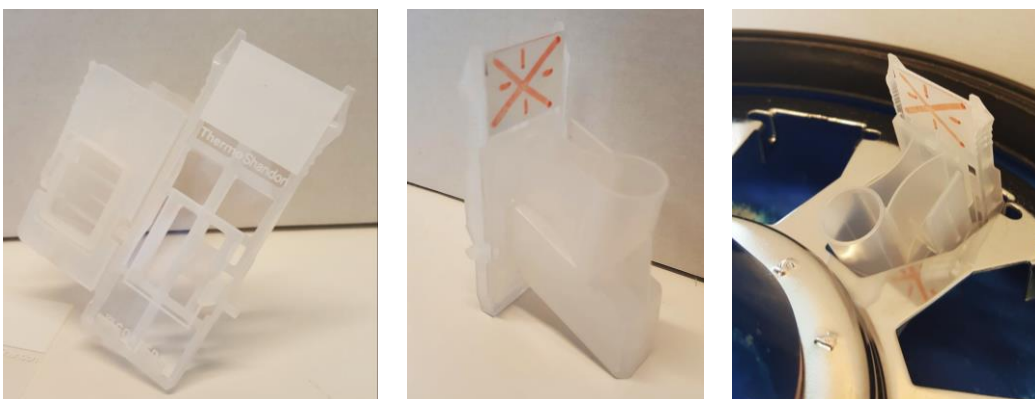
Figur 1.6.2i: Viser filterpapiret etter at ubrukt konsentrert giemsafarge blitt filtrert gjennom det. Her har det ikke blitt dannet noe presipitat, kun et rent fargeuttrykk i filterpapiret.

Figur 1.6.2ii: Etter en dags farging viser filtrering av giemsafargekar tydelig dannelse av presipitat.

1.6.3 Preparering av prøvemateriale før farging

Det finnes to ulike måter å preparere serøse væsker på, det kan enten foretas en cytosentrifugering med bruk av Megafunnel, eller så kan det lages et direkteutstryk.

Megafunnel er en teknikk som går ut på at cellene fordeles likt og flates ut på objektglasset ved hjelp av sentrifugalkraften (Gill 2013, 75). Før Megafunnel- sentrifugeringen så blandes det mottatte materialet godt, for så at et ønsket volum på mellom 0,5 til 1,0 mL tas ut. Dette volumet overføres så til prøvekommeret på Megafunnelen. Bestemmelse av prøvemengde for denne type preparering kan noen ganger være litt vanskelig, da det ikke bør tilsettes et større prøvevolum enn det som passer prøvekommeret. Faktorer som både hvor konsentrert, tyktflytende eller blodtilblandet prøvematerialet er, har også stor innvirkning på hvor bra kvaliteten blir, og i hvor stor grad det klarer oppnå målet om et monolag på preparatet. Dersom materialet er for tykt/viskøst kan et av midlene være å fortynne materialet med fysiologisk saltvann. Hvis det skulle bli et for tykt lag med materiale på preparatet, så kan det være vanskelig å beholde cellematerialet på objektglasset, og materialet har da en tendens til å løsne av i store flak. I tillegg så vil dette vanskeliggjøre en jevn farging, siden fargemolekylene ikke vil klare å komme til like lett på de delene hvor det er flere celledag. Som konsekvens av en for tykk preparering vil differensiering mellom cellene senkes. Figur 1.6.3i viser hvordan en Megafunnel- trakt ser ut, hvordan objektglass settes på denne trakten og lukkes igjen, samt hvordan trakten med objektglass er plassert i prøvekarusellen til sentrifugen.



Figur 1.6.3i: *Det første bildet fra venstre, viser Megafunnel med et innsatt objektglass før det monteres sammen, bilde 2 viser Megafunnel montert sammen, og det siste bildet viser montert Megafunnel plassert i sentrifuge, klar til å få overført pasientmateriale.*

Den andre metoden som kan benyttes for preparering av prøvemateriale er den manuelle direkteutstryks metoden, hvor det lages et utstryk på objektglass. Her må materialet sentrifugeres først, for så å helle av supernatanten, og deretter ta en eller to dråper av det konsentrerte prøvematerialet over på et objektglass, for så å manuelt ved hjelp av et annet objektglass lage et jevnt utstryk. Det er ved tillaging av utstryk manuelt viktig at det oppnås et tynt lag, et såkalt monolag, slik at den etterfulgte luftfikseringen skal kunne skje raskt nok.

Etter luft-fiksering behandles cellepreparatet fra Megafunnel eller manuelt utstryk i metanol. For å klare å oppnå et optimalt resultat bør fargingen skje med en gang etter at cellepreparatet har blitt lufttørket. Dette gjelder uansett hvilken metode man har valgt å benytte seg av for preparering (Piaton et al. 2016).

1.7 Problemstilling - Bakgrunn og hensikt med oppgaven

Hensikten med denne oppgaven er å optimalisere forbehandling av pasientmateriale og Romanowsky-farging av preparat fra serøse væsker for å forsøke å oppnå en kvalitet som tilfredsstillende en score på minst 4 (god) i UK-NEQAS Staining Criteria Handbook –Non Gynae Diagnostic Cytology.

Dette skal gjøres ved utprøving av ulike Romanowsky fargemetoder på preparat fra serøse væsker. Preparatene som farges lages av rester av prøvemateriale fra pasienter, som har fått sin cytologiske diagnose. Resultatet av utprøvingen vil ikke endre fastsatt diagnose, og har således ingen betydning for behandling av pasientene, men gjøres for å optimalisere May- Grünwald-Giemsa- fargeprotokoll og forbehandling av preparat før farging med denne.

Problemstillingen er todelt:

- 1. Utprøving av ulike Romanowsky fargemetoder på preparat fra serøse væsker.*
- 2. Optimalisere May- Grünwald- Giemsa fargeprotokoll og forbehandling av preparat*

Materiale og metode

2.0 Registrering av materiale

Prøvematerialet som ble brukt i dette prosjektet var overskuddsmateriale fra åtte ulike pasientprøver sendt til seksjon for cytologi, avdeling for patologi ved St. Olavs Hospital. Alle disse pasientprøvene var serøs væske fra pleura. For å sikre at sensitive opplysninger ble anonymisert så ble disse prøvene registrert i Sympathy, som prøver til forskningsprosjekter og metodeutprøving/validering ved avdeling for medisinsk genetikk og avdeling for patologi, etter prosedyre med dokument- ID 36048.

2.1 Preparering

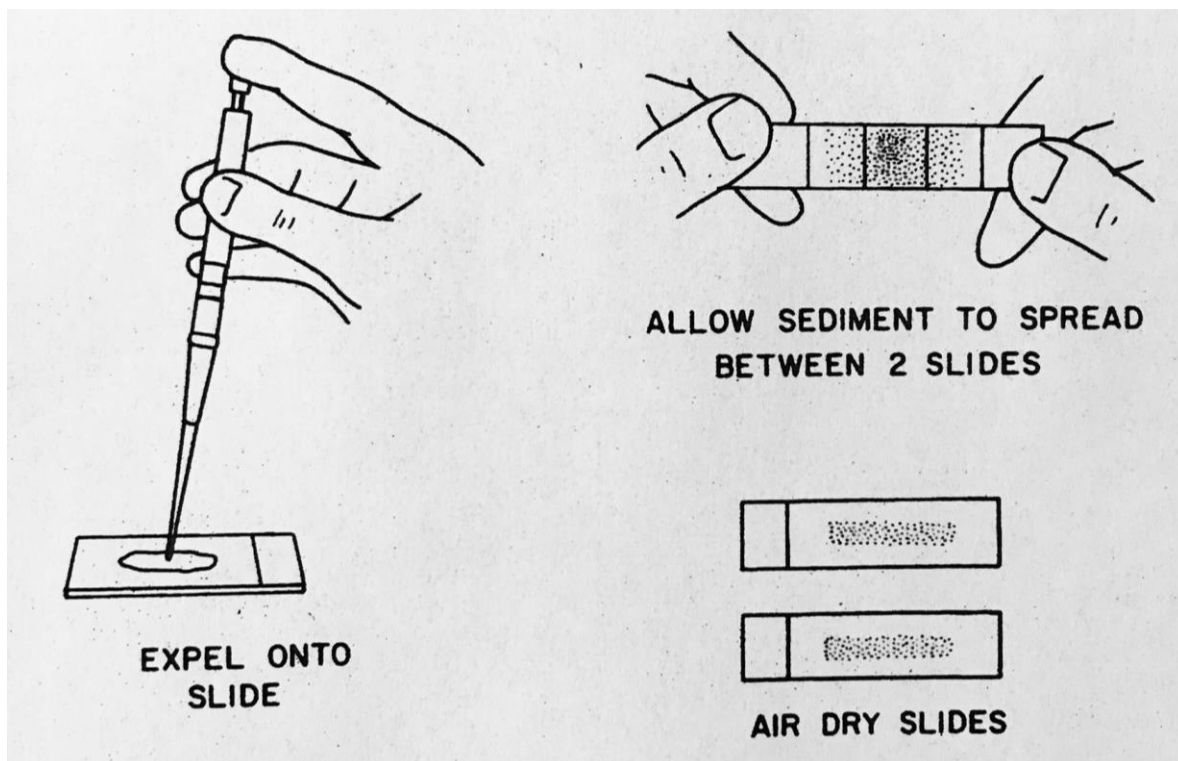
Ved preparering av serøse væsker ble det benyttet to ulike prepareringsmetoder parallelt for hver pasientprøve. Det ble laget både et manuelt direkteutstryk og et preparat ved hjelp av Shandon EZ Megafunnel. I figur 2.1i vises både et farget direkteutstryk og et farget preparat laget med Megafunnel som begge er tillaget fra det samme pasientmaterialet. Hver fargeprotokoll som det ble farget med i dette prosjektet fikk altså prøvemateriale preparert med begge disse metodene. Tilsammen ble det testet ut tre nye protokoller som ble sammenlignet med nåværende May-Grünwald- Giemsa- protokollen som avdelingen bruker. I tillegg så ble hurtigfargen Color Rapid som også er i bruk på avdelingen når farging må skje raskt kvalitetsvurdert ut i fra de samme kriteriene som de andre fargeprotokollene.



Figur 2.1i Viser direkteutstryket som er det som ligger til venstre på bildet, og preparatet laget med Megafunnel til høyre på bildet. Disse to ble laget for hver protokoll. Tilsammen ble det testet ut fire nye protokoller som ble sammenlignet med den nåværende protokollen som avdelingen bruker. De fem protokollene som det ble farget med var:

- Nåværende protokoll for May- Grünwald- Giemsa
- Protokoll for hurtigfarging Color Rapid
- Protokoll for ny May- Grünwald- Giemsa
- Protokoll Giemsa 15 minutter
- Protokoll Giemsa 20 minutter

Ved tillaging av direkteutstryk ble det tatt ut omlag 10 mL med godt blandet prøvemateriale, som ble overført til et merket spissbunnet sentrifugeglass. Det spissbunnede sentrifugeglasset med prøve ble deretter sentrifugert ved 3000 RPM i 10 minutter. Supernatanten ble helt av, og én dråpe med konsentrert prøvemateriale ble overført til omtrent midten på et superfrostglass (objektglass). Superfrostglasset var allerede på forhånd merket med prøve-ID og dato. Et annet merket superfrostglass ble deretter lagt over, før så glassene så ble trukket fra hverandre, slik at prøvematerialet ble overført og fordelt jevnt utover begge glassene. Figur 2.1ii illustrerer hvordan dette ble gjort. Glassene fikk så tørke i minimum 10 minutter før de ble farget med en av de ulike fargeprotokollene.



Figur 2.1ii: Illustrerer hvordan man lager direkteutstryk ved å overføre én dråpe konsentrert prøvemateriale til et merket superfrostglass. Et annet merket superfrostglass ble deretter lagt over, før glassene så ble trukket fra hverandre, slik at prøvematerialet ble overført og fordelt jevnt utover begge glassene. Bilde tatt fra (Koss, Melamed, and Koss 2006).

Prøvematerialet som ble preparert ved hjelp av Shandon EZ Megafunnel ble direkte overført til trakten på Megafunnelen, uten noen forbehandling annet enn at prøveglasset ble vendt godt, for å sikre at også innhold som har sunket til bunnen kom med. Det ble gjort en visuell vurdering av konsistensen av hver prøve før den ble direkte overført til Megafunneltrakten. Hvis det så ut som at materialet var for tykt og viskøs, ble det fortynnet med fysiologisk saltvann. Fortynningen ble gjort for å forhindre at det oppstod en dårlig spredning over til objektglasset av sentrifugalkreftene. Mengde prøvemateriale som ble overført med plastpipette var på omtrent 1,0 mL. Før overføring til Megafunnel ble gjort, var allerede ID- merkede objektglass klipset fast på Megafunnel- takten og plassert klar i den løse karusellen til sentrifugen. Når pasientmaterialet var overført til trakten så ble denne korket igjen. Når karusellen var fylt med Megafunnel- trakter som inneholdt de prøvene som skulle prepareres, så ble karusellen plassert i sentrifugen og sentrifugert ved 1200 RPM i 5 minutter.

I dette prosjektet ble alle pasientprøvene forsøkt preparert mest mulig samtidig for å kunne se på hvordan degenerering i utstryk/preparater som følge av lengre lufttørking virker inn på både cellenes evne til å ta til seg farge, men også hvor mye dette har å si for kvaliteten som oppnås. På grunn av at det var mottatt lite pasientmateriale, ble det preparert materiale i to omganger i stedet for én, slik at det ble to store batcher med utstryk/preparater til farging. Oppbevaring av ferdige direkteutstryk og preparat før farging, ble gjort i et mørkt skap hvor det var jevne temperaturforhold.

2.2 Farging

Det ble testet ut fire ulike nye fargeprotokoller samt hurtigfarge, som alle ble sammenlignet opp mot hverandre, men også opp mot det resultat som oppnås ved bruk av dagens fargeprotokoll for May- Grünwald- Giemsa ved seksjonen. Alle de ulike fargeprotokollene fikk henholdsvis både et megafunnelpreparat og ett direkteutstryk fra samme pasientmateriale. Farging skulle skje i løpet av fem påfølgende dager, fra mandag til fredag. Dette ble gjort for både å kunne få med mest mulig av fargeendringene som skjedde ved farging med avdelingens protokoll, men også for å sammenligne dennes fargekvalitet opp mot både hurtigfarging og de fire nye protokollene, henholdsvis Giemsa 15 minutter, Giemsa 20 minutter, Giemsa- farging med forandret pH og en ny May- Grünwald- Giemsa fargeprotokoll.

2.2.1 Forprøving

Det ble sendt ut forespørsel til andre sykehus om å få tilsendt deres preparerings- og fargeprosedyrer for serøse væsker. De mottatte prosedyrene (se vedlegg 1 til 6) ble deretter sett på, og det ble utført testfarging av både noen av disse protokollene som virket interessante men også av idéer hentet fra artikler om Romanowsky- fargeteori. Testfargingen ble gjort manuelt og i ståkar. Forprøvingen ble gjort for å kunne vurdere om trinn i protokollene var av interesse, og om det var noen ideer å hente til utarbeiding av en ny og forbedret May- Grünwald- Giemsa- fargeprotokoll. De trinnene som virket nyttige ble satt sammen til fargeprotokoller for videre uttesting, og det var disse som ble programmert inn for automatisert farging på fargemaskinen Gemeni AS. Oversikt over dagens fargeprotokoll ved seksjon for cytologi, samt de ulike protokollene som ble satt sammen og undersøkt i dette prosjektet er satt opp i tabellene under.

Protokoll 1: Seksjonens nåværende MGG fargeprotokoll (CYT):

Det ble laget nye farger for May- Grünwald- Giemsa to ganger i uken. Farger ble tillaget fredag ettermiddag slik at de var klare til bruk mandag morgen. Tirsdag ettermiddag ble det laget nye farger som var klar til bruk onsdag morgen, og som så ble brukt de to påfølgende dagene torsdag og fredag. Fargeløsningene ble filtrert på ettermiddagen både onsdag og torsdag før neste dags bruk. Avdelingens fargeprotokoll som har gjenbruk av May- Grünwald- og Giemsa- fargeløsninger er vist i tabell 1.

Tabell 1: Viser dagens fargeprotokoll for May- Grünwald- Giemsa (CYT), med både rekkefølge på fargeløsningene og tid preparatene står i de ulike karene.

Løsning	Tid
1. Metanol	15 minutter
2. May Grünwald	5 minutter
3. Rennende vann	1 minutt og 45 sekunder
4. Giemsa	15 minutter
5. Buffer bruksløsning	20 sekunder
6. Buffer bruksløsning	2 minutter

Protokoll 2: Hurtigfargemetoden Color Rapid (HF)

Fargene som er i bruk til hurtigfarging av preparater på seksjonen for diagnostikk, skiftes etter 4-5 dagers bruk, eller etter behov hvis de ser synlig forurenset ut. Ved utprøving av fargeprotokoll i dette prosjektet så ble det hovedsakelig benyttet nye eller ganske nye farger. Rekkefølgen på kar med løsninger/farge og tid preparatene fikk stå i disse er vist i tabell 2.

Tabell 2: Viser hurtigfargemetoden Color Rapids (HF) rekkefølge på kar med løsninger og tiden preparatene står i disse.

Løsning	Tid
1. Metanol	10 sekunder
2. Rødt fargebad	10 sekunder
3. Blått fargebad	20 sekunder
4. Skylling i rennende vann	Til vannet er klart

Felles for de påfølgende protokollene 3, 4 og 5 var at det ble utelatt rennende vann mellom fargekarene, og at fargene som ble benyttet til disse ble laget nye hver dag rett før fargingen ble gjennomført. Metanolfikseringstiden før fargingen ble også redusert fra 15 til 10 minutter.

Protokoll 3: Ny May- Grünwald- Giemsa (MGG) uten rennende springvann

Det ble satt inn et ekstra Giemsa- kar i protokollen for å hindre kontaminering fra de andre karene, og for å holde giemsakaret mest mulig rent og ufortynnet av fargeløsning fra May- Grünwald. Karet med springvann ble fjernet fordi springvann kan ha varierende pH og dermed ha innvirkning på ladning av cellekomponenter som det ønskes farget (se avsnitt 1.6). Det ble heller ikke funnet noe litteratur som begrunner bruken av dette. Ingen av de andre sykehusene som hadde tilsendt sine protokoller for MGG farging (se vedlegg 1 til 4) hadde skylling med springvann som et trinn mellom May- Grünwald- fargekaret og Giemsa- fargekaret. Tabell 3 viser sammensetningen av trinn med de ulike løsningene for den nye May- Grünwald- Giemsa- fargeprotokollen, samt tid preparatene stod i de ulike karene.

Tabell 3: Viser sammensetningen av den nye fargeprotokollen for May- Grünwald- Giemsa (ny MGG) med både rekkefølge på fargefasettene og tid preparatene stod i de ulike løsningsene

Løsning	Tid
1. Metanol	10 minutter
2. May Grünwald	5 minutter
3. Giemsa	5 minutter
4. Giemsa	10 minutter
5. Buffer	20 sekunder
6. Buffer	2 minutter 40 sekunder

Protokoll 4: Giemsa 15 minutter (G15)

I fargeprotokollen mottatt fra sykehuset i Skien (se vedlegg 2) stod det at det der bare ble farget med Giemsa- farge på grunnlag av en anbefaling gjort av den nederlandske patologen Derk Berends. Patologen Berends mener at bare Giemsa- farging gir like godt resultat som May-Grünwald- Giemsa. Fargeprotokollen mottatt fra Skien, sammen med at Giemsa alene er nevnt som et alternativ til MGG i litteratur (se avsnitt 1.6), gjorde at denne fargemetoden ble ønsket å teste ut. I litteratur sto det at preparater skal fikseres i 10 minutter i metanol, noe som derfor ble gjort, samt at fargeløsninger og skyllekar skulle inneholde/tillages med buffer med pH 6,8. Det ble pH derfor målt hver dag i bruksløsning av buffer ved tillaging av Giemsa-farge for å sjekke om den var korrekt. Tabell 4 viser rekkefølgen på løsninger og tid preparatene var i hvert kar for denne Giemsa-fargingen.

Tabell 4: Viser tid preparat var i de ulike karene ved Giemsa 15 minutter (G15)

Løsning	Tid
1. Metanol	10 minutter
3. Giemsa	5 minutter
4. Giemsa	10 minutter
5. Buffer	20 sekunder
6. Buffer	2 minutter 40 sekunder

Protokoll 5: Giemsa 20 minutter (G20)

I fravær av May Grünwald, som det ble antatt at er med å gi en god kontrast, så ble det ønsket å se om det var behov for å kompensere for fraværet av denne med å øke Giemsa- fargetiden til 20 minutter. Tabell 5 viser hvordan rekkefølgen på trinnene var og hvor lenge preparatene stod i de ulike karene med løsninger for denne fargeprotokollen.

Tabell 5: Viser rekkefølgen på løsninger og tiden preparatene var i de ulike karene i for Giemsa 20 minutter (G20)

Løsning	Tid
1. Metanol	10 minutter
3. Giemsa	5 minutter
4. Giemsa	15 minutter
5. Buffer	20 sekunder
6. Buffer	2 minutter 40 sekunder

2.2.2 Fargemaskin

Fargemaskinen Gemeni AS ble programmert med de ulike fargeprotokollene slik at farging med disse kunne foregå samtidig, og slik at preparatene fikk nøyaktig den samme og korrekte fargetiden som de skulle ha i de ulike protokollene. Utstryk og preparat som ble farget med avdelingens protokoll, ble farget samtidig med avdelingens ordinære rutinefarging av preparater til diagnostisering.

2.2.3 Tillaging av farger og buffer

Buffer: Sørensens Fosfatbuffer. Leverandør: Norsk Medisinaldepot. Oppgitt pH 6,8.

Blandingsforhold: 5% konsentrert buffer blandes med 95% sterilt vann.

May Grünwald. Leverandør: VWR international, produktnr.: 1.01424.2500

Blandingsforhold: 50% fargeløsning blandes med 50% buffer bruksløsning.

Giemsa. Leverandør: VWR international, produktnr.: 1.009204.2500

Blandingsforhold: 10% fargeløsning blandes med 90% buffer bruksløsning.

2.2.4 Øvrige farger og løsninger

Metanol. Leverandør: VWR international, produktnr.: 1.0609.2500.

Color Rapid. Produsent Lucerna chem. Inneholder tre beholdere:

Color Rapid Fixerløsning (100 % metanol)

Color Rapid A (rød fargeløsning), oppgitt pH 6,8 (vedlegg 5)

Color Rapid B (blå fargeløsning), oppgitt pH 6,8 (vedlegg 6)

2.2.5 Måling av pH

Det ble målt pH i både springvann, buffer- bruksløsning og i fargekar til den nåværende brukte MGG-fargeprotokollen hver dag. Dette ble gjort for å se om spesielt pH i fargeløsninger som er i bruk over flere dager endrer seg, og om dette dermed også kanskje kunne være med å forklare eventuelt forskjellig oppnådd fargerresultat fra dag til dag. For den nye MGG- fargeprotokollen, hurtigfargen og Giemsa- fargeprotokollene så ble det også målt pH i løsninger, men ikke hver dag. I MGG og Giemsa ble det målt pH to av dagene, mens pH til hurtigfargen ble målt på en av dagene. Avlesninger med avdelingens pH- meter ble også sjekket opp mot avlesninger gjort på et pH- meter fra bioingeniørutdanningen for å sjekke om verdiene avlest på avdelingen samsvarte med resultatet fra dette.

2.2.6 Endring av pH i fargebad og buffer

Det ble testet ut hvilken innvirkning bruk av en buffer med nøyaktig pH 6,8, har på fargerresultatet, dersom både May- Grünwald- fargeløsning, Giemsa- fargeløsning og de påfølgende buffekarene etter farging blir laget med denne. Dette ble gjort fordi litteratur (se avsnitt 1.6.1) anbefaler bruk av bufferløsning med pH 6.8. Tillagingen av buffer ble gjort ved å tilsette to dråper 37 % konsentrert saltsyre (HCl) til én liter med ferdig tillaget bufferløsning som hadde en pH på 7,04-7,06 før tilsats. Bufferløsningen fikk etter tilsettingen av HCl en målt pH på 6,78.

2.3 Vurdering

Fargekvaliteten skulle utføres og vurderes i samarbeid mellom bachelorstudentene og de faglige veilederne Maj Liv Eide, som er seksjonsleder, og cytodiagnostiker Camilla Skånøy Buan. Kriterier som ble brukt til fargebedømmingen var hentet fra *Staining Criteria Handbook* (“NEQMANMA003- Special Stain Criteria Handbook Non Gynae Edition 3 Jan 2015.Pdf,” n.d.). I denne håndboken blir fargekvaliteten blant annet gradert etter hvor godt kjernen og tilhørende cytoplasmatiske komponenter blir farget, og hvor godt man klarte å skille disse fra hverandre, samt fargeintensitet og kjernedetaljer. I tillegg til denne håndboken, så ble kvaliteten på Romanowsky- fargingen også bedømt ut i fra om den oppfyller krav for god farging, som står beskrevet i artikkelen *Guidelines for May-Grünwald-Giemsa staining in haematology and non-gynaecological cytopathology* (Piaton et al. 2016). I denne artikkelen bedømmes kvalitet på fargerresultat ut i fra om farge på erytrocytter og leukocyter har klart å bli korrekt som følge av at det var rette pH- forhold under fargeprosessen, se tabell 2.3.i. Det er også viktig for avdelingen at det oppnådde fargerresultatet skulle kunne klare å differensiere best mulig celler i 3D- grupper, så dette ble også tatt med i bedømmingen. Tabell 2.3.ii viser oppsummert og oversatt til norsk hva slags kriterier fargerresultatet av preparatet eller utstryket må oppfylle ut i fra *Staining Criteria Handbook* for at det skulle kunne tildeles de ulike poengscorene.

Tabell 2.3i: Viser hvordan bedømming av fargekvalitet ble gjort ut i fra artikkelen “*Guidelines for May-Grünwald-Giemsa staining in haematology and non-gynaecological cytopathology*”

	Erytrocytter	Leukocyter	Leukocytt- cytoplasma
Farge	Orangerosa - rett pH Sterk rosa - for lav pH Grønn/blå - for høy pH	Neutrofil: Lilla granula Eosinofil: Rød-orange granula	Bør være nesten transparent med klart definerte granula

Tabell 2.3iii: Viser oppsummert og oversatt til norsk hva som er forventet i Staining Criteria Handbook av fargerresultatene for å oppnå de ulike poengscorene (på mellom 5 til 2) for fargekvalitet.

	5	4	3	2
Kjerne	Fargeintensitet viser tydelige kromatindetaljer	Fargeintensitet viser tydelige kromatindetaljer	Mulig endringer er skjedd på fargeintensitet: - Svak farge - Overfarget Detaljer i de fleste kjernene er synliggjort	Fargeintensitet og endring i farge gjør kjernedetaljer utydelige
Kjerner detaljer vs. ikke - nukleære detaljer	Farge, balanse av denne og intensitet viser tydelig forskjell	Farge, balanse av denne og intensitet: - Må gi et godt skille - Må ikke være konsistent over hele preparatet	Endringer i fargeintensitet har skjedd i både kjerner og andre komponenter	Farge, balanse av denne og intensitet, samt bakgrunnsfarge gjør en <u>tydelig undersøkelse av preparatet umulig</u>
Cytoplasma	Passende fargespektrum	Passende fargespektrum, men kan mangle i noen områder	Ikke fullstendig fargespekter	Farge og fargeintensitet gjør det ikke mulig å visualisere hverken trekk i cytoplasma eller kjerne
Inntrykk av hele preparatet	<ul style="list-style-type: none"> - Jevn farge over det hele - Minimal bakgrunnsfarge (u/ fargestoffer el. Utfelling) - Ingen uregelmessigheter 	<ul style="list-style-type: none"> - Bakgrunnsfarge kan være svak eller kraftig, men må ikke gjøre detaljer uklare - Detaljer synlig hos flesteparten av cellene - Noe ujevn farging tillatt 	<ul style="list-style-type: none"> - Noe bakgrunnsfarging - Kontrastfarge kan være for svak eller intens - Behøver ikke jevn farge over hele preparatet - Kan være noen irregulariteter 	<u>Ujevn og flekket farging medfører:</u> <u>tap av detaljer vist kjerner og Cytoplasma over hele preparatet</u>
Oppsummert	<u>Full visualisering av celledetalia</u> <ul style="list-style-type: none"> - Utmerket farging av kjerne og cytoplasmatiske komponenter 	<u>God visualisering pga. god farging av kjerne og cytoplasmatiske komponenter</u> <ul style="list-style-type: none"> - Helhetlig preparering og farging - <u>Tap av farge eller kvalitet er ikke avgjørende for identifikasjon av de helhetlige cellulære detaljene</u> 	<u>Tilstrekkelig farging og passende preparering som gjør visualisering av kjerner og cytoplasmatiske trekk mulig</u>	<u>Utydelig visualisering – kan ikke gjøre en tydelig undersøkelse</u> <u>Farging og /el. preparering medfører tap av detaljer vist i kjerne og cytoplasma</u> Ikke passende preparering → kvaliteten er ikke optimal og gjør cellulære detaljer utydelig

3 Resultater

Det var vanskelig å få til å ta gode nok bilder av fargede utstryk eller preparat sett i mikroskop, slik at en klarer å få med detaljer som ses tydelig i okular, til å også vises på bildet. Det ble forsøkt å ta bilde både med mikroskopkamera, bilde via digital patologi og med ulike mobilkamera gjennom okular på mikroskopet. Det var fotografering gjennom okular med mobilkamera som var den metoden som klarte å gjengi mest detaljer, både når det gjelder å gjengi nærmest lik reell farge på celler slik som de ses i mikroskopet, men også når det gjelder kromatindetaljer i cellekjernene. Bildene som sees på utskrift vil nok vise enda mindre detaljer enn de digitale bildene. Bildene vist i figurene til oppgaven klarer derfor ikke å synliggjøre fullstendig det samme detaljnivået som ses i mikroskop. Farger og detaljer som beskrives i figurtekst ved bedømming av fargekvalitet, vil derfor ikke alltid vises like godt på bildene

3.1 Preparering

Pasientprøvene som ble brukt i denne oppgaven, er alle serøse væsker fra pleura. Det var lite materiale sendt inn til avdelingen i den perioden hvor preparering og farging skulle gjennomføres, men det ble i alt lagd preparater og manuelle utstryk fra åtte ulike pasientprøver. Alle disse prøvene ble anonymisert og gitt et unikt forskningsnummer, fra SFA1 til og med SFA8. SFA1 ble kun brukt til forprøving av fargeteori, og til å teste ut andre sykehus sine fargeprotokoller. Prøvetakningsdato, mottaksdato på avdelingen, prepareringsdato og utseende på prøven, samt hvilken fargeprotokoll som ble testet med materiale fra prøven er listet opp i tabell 3.1i. Forkortelse for de ulike fargeprotokollene som det ble farget med er henholdsvis CYT, MGG, HF, G15 og G20. Hvorav CYT betyr at materialet er farget med avdelingens nåværende May- Grünwald- Giemsa- fargeprotokoll, MGG betyr at materiale er farget med ny May- Grünwald -Giemsa- fargeprotokoll, HF betyr at materiale er farget med hurtigfargen Color Rapid, mens Giemsa betyr at materialet er farget med Giemsa- fargeløsning i enten 15 minutter derav G15 eller i 20 minutter derav G20.

Tabell 3.1i: Viser prøvenummer, prøvetakingsdato, mottaksdato, prepareringsdato, utseende på prøven samt fargeprotokoller som har blitt testet ut med materiale fra dette prøvenummeret.

ID Prøve- nummer	Prøvetaking- dato	Mottaks- dato	Dato for preparering	Utseende prøve	Gjennomførte Farge- protokoller
SFA2-19	03.04.19	04.04.19	08.04.19	Svakt uklar, gul	CYT, MGG, HF, G15, G20 + MGG og G15 med endret pH 6,78
SFA3-19	22.03.19	25.03.19	04.04.19	Klar, gul oransje	CYT, MGG, HF, G15, G20
SFA4-19			04.04.19	Brunrød, veldig blodig	Viste seg til å være uegnet for bedømming av fargekvalitet i dette prosjektet
SFA5-19	05.04.19	08.04.19	08.04.19	Svakt uklar, gul	CYT, MGG, HF, G15, G20 + MGG og G15 med endret pH6,78
SFA6-19	30.03.19	31.03.19	08.04.19	oransje	CYT, MGG, HF, G15, G20
SFA7-19	02.04.19	03.04.19	08.04.19	Rød- oransje	CYT, MGG, HF, G15, G20 + MGG og G15 med endret pH 6,78
SFA8-19	10.04.19	11.04.19	11.04.19	Gul	MGG med endret pH 6,78

Det ble lagd både et manuelt utstryk og et megafunnelpreparat fra de ulike pasientprøvene for hver fargeprotokoll som skulle testes ut. Noen av pasientprøvene virket viskøse, henholdsvis prøve SFA6-19 og prøve SFA7-19, og disse ble derfor fortynnet med fysiologisk saltvann før preparering. Fortynningen ble bare gjort på den delen av prøvematerialet som ble preparert med Megafunnel, mens den delen av materialet som det ble laget manuelt utstryk av ble preparert ufortynnet.

Ved vurdering av fargekvalitet så ble det valgt å se kun på preparat laget med Megafunnel, siden de fleste av direkteutstrykene viste et for lavt celleinnhold. Pasientprøve SFA6 var en veldig cellerik prøve og til vurdering av denne prøven, så var direkteutstryket faktisk noe bedre, siden det ikke ble med like mange degenererte celler som det man fikk med i Megafunnel- preparatet. Men siden det gikk an å vurdere Megafunnel- preparatet så ble dette gjort, slik at alle preparater som ble vurdert, ble vurdert ut ifra at de hadde en lik prepareringsmetode.

I øverste del av alle Megafunnel- preparatene så ble det fått til et monolag med celler, noe som er det mest gunstige for Romanowsky- farging, mens det i den nederste delen på en del av preparatene hadde samlet seg et overskudd med materiale. Overskuddsmaterialet i den nedre delen gjorde at det oppstod en bakgrunnsfarge, som medførte at cellebildet fikk et mer blålig preg i forhold til den øverste delen på preparatet, se figur 3.1. Ved vurdering av fargekvalitet ble det derfor kun sett på den øverste delen av Megafunnel- preparatet, der hvor fargingen var blitt mer riktig på grunn av at tykkelsen på prøvematerialet påført objektglasset hadde blitt mest korrekt.



Figur 3.1: Viser et Megafunnel- preparat, hvor det er oppnådd et monolag i den øverste delen av preparatet. I den nedre delen av preparatet, hvor det ses en sterkere blåfarge, har det blitt påført et overskudd med materiale, noe som har bidratt til at det har skjedd en bakgrunnsfarging.

3.1.1 Måling av pH

Det ble målt pH i de ulike løsningene som er i bruk i de ulike fargeprotokollene, se tabell 3.1ii. Avlesningen av pH i de fargekarene som ble brukt over flere dager i det som er seksjonens nåværende fargeprotokoll ble særlig fulgt opp. Her ble det observert en endring av pH i fargekarene ved at pH ble noe lavere etter hvert som fargene ble brukt over flere dager. Det ble også sett at det springvannet som brukes til å skylle med mellom fargekaret med May- Grünwald og fargekaret med Giemsa, har en ganske høy pH på hele 8,0, noe som også innvirker på fargekvaliteten.

Tabell 3.1ii: Viser pH- målinger utført i løpet av testperioden, i blant annet fargeløsninger, springvann, buffer- stamløsning og buffer- bruksløsning, samt målinger utført med et av utdanningens pH-meter for å sjekke hvor godt målingene oppnådd med dette samsvarer med målinger gjort på avdelingen.

	Lørdag	Mandag	Tirsdag	Onsdag	Torsdag	Fredag
pH May- Grünwald Måling med et annet pH-meter*	8,14	8,06	7,92	7,92	7,79 7,77*	7,80
pH Giemsa Måling med et annet pH-meter*	7,04	7,02	6,99	7,06	6,99 6,88*	7,04
pH bruksløsning buffer Måling med et annet pH-meter*	7,10	7,06	7,03	7,05	7,05 6,90*	7,04
pH i springvann Måling med et annet pH-meter*	8,10	8,10	8,21	8,06	7,95 7,73*	7,97
pH tilsatt 2 dråper 37% HCl Måling med et annet pH-meter*					6,78 6,74*	
pH destillert vann For tillaging buffer bruksløsning		8,47				
pH for Buffer stamløsning Oppgitt pH 6,8		6,88				

3.2 Den nåværende fargeprotokollen for May- Grünwald Giemsa

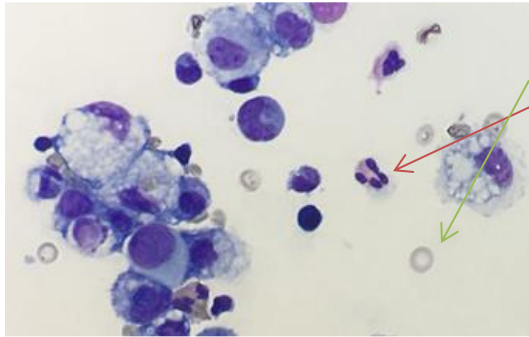
Hensikten med dette prosjektet var både å lage og å teste ut en ny fargeprotokoll for farging av serøse væsker med May- Grünwald- Giemsa, men også å teste ut hvordan resultatet blir dersom materialet bare farges med Giemsa- fargeløsning. For å kunne vurdere de nye fargeprotokollenes fargekvalitet, så valgte vi å sammenligne disse sine oppnådde fargerresultat opp mot den fargekvaliteten som allerede oppnås med den nåværende fargeprotokollen for May- Grünwald- Giemsa ved seksjon for cytologi. Dette for å finne ut om noen av de nye fargeprotokollene faktisk gir et forbedret resultat enn den nåværende.

I tillegg til å sammenligne resultat på fargekvaliteten, så ønsket vi også å undersøke hvor mye det hadde å si for kvaliteten og fargerresultatet, at avdelingen lager nye farger kun to dager i uken, i stedet for at nye farger lages hver dag, slik som det anbefales i litteratur. I litteratur blir det anbefalt at alle bruksløsningene med farger til May- Grünwald- Giemsa lages nye hver dag rett før de skal brukes (se avsnitt 1.6). På det nåværende tidspunkt lages bruksløsninger for May- Grünwald og Giemsa på fredag ettermiddag, for så å brukes både mandag og tirsdag. Nye fargeløsninger lages så på tirsdag ettermiddag, og brukes deretter både onsdag, torsdag og fredag. Fargeløsningene filtreres etter hver dags bruk over i en mørk glassflaske, som så oppbevares i et mørkt skap til neste dag. Presipitatdannelsen som filtreres vekk fra Giemsa- fargeløsningen nevnes derfor i tekst før de ulike bildene fra resultat ved bruk av den nåværende MGG fargeprotokollen, fordi dette er noe som muligens kan virke inn på fargekvaliteten. Presipitatet som filtreres vekk består av utfelte fargemolekyler av azur B og eosin Y som har dannet et kompleks med hverandre, og det vil derfor bli færre fargemolekyler i fargeløsningene desto lengre de står (se avsnitt 1.6.2).

For vurderingen av fargekvaliteten så ble det sett på hvor godt kjernen og tilhørende cytoplasmatiske komponenter var blitt farget, og hvor godt man klarte å skille disse fra hverandre, samt fargeintensitet og kjernedetaljer, slik som beskrevet i *Staining Criteria Handbook*. I tillegg ble kvalitet på fargerresultat bedømt ut fra om det var oppnådd korrekt farge på erythrocytter og leukocyttter, ut i fra kriterier som er listet i artikkelen *Guidelines for May- Grünwald-Giemsa staining in haematology and non-gynaecological cytopathology*. Detaljert beskrivelse av vurderingskriterier står det skrevet om i avsnitt 2.3.

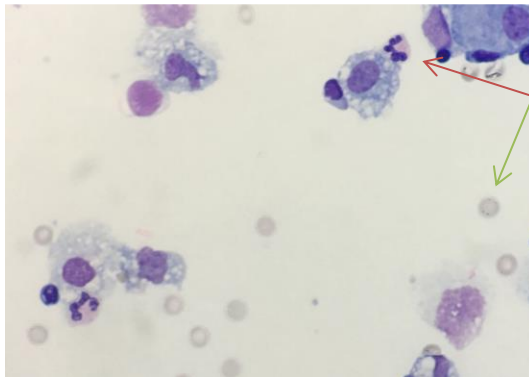
Bildene neste side, figur 1 til 5, viser hvordan preparater fra prøvemateriale med serøs væske tatt fra pleura hos en pasient (prøve SFA2-19), har blitt farget gjennom en hel uke, fra mandag til fredag. Av de totalt åtte ulike pasientprøvene til dette prosjektet, var det kun i pasientprøve SFA2-19, at det var mottatt nok mengde med prøvemateriale for å kunne lage både ett preparat og ett direktestryk som kunne farges med alle fargeprotokollene, til alle de fem ukedagene. SFA2 var også en av de ferskeste pasientprøvene i dette prosjektet. Resultat av farging av preparater fra dette pasientmaterialet er derfor blitt brukt for å vurdere om det er mulig å se en forskjell fra én dags bruk, i forhold til både etter to og tre dagers bruk av de samme fargeløsningene. Vi har gjort en fargekvalitets-vurdering for hver av de fem dages fargerresultat oppnådd på preparater laget fra pasientprøve SFA2. Vurdering av fargekvaliteten på hvert preparat står skrevet rett ved siden av figuren med bilde fra preparatet.

Hendelsesforløp for fargebandene: Fargene som ble brukt mandag, var nylagd og filtrert fredags ettermiddag, før de så ble tatt i bruk denne morgen. Dagen etter, på tirsdag, så ble de samme fargene igjen brukt, bare at disse var blitt filtrert på slutten av dagen før. Et tykt presipitat ble da filtrert vekk. Til onsdagens farging så ble det tatt i bruk nye farger som var blitt laget på tirsdags ettermiddag. Disse fargene ble så brukt igjen på torsdag etter å ha blitt filtrert på slutten av dagen før, hvor et tykt presipitat ble fjernet. Til fredagens farging så ble de samme fargene som på torsdag brukt enda en gang, bare at disse var filtrert torsdags ettermiddag. Et tykt presipitat ble også her fjernet.



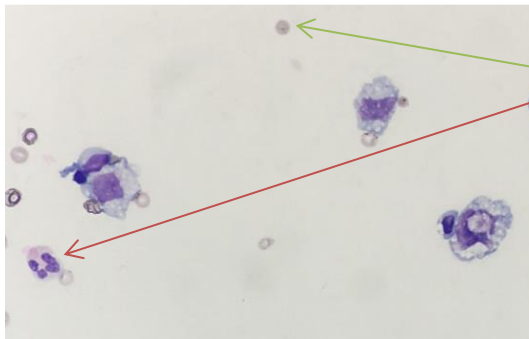
Figur 1: SFA2 - CYT dag 1, mandag.

Erytrocytter: I monolag- område er disse grårosa (se grønn pil)
Leukocyttter: Ser eosinofil, ikke noe godt skille mellom det nesten transparente cytoplasma og de røde granula (se rød pil)
Kromatindetaljer: skimtes t.o.m i lymfocytter, men lav kontrast.
 Kornene kommer ikke så tydelig frem
Farging av cytoplasma (skille): Lav kontrast mellom cytoplasmatiske komponenter
Helhetsinntrykk: Er lilla kjerner, men svak kontrast mellom kjerne og ikke-nukleære detaljer.



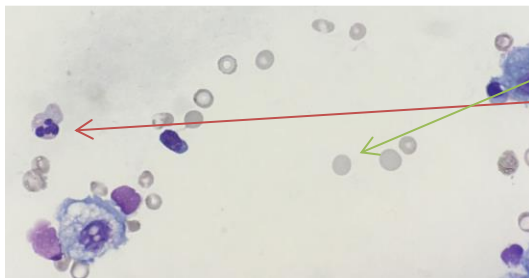
Figur 2: SFA2 - CYT dag 2, tirsdag.

Erytrocytter: I monolag- område er disse grårosa (se grønn pil)
Leukocyttter: Bedre skille (i forhold til resultat dagen før)mellom cytoplasma og kjerne t.o.m i lymfocytter. Fortsatt ikke noe godt skille mellom granula i eosinofile leukocyttter (se rød pil).
Kromatindetaljer: Noe bedre detaljer, lettere å se nukleoler
Farging av cytoplasma (skille): Mindre kraftig blåfarge på dette. Bedre skille mellom cytoplasma og kjerne.
Helhetsinntrykk: Er litt lysere lillafarge på kjerner, slik at flere detaljer blir synlig, samt at det er en bedre kontrast mellom kjerne og ikke nukleære detaljer fordi cytoplasma har blitt farget noe mindre blått. .



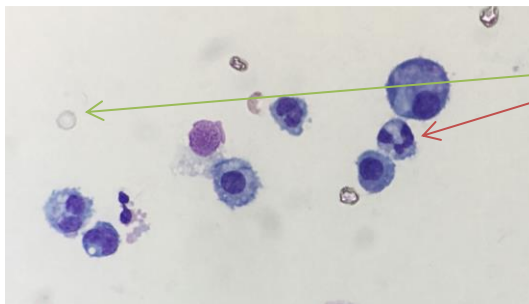
Figur 3: SFA2 - CYT dag 3, onsdag.

Erytrocytter: Svakt rødrosa (se grønn pil)
Leukocyttter: Degraderte. Kan se kromatin, men cytoplasmaet er utydelig (se rød pil)
Kromatindetaljer: Noe utydelige kromatindetaljer fordi cellene er mer degraderte. Kan skimte nukleoler
Farging av cytoplasma (skille): Greit visuelt skille mellom kjerne og cytoplasma i de cellene som er mest intakte
Helhetsinntrykk: Flere degraderte celler. Noe færre celler på preparatet i forhold til andre preparat fra samme prøve.



Figur 4: SFA2 - CYT dag 4, torsdag.

Erytrocytter: Grårød (se grønn pil)
Leukocyttter: Ikke noe særlig godt bevarte. Lite kromatindetaljer, og cytoplasma er transparent. Det er ikke noe tydelig skille mellom røde granula og cytoplasma i de eosinofile (se rød pil).
Kromatindetaljer: Noe utvisket,
Farging av cytoplasma (skille): Ikke så kraftig blåfarge på dette. Grei kontrast til kjerner.
Helhetsinntrykk: Flere degraderte celler.



Figur 5: SFA2 - CYT dag 5, fredag.

Erytrocytter: Svakt rosa (se grønn pil)
Leukocyttter: God skille mellom kjerne og cytoplasma. Ikke tydelige lilla granula i cytoplasma hos de nøytrofile (se rød pil)
Kromatindetaljer: Flere celler er uten gode kromatindetaljer. Bedre bevarte celler viser fortsatt godt med detaljer.
Farging av cytoplasma (skille): Greit skille, men mange celler er degenererte, så fargingens bærer preg av dette.
Helhetsinntrykk: Mange celler er degenererte.

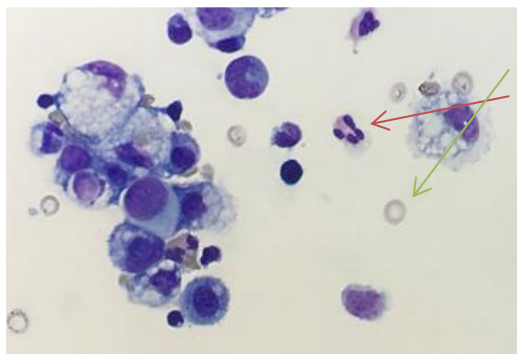
Det oppsummerte inntrykket etter uken med farging av preparater fra prøve SFA2 med den nåværende MGG fargeprotokollen til avdelingen, er at det ikke er en veldig tydelig forskjell å se mellom resultat oppnådd på de ulike ukedagene. Man kan se en svak fargeforskjell mellom den første dagens bruk av fargene, i forhold til neste dags bruk, og den fargeforskjellen som da ses, er at cellekjernene den første dagen har fått en mer blållilla fargetone enn den neste dagen. Dersom man ser på den neste dagen, tirsdag, i forhold til den første dagen, så er det her oppnådd en noe mer lillafarge i cellekjernene som er mer lik den lillafarge som man ønsker å oppnå i kjerner ved Romanowsky- farging. Man kan også observere dette på det preparatet som har blitt farget både på torsdag og på det som er blitt farget på fredag, men på begge disse har det også skjedd en form for celledegenerering noe som man må ta med i betraktningen. Den celledegenereringen som kunne observeres, ser ut til å øke for hver dag utover uken, og enkelte celletyper som leukocytter ser ut til å gå mer i oppløsning enn for eksempel mesotelceller. Hvordan cellene tok til seg farge på dag 1, mandag, i forhold til dag 5, fredag, var noe vanskelig å vurdere på grunn av denne celledegenereringen.

Tabell 3.2i viser pH-verdiene som ble målt hver dag etter farging i de ulike løsningene til seksjonens nåværende May- Grünwald- Giemsa fargeprotokoll. Ut i fra denne kan det ses at pH i fargeløsningene sank fra de nyttillaget til etter at de var brukt også den påfølgende dagen. Det ses også ut i fra denne tabellen at springvannet som brukes til å skylle mellom May- Grünwald- fargekaret og Giemsa- fargekaret i denne fargeprotokollen har en ganske høy pH, noe som også har en innvirkning på fargingen.

Tabell 3.2i viser målt pH på fargebadene etter en dags farging. Og man kan se at pH synker etter en dags bruk. Den siste dagen har man ingen synking i pH, her går pH i stedet svakt opp.

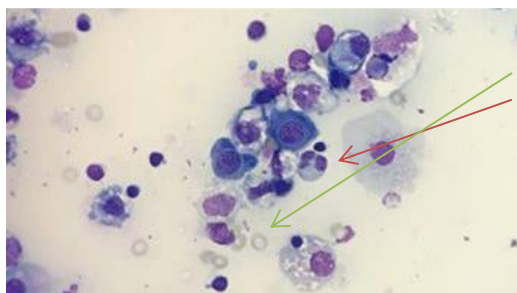
	Mandag	Tirsdag	Onsdag	Torsdag	Fredag
pH May- Grünwald	8,06	7,92	7,92	7,79	7,80
pH Giemsa	7,02	6,99	7,06	6,99	7,04
pH bruksløsning buffer	7,06	7,03	7,05	7,05	7,04
pH i springvann	8,1	8,21	8,06	7,95	7,97

Figurene under, fra 1 til 4: Preparatene er farget med seksjonens nåværende fargeprotokoll for May- Grünwald- Giemsa. Preparater er laget fra samme type prøvemateriale, pleura, men fra fire ulike pasienter, for å kunne se forskjell mellom prøver. Alle bildene er tatt av det første fargede preparatet fra pasientprøven, da dette viser minst degenerering av cellene. Vurdering av fargekvalitet som ble oppnådd står skrevet rett ved siden av figuren med bilde fra preparatet.



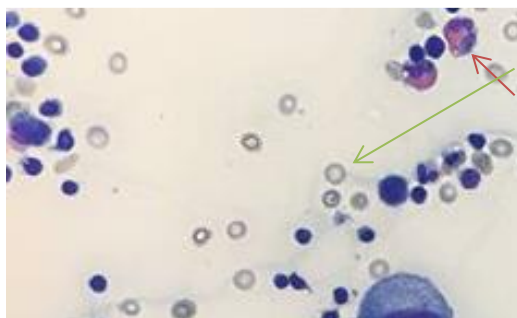
Figur 1: SFA2 - CYT

Erytrocytter: Grårosa (se grønn pil)
Leukocyt: Ser eosinofil, men ikke noe godt skille mellom det nesten transparente cytoplasma og de røde granula (se rød pil)
Kromatindetaljer: Kan skimtes t.o.m i lymfocytter, men lav kontrast. Granuleringen kommer ikke så tydelig frem
Farging av cytoplasma (skille): Lav kontrast mellom cytoplasmatiske komponenter
Helhetsinntrykk → score 3/4
 Er lilla kjerner, men svak kontrast mellom kjerne og ikke-nukleære detaljer



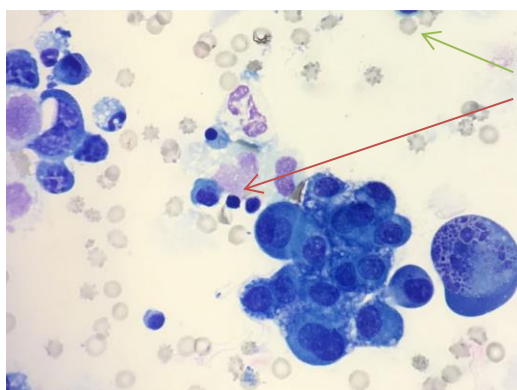
Figur 2: SFA3 - CYT

Erytrocytter: Rosabeige (se grønn pil)
Leukocyt: Eosinofile har tydelige røde granula, og kjernedetaljer. Lymfocytter har blålig transparent cytoplasma. (se rød pil)
Kromatindetaljer: Er synlig, men noe utvasket/slørete
Farging av cytoplasma (skille): Mesotel har litt utydelige grenser mellom kjerne og cytoplasma.
Helhetsinntrykk → score 3
 Blassere farge. Noe dårlig bevarte celler



Figur 3: SFA5 - CYT

Erytrocytter: Gråbeige (se grønn pil)
Leukocyt: Eosinofile har tydelige røde granula i et ellers blålig transparent cytoplasma (se rød pil)
Kromatindetaljer: Tydelige men noe utvasket/slørete i fargen. Kaldt skjær på lillafargen, noe støvete
Farging av cytoplasma (skille): Tydelig skille i forhold til kjerner, fargesjattering er noe blass
Helhetsinntrykk: → score 3
 Grei nok, litt blass og slørete farging.



Figur 4: SFA6 - CYT

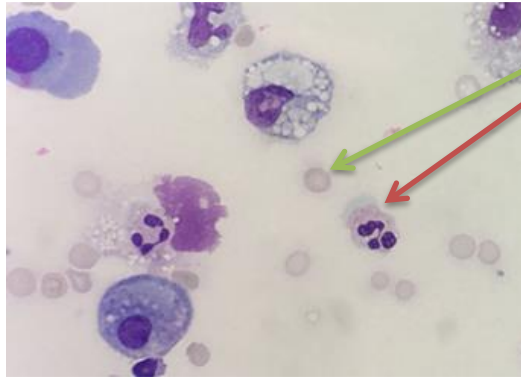
Erytrocytter: Kald brunfarge (se grønn pil)
Leukocyt: Finner ikke godt nok bevarte granulocytter til å bedømme. Lymfocytene sine kjerner er veldig mørkt farget, men litt lyst cytoplasma kan ses rundt noen. Ingen kjernedetaljer. (se rød pil)
Kromatindetaljer: Ser disse, men nukleoler må man anstrenge seg litt for å klare og se.
Farging av cytoplasma (skille): For mørk blå farge på cytoplasma som skaper en noe dårligere kontrast til den lilla kjernen
 Enkelte plasser er det utydelig skille mellom kjerne og cytoplasma
Helhetsinntrykk: → score 3
 "Blått"- og slørete. På 40x så ser mesotelcellen nesten helt blå ut

Oppnådd score for denne fargeprotokollen er 3

Helthetlig inntrykk: Scoren på fargekvaliteten er satt ut i fra krav som er listet opp i *Staining Criteria Handbook*. Dersom man ser på hvordan cellebildet opptrer generelt, så har cellene et litt slørete og uklart preg. Erytrocyttene er mer grårosa, i stedet for den ønskelige rosaoransje-fargen. Man kan tydelig skille mellom de ulike cellulære komponentene som kjerne og cytoplasma, men det er et skille som kunne ha vært enda tydeligere. Kjerner detaljene kan ses, men kunne ha vært bedre. Kjerne- og cytoplasma-detalljer kommer frem, men cellene har et noe mer ullent preg som kan gi inntrykk av at de er noe lettere degenererte.

3.3 Resultat av farging med ny May Grünwald Giemsa fargeprotokoll

Figurene neste side, fra figur 1 til 4, viser preparater laget fra det samme prøvematerialet pleura, men fra fire ulike pasienter, for å vise forskjell mellom prøver. Alle bildene er tatt av det første fargede preparatet fra pasientprøven, da dette viser minst denaturering av cellene. Preparatene er farget med ny fargeprotokoll for May- Grünwald- Giemsa. Vurdering av fargekvalitet som ble oppnådd står skrevet rett ved siden av figuren med bilde fra preparatet.



Figur 1: SFA2 - MGG

Erytrocytt: Svakt røddrosa (se grønn pil)

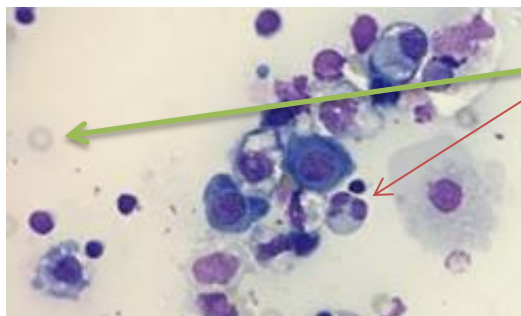
Leukocytt: Det ses lilla granula i cytoplasma hos nøytrofile granulocytt. Kromatindetaljer kan også ses i den lappedelte kjernen (se rød pil)

Mesotel: Tydelig avgrensning mellom kjerne og cytoplasma, men også mellom cytoplasma og bakgrunn.

Klarer å få frem ulike fargeoverganger i cytoplasma

Inntrykk: → score 4 (klar)

Cellene er tydelige og klare. Man har oppnådd en god kontrast mellom de ulike cellekomponentene. Kjerner detaljer som nukleoler og kromatin kommer tydeligere frem.



Figur 2: SFA3 - MGG

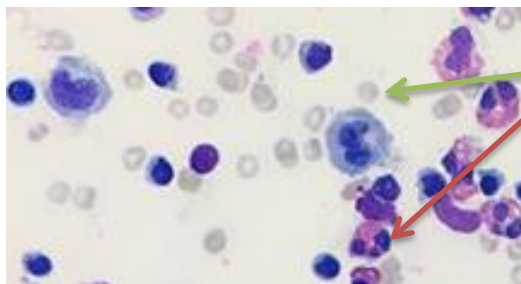
Erytrocytt: Røddoransje (se grønn pil)

Leukocytt: Nøytorfil granulocyt har blålig transparent cytoplasma med rød lilla granula (se rød pil)

Mesotel: Tydelig avgrensning mellom kjerne og cytoplasma, men også mellom cytoplasma og bakgrunn. Klarer å få frem ulike fargeoverganger i cytoplasma

Inntrykk: → score 4 (klar)

Kromatindetaljer er veldig tydelig, og allerede på 20X kan nukleoler ses. Veldig detaljert cytoplasma. Bredt fargespekter.



Figur 3: SFA5 - MGG

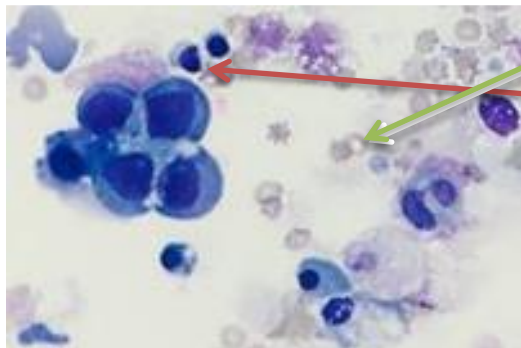
Erytrocytt: Burgunderrøde (se grønn pil)

Leukocytt: Ser lilla granula i nøytrofile granulocytt og røde granula i de eosinofile. (se rød pil)

Mesotel: Selv om de viser tegn på degenerering, så synes cytoplasmatiske komponenter og fargeoverganger godt.

Inntrykk: → score 4 (klart å farge godt et noe degenerert materiale).

Materialet er noe degenerert. Kromatindetaljer og nukleoler kommer veldig godt frem.



Figur 4: SFA6 - MGG

Erytrocytt: Røddrosa (se grønn pil)

Leukocytt: Vanskelig å finne granulocytt, men det ses mange lymfocytter. De lymfocytene som er intakte kan det ses litt cytoplasma rund. Kjernen er farget veldig mørk på mange av dem, og kromatindetaljer er vanskelig å se. (se rød pil)

Mesotel: De best bevarte cellene viser godt cytoplasmatiske komponenter og fargeoverganger

Inntrykk: → score 4

Materialet er noe degenerert, men til tross for det kommer kromatindetaljer og nukleoler veldig godt frem.

Oppnådd score for denne fargeprotokollen er 4

Oppsummert inntrykket når man ser på hvordan visualiseringen av cellebildet ble generelt, så ble erytrocyttene farget mye mer lik den korrekte rosaoransje- fargen som er den ønskelige. Det ble også oppnådd en mer tydelig og klar lillafarge på cellekjernene, samt at kromatindetaljer og eventuelle nukleoler i disse kom tydeligere frem. Cellene i sin helhet i forhold til bakgrunnen

kom skarpere frem. Cytoplasmaet i cellene viser mye detaljer og man ser et tydelig skille mellom dettes membran og de ytre omgivelsene. Den oppnådde scoren for ny May- Grünwald- Giemsa-fargeprotokoll ble derfor 4.

Tabell 3.3i viser resultat av pH- målinger i de ulike løsningene til fargeprotokollen. Det ble bare gjort pH- målinger til denne protokollen på to av dagene i uken hvor fargingen ble gjennomført siden det ble laget nye løsninger hver dag, men det kunne ses ved begge dagene hvor dette ble gjort at pH i løsningene ligger over den ønskelige pH på 6,8 som er anbefalt i litteratur.

Tabellen 3.3i: Viser målt pH i både i fargeløsninger og i buffer-bruksløsningen som ble brukt til å lage både fargeløsninger og skyllekarene etter farging. Alle de målte verdiene ligger over den anbefalte pH på 6,8 i fra litteratur.

	Tirsdag	Onsdag
pH May Grünwald	8,18	8,17
pH Giemsa	7,03	7,07
pH Bruksløsning buffer	7,03	7,06

3.4 Giemsa farging

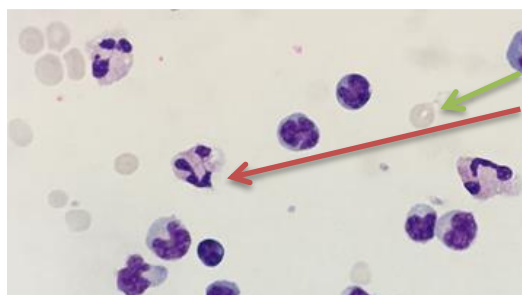
3.4.1 Giemsa 15 min

Siden både litteratur (se avsnitt 1.6) og sykehuset i Skien mener at Giemsa farging uten bruk av May- Grünwald- farging først, gir like godt resultat som May- Grünwald- Giemsa, så ble dette også testet ut. Serøs væske tatt fra pleura, fra fire ulike pasientprøver, henholdsvis SFA2, SFA3, SFA5 og SFA6, ble derfor preparert og forsøkt farget med bare Giemsa- fargeløsning.

Sammensetning av trinn og tid preparatene står i kar for denne fargeprotokollen er vist i metodedel under avsnitt 2.2, i protokoll 4.

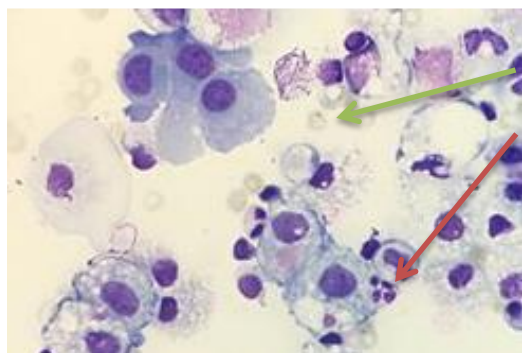
Figurene under, figur 1 til 4, viser preparater laget fra det samme prøvematerialet pleura, men fra fire ulike pasienter, for å vise forskjell mellom prøver. Alle bildene er tatt av det første fargede preparatet fra pasientprøven, da dette viser minst denaturering av cellene.

Preparatene er farget med Giemsa 15 minutter. Vurdering av fargekvalitet som ble oppnådd står skrevet rett ved siden av figuren med bilde fra preparatet.



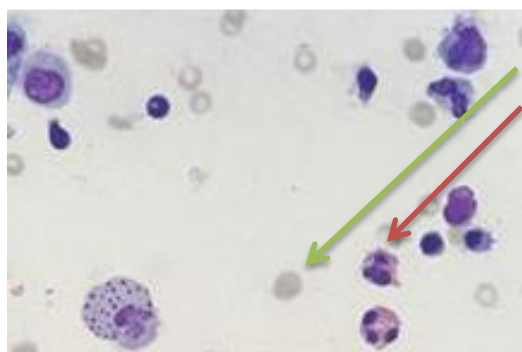
Figur 1: SFA2 - G15

Erytrocytter: Svakt rosaoransje, (se grønn pil)
Leukocytter: Klarer å se svakt de lilla granula i cytoplasma hos nøytrofile. (se rød pil)
Mesotel: Alle detaljer i kjerne og fargesjatteringer i cytoplasma kommer godt frem
Inntrykk: → score 4
 Kjernene er klar lilla. Kromatindetaljer og nukleoler kommer godt frem. Noe flatere fargeinntrykk i forhold til MGG



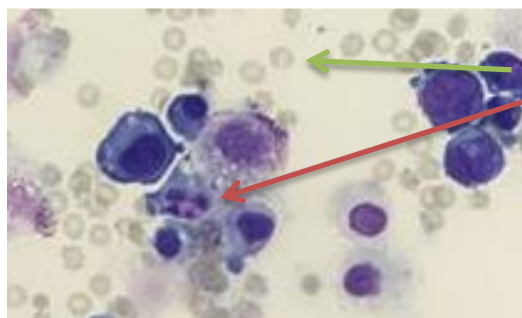
Figur 2: SFA3 - G15.

Erytrocytter: Rødrosa, veldig svakt farget en del plasser (se grønn pil)
Leukocytter: Til tross for mye degenerering, kan lilla granula i nøytrofile ses. Transparent cytoplasma kan også skimtes (se rød pil)
Mesotel: Alle detaljer i kjerne og fargesjatteringer i cytoplasma kommer godt frem
Inntrykk: → score 4
 Klarer å se kromatindetaljer veldig godt, nukleoler kan ses allerede på 20X.



Figur 3: SFA5 - G15

Erytrocytter: Svakt rødrosa (se grønn pil)
Leukocytter: Klarer å se de røde granula i cytoplasma hos eosinofile granulocyttene. Transparent cytoplasma kan også skimtes. (se rød pil).
Mesotel: Alle detaljer i kjerne og fargesjatteringer i cytoplasma kommer godt frem
Inntrykk: → score 4
 Kjernene er en tydelig lilla. Kromatindetaljer og nukleoler kommer godt frem. Fargespekter på de ulike cytoplasma er synlig. Det ses tegn på degenerering hos noen av cellene.



Figur 4: SFA6 - G15

Erytrocytter: Svakt rødbeige (se grønn pil)
Leukocytter: Disse bærer preg av degenerering og detaljer på cytoplasma blir derfor uklart. (se rød pil)
Mesotel: Alle detaljer i kjerne og fargesjatteringer i cytoplasma kommer godt frem på bevarte celler
Inntrykk: → score 4
 Tydelige kromatindetaljer, og det kan observeres nukleoler allerede på 20x. Tydelig skille mellom kjerne og cytoplasma. Mye cellerester i bakgrunnen

Oppnådd score for denne fargeprotokollen er 4

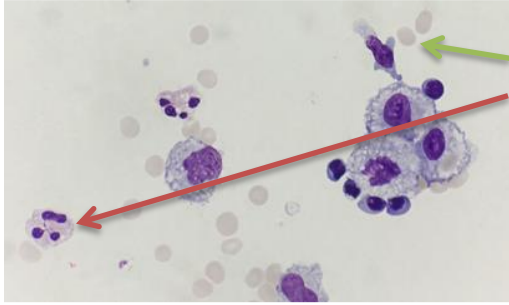
Det oppsummert inntrykket er at erytrocyttene har oppnådd en tilnærmet korrekt rosaoransje-farge, samt at mye av de samme detaljene som ved farging med ny MGG fargeprotokoll klarer også å bli visualisert godt med denne fargeprotokollen. Protokollen G15 har kanskje et noe mer flatt uttrykk enn den nye MGG, men fremdeles har denne protokollen en tydelig og klar lillafarge på cellekjernene, samt at både kromatindetaljer og nukleoler ses godt. Cellene på preparatet kommer generelt ganske skarpt frem. Cytoplasma viser mye detaljer og man ser et tydelig skille mellom cytoplasmaets membran og de ytre omgivelsene. Tabell 3.4 viser at det ble målt pH kun to av dagene for denne fargeprotokollen, men at man ved begge disse dagene kunne observere at pH- verdiene som ble målt, ligger over pH på 6,8 som er den som er anbefalt i litteratur.

Tabell 3.4: Viser pH målt i både fargeløsninger og i buffer- bruksløsningen som ble brukt til å lage både fargeløsninger og skyllekarene etter farging. De målte pH- verdiene ligger over det som blir anbefalt i litteratur (pH 6,8)

	Tirsdag	Onsdag
pH May Grünwald	8,18	8,17
pH Giemsa	7,03	7,07
pH bruksløsning buffer	7,03	7,06

3.4.2 Giemsa 20 min

Figurene på neste side, figur 1 og 2, viser preparater laget fra det samme prøvematerialet pleura, men fra to ulike pasienter, for å vise forskjell mellom prøver. Alle bildene er tatt av det første fargede preparatet fra pasientprøven, da dette viser minst denaturering av cellene. Preparatene er farget med Giemsa 20 minutter. Vurdering av fargekvalitet som ble oppnådd står skrevet rett ved siden av figuren med bilde fra preparatet.



Figur 1: SFA2 - G20

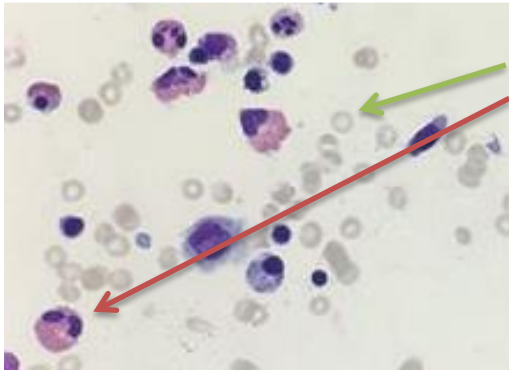
Erytrocytter: Svakere rødbrun x (se grønn pil)

Leukocyttter: Granula i granulocyttter ses, men avgrensning av disse i forhold til cytoplasma synes dårligere fordi cytoplasma også har fått en svak lillafarge x (se røde piler)

Mesotel: Nukleoler er vanskeligere å se, fordi kjerner er for lilla.

Inntrykk: → score 3

Generelt har cytoplasma blitt noe lilla, samt at kjernene har blitt for lilla, noe som gir en dårligere visualisering av detaljer.



Figur 2: SFA 5 - G20

Erytrocytter: Rødbrun (se grønn pil)

Leukocyttter: Kjernene i granulocyttter har fått litt for mye farge, slik at kromatinfordelingen er vanskeligere å se, mens kjernene i lymfocyttter er blitt veldig mørkt farget. Lilla granula i nøytrofile og røde granula i eosinofile ses veldig godt, men har blitt noe kraftigere farget, og det svakt blå transparente cytoplasma i bakgrunn er vanskeligere å se. (se røde piler)

Inntrykk: → score 3

De fleste kjernene har blitt overfarget og dette gir tap av visualisering når det gjelder kromatindetaljer.

Oppnådd score ut fra det helhetlige inntrykket for farging med denne fargeprotokollen er 3.

Det oppsummert inntrykket er at det ble oppnådd en alt for kraftig lilla kjernefarge, noe som medførte en dårligere visualisering av blant annet kromatindetaljer. Dette gjelder spesielt for lymfocyttter, hvor kjernefargen ble en veldig mørk lilla, noe som er til forskjell fra farging med Giemsa 15 minutter, hvor det var mulig å se kromatinfordeling fordi kjernefargen der ikke ble like intens.

3.5 Resultat av farging med hurtigfargen Color Rapid

Kvalitet på resultat oppnådd med hurtigfarge ble også sett på i dette prosjektet, siden hurtigfargen Color Rapid allerede brukes i dag på seksjon for cytologi når farging må skje raskt. Resultat av denne metodens fargekvalitet sammenlignet med resultat oppnådd med både den nåværende fargeprotokollen for MGG, ny MGG- fargeprotokoll og bare Giemsa- farging er derfor tatt med. Figur 3.5i under viser ulikt fargede områder på tvers av det samme preparatet som er laget fra pasientprøve SFA2. Preparatet er farget mandag, den første ukedagen med farging, så preparatet er forholdsvis nypreparert før fargingen med Color Rapid ble gjennomført. Allerede ved makroskopisk undersøkelse så kan det ses at preparatet er blitt svært ujevnt farget og at det har veldig skjoldete partier til og med på tvers. Ved mikroskopisk undersøkelse av preparatet så ses en høy celledegradering. De ulike pilene på figuren viser områder som det er tatt bilde av i mikroskop, og som kan ses i figur 1 til 4 på neste side.



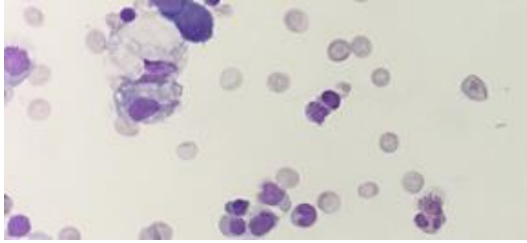
Figur 3.5i: Viser et preparat som er farget med hurtigfargen Color Rapid. Bildet illustrerer hvordan preparatet har blitt farget makroskopisk. Her kan det ses skjoldete farging som går loddrett nedover på preparatet, Dette viser hvor ujevnt fargingen har blitt. Ringene med piler forteller hvor de ulike bildene i figur 1 til 4 er tatt fra

Blålilla farget område, se figur 1, neste side

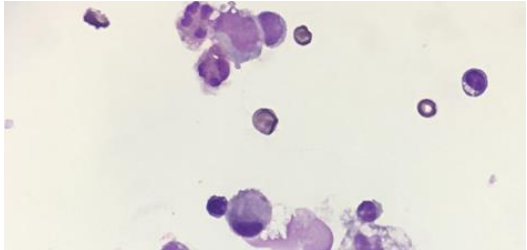
Lillafarget område, se figur 2, neste side

Rosafarget område, se figur 3, neste side

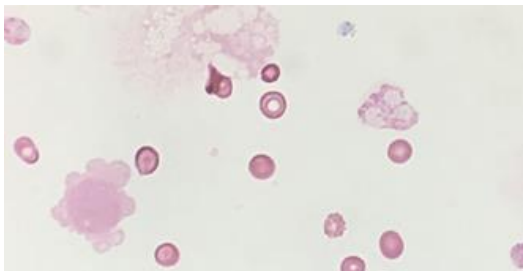
Blått farget område, se figur 4, neste side



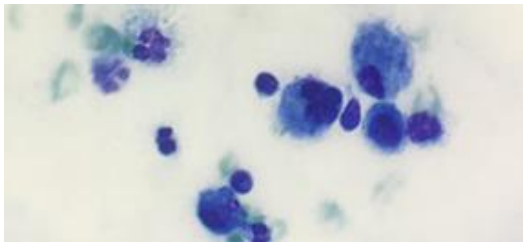
Figur 1: Viser bilde fra et område på preparatet fra prøve SFA2 hvor erythrocytter har blitt farget blålilla og andre celler har blitt farget lilla.



Figur 2: Viser bilde fra et område på preparatet fra prøve SFA2 hvor erythrocytter har blitt farget kraftig lilla. Cytoplasma på både leukocyter og mesotel har blitt også veldig lillafarget.



Figur 3: Viser bilde fra et område på preparat fra prøve SFA2 hvor erythrocyttene har blitt farget kraftig rød, mesotelceller har fått både et rødt cytoplasma og en rød kjerne, mens leukocyter har fått rødtrosa cytoplasma og nesten ufarget/veldig svak rosa kjerne. Azur B er fraværende.



Figur 4: Viser bilde fra et område på preparatet fra prøve SFA2 hvor erythrocyttene har blitt farget blågrønne, mens mesotelceller har fått både et veldig blått cytoplasma og en veldig blålilla mørk kjerne. I dette området så ser det ut til at det i hovedsak bare farget med azur B.

Generelt inntrykk av fargingen med hurtigfarge, er at den leverer et svært ujevnt fargerresultat. Den klarer å levere et noenlunde passende fargerresultat på preparatene i enkelte tilfeller, men i de fleste tilfeller blir fargingen som vist over i figur 1 til 4. Det ble observert en høy celledegradering på preparatet, noe man også klarer å se i figurene. Celledegenereringen var ganske høy til tross for at dette var et av de nyest tillagede preparatene som ble farget. Kvaliteten på cellebildet som visualiseres med denne metoden er ikke i nærheten av den kvaliteten som det resultatet som oppnås med de andre fargeprotokollene. I tabell 3.5i vises målte pH- verdier i de to fargeløsningene som brukes i Color Rapid.

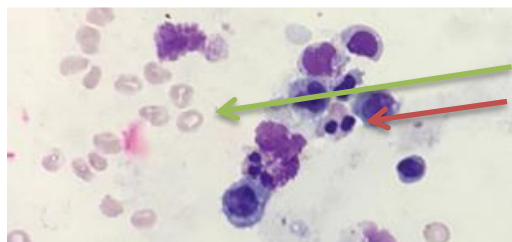
Tabell 3.5i: Viser målt pH i de to fargeløsningene til Color Rapid.

Rød løsning, Color Rapid	Blå løsning, Color Rapid
6,69	6,59

3.6 Farging med buffer som har fått endret pH

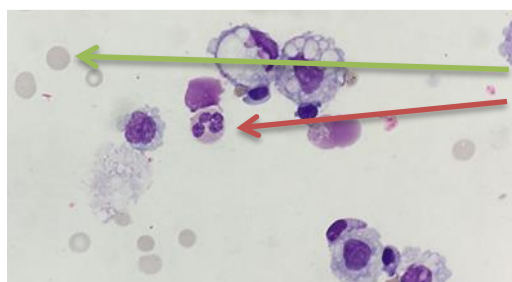
Når det ble målt pH på løsninger i den nåværende May- Grünwald- Giemsa- fargeprotokollen, så ble det funnet at pH på nytillaget bufferbruksløsning som brukes både til tillaging av farger, men som også has i bufferkar, ikke har korrekt pH på 6,8, men heller ligger på en pH rundt 7,0.

Derfor ble pH forsøkt korrigeret med å tilsette to dråper saltsyre til bufferbruksløsningen for å få pH ned til 6,8, for så å heller lage farger med denne i stedet. Dette ble gjort for å se om det er mulig å få en tydeligere visuell Romanowsky- effekt i form av en klarere og lysere lillafarge (se avsnitt 1.6) i både den nye MGG- og G15- fargeprotokollen. Fargekvalitetsvurdering for hver av preparatene fra prøve SFA2 som er farget med de ulike fargeprotokollene med forandret bufferløsning står skrevet ved siden av figurene med bilde fra preparat.



Figur 1: SFA2 – MGG, pH tvunget ned til 6,8

Erytrocytter: Kraftig støvrosa (se grønn pil)
Leukocytt: Ganske degraderte (se rød pil)
Inntrykk: Tydelig mer klar og lysere lillafarge på cellekjernene
Mesotel og leukocytt viser tegn til skade ved at cytoplasma har fått et mer ujevnt og ullent omriss. En del erytrocytter ser ut til å ha blitt ødelagte.



Figur 2: SFA2 - G15, pH tvunget ned til 6,8

Erytrocytter: Kraftig støvrosa (se grønn pil)
Leukocytt: Er bevarte. Kan se lilla granula og kromatindetaljer i nøytrofile granulocytt (se rød pil).
Kan se kromatindetaljer i kjerne også på lymfocytter.
Inntrykk: Tydelig klar og lys lillafarge. Mesotel og leukocytt er intakte, og detaljer i kjerne og cytoplasma ses. Erytrocytt er ikke blitt ødelagt i like stor grad.

Figur 1: Viser bilde av farger resultatet til preparat fra prøve SFA2 farget med ny fargeprotokoll for MGG som er tillaget med denne nye bufferløsningen.

Figur 2: Viser bilde av farger resultat til preparat fra prøve SFA2 farget med fargeprotokoll Giemsa 15 tillaget med ny bufferløsning med forandret pH.

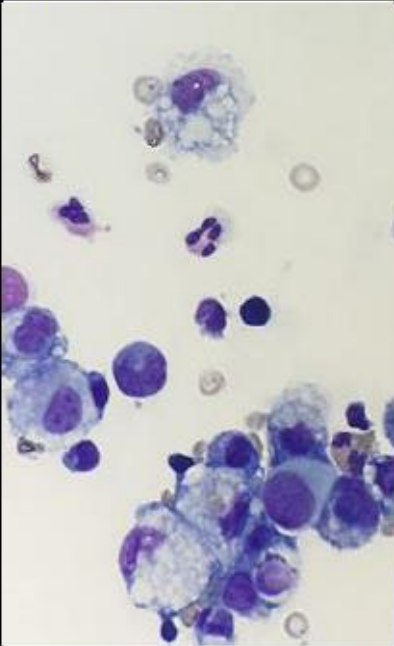
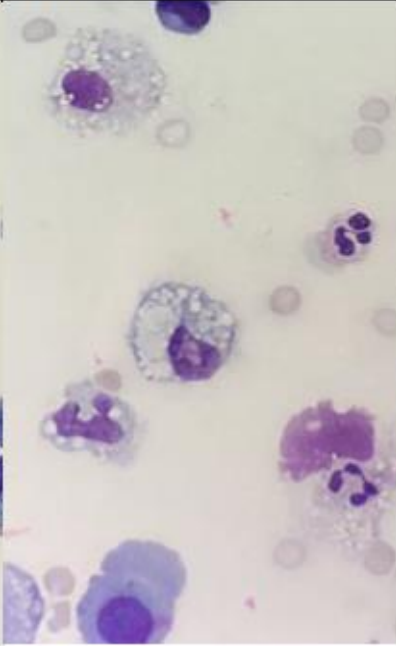
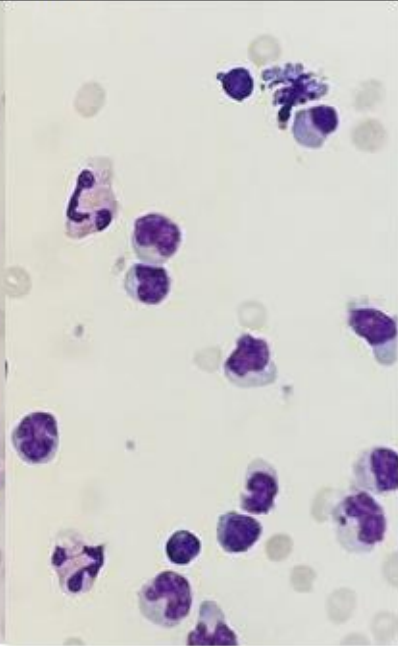
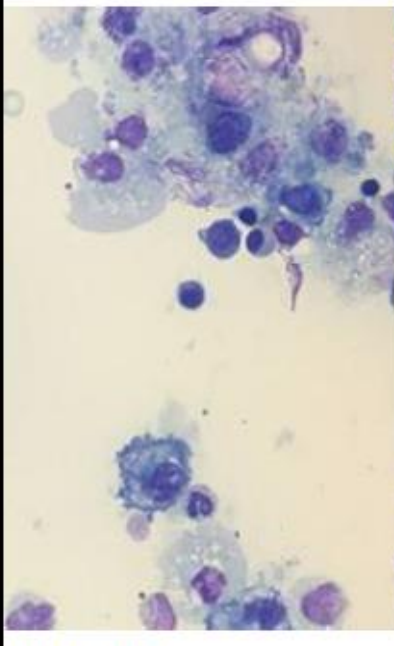
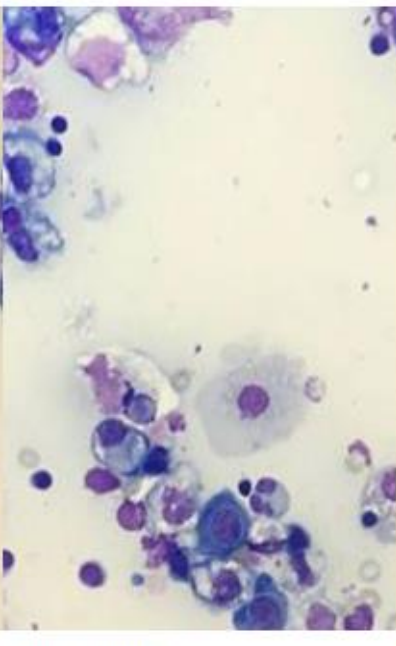
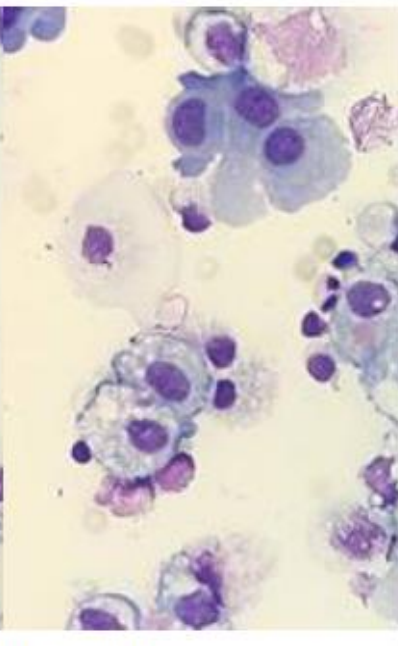
Hovedinntrykket av farging med en buffer som hadde fått endret pH til 6,78, var at denne pH-en gir et cellebilde hvor kjernene til cellene er farget en tydelig og mer klar lillafarge. Det ble også sett at det i preparat farget med ny MGG fargeprotokoll med endret pH på buffer var noen flere celler som var degenererte/ødelagte enn det som ble funnet i preparat farget med G15 fargeprotokoll med endret pH på buffer.

3.7 Sammenligning av fargerresultat

3.7.1 Dagens MGG farging opp mot resultat fra ny MGG og resultat fra Giemsa

For å kunne sammenligne resultatene av de ulike fargeprotokollene, med unntak av hurtigfargen og Giemsa 20 minutter som begge fikk et generelt dårligere fargerresultat, så ble bilder fra hver av de tre andre protokollene satt ved siden av hverandre i tabell 3.7i neste side. I tabellen ser man i den første kolonnen bilder fra preparat farget med den nåværende brukte fargeprotokollen (CYT), bilde fra preparat farget med ny MGG fargeprotokoll er vist i den andre kolonnen, og bilde fra preparat farget med fargeprotokoll for Giemsa 15 minutter er vist i den tredje kolonnen. Hver enkelt rad med bilder i tabellen er tillaget fra den samme pasientprøven, slik at den første raden viser bilder av preparater fra prøve SFA2, mens den andre raden viser bilder av preparater fra prøve SFA 3.

Tabell 3.7i: Viser tre preparater fra to pasientprøver som er farget med enten avdelingens nåværende protokoll for MGG (kalt CYT), ny protokoll for MGG eller protokoll for G15

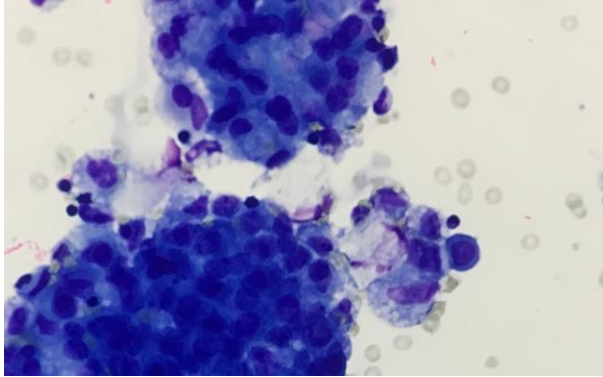
Fargeprotokoll Nåværende CYT	Fargeprotokoll Ny MGG	Fargeprotokoll Giemsa 15
		
Prøve: SFA2	Prøve: SFA2	Prøve: SFA2
		
Prøve: SFA3	Prøve: SFA3	Prøve: SFA3

Det gjennomgående inntrykket for de to nye fargeprotokollene ny MGG og G15 (bilder i den andre og tredje kolonnen av tabellen) er at erytrocytter har fått en mye mer korrekt rødoransje farge i forhold til den nåværende May- Grünwald- Giemsa- (CYT) fargeprotokollen (bilder i den første kolonnen av tabellen). I tillegg har man med de to nye klart å oppnå en mer tydelig og klar lillafarge på cellekjernene, hvor detaljer som kromatinfordeling og nukleoler kommer tydeligere frem. Helhetlig kommer cellene i både ny MGG og G15 mye skarpere frem og har mer tydelige detaljer, enn det cellene gjør på de preparater som er farget med den nåværende CYT fargingen. Det oppnås i de to nye protokollene en større kontrast mellom kjerne og cytoplasma, men også et større fargespekter på cytoplasma i de ulike cellene, slik at mer detaljer i dette kommer frem. Avdelingens nåværende fargeprotokoll (CYT), oppnår et mere blålilla preg på kjernene og cellebildet oppleves mer uskarpt og slørete enn de to andre fargeprotokollene som ble testet ut.

3.7.2 Hvordan cellegrupper farges med de ulike farge metodene

I en screening-situasjon hvor May- Grünwald- Giemsa- fargede preparater brukes for diagnostikk, så er funn av cellegrupper og mulighet for å vurdere utseende på disse viktig. Derfor er det viktig at fargingen har klart å få frem både godt med både kjerne- og cytoplasma- detaljer på helst alle eller flest mulig av cellene i disse gruppene. To bilder av fargede cellegruppe med forskjellig fargekvalitet fra det samme preparatet er derfor satt ved siden av hverandre. Det ene av de to bildene vil vise en godt farget gruppe, hvor fargemolekylene har klart å komme godt til i hele eller nesten hele gruppen, mens det andre bildet viser en gruppe hvor cellene ligger så tett samlet at spesielt de større fargemolekylene, har noe vanskelig for å klare å komme til, se figur 1 til 6 på neste side. Ved siden av hver figur er det satt inn en vurdering av fargekvalitet på cellegruppen som er avbildet.

Figurene 1 til 6 neste side: *Hvert bildepar viser to forskjellige cellegrupper som er å finne i det samme preparatet, men hvor det første bildet i hvert par (figur 1,3 og 5) viser en godt farget cellegruppe, mens det andre bildet (figur 2,4 og 6) viser et eksempel på en cellegruppe som er vanskeligere å farge.*

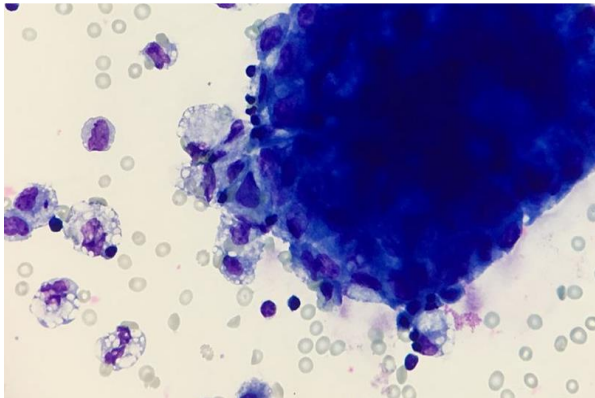


Figur 1: SFA2 G15

Inntrykk godt farget gruppe:

Stor variabel gruppe, cytoplasma ikke så tett at man ikke kan se kjernedetaljer som nukleoler, kan se ned til cellene som ligger under og kjernene der.

Inntrykk: → Bra

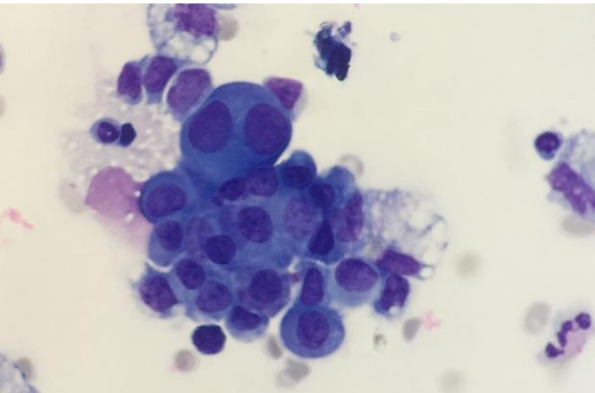


Figur 2: SFA2 G15

Inntrykk vanskelig farget gruppe:

Stor tett gruppe, cytoplasma veldig mørk. Cellegruppen så tett at man ikke får noen detaljer fra kjernen i sentrum av denne gruppen. Kan se kjernene gjennom cytoplasma mer perifert på gruppen.

Inntrykk: → Bra til å være så tett en gruppe

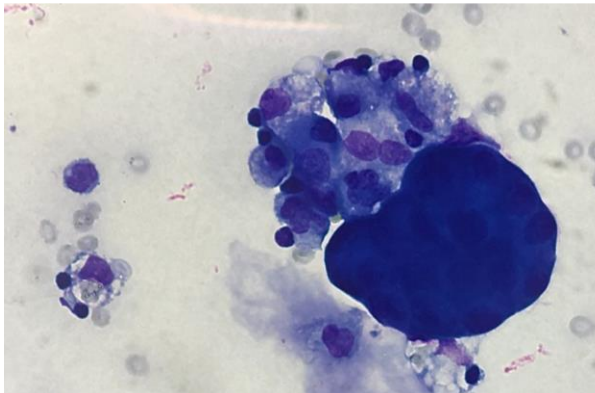


Figur 3: SFA2 MGG

Inntrykk godt farget gruppe:

Man kan tydelig se gjennom hele 3d- gruppen. Cytoplasma er ikke så sterkt farget at man ikke kan se ned til cellene som ligger under og kjernedetaljene der.

Inntrykk: → Veldig bra

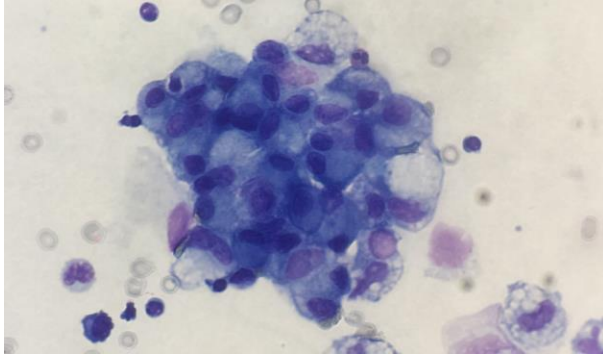


Figur 4: SFA2 MGG

Inntrykk vanskelig farget gruppe:

Cytoplasma er mørk og tett, men man kan se kjerner og skimte nukleoler

Inntrykk: → Godt

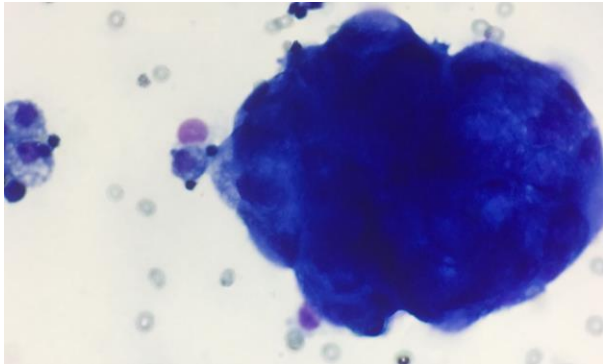


Figur 5: SFA2 CYT

Inntrykk godt farget gruppe:

Stor variabel gruppe, cytoplasma ikke så tett at man ikke kan se enkelte kjernedetaljer som nukleoler. Kan se ned til cellene som ligger under og se kjernene der. Men hele gruppen har et litt ullent og utydelig preg.

Inntrykk: → Mer utydelig, "greit nok" preg



Figur 6: SFA2 CYT

Inntrykk vanskelig farget gruppe:

Liten tett gruppe, cytoplasma så tett at man så vidt kan se kjerner i ytterkant av gruppen. Et litt ullent preg.

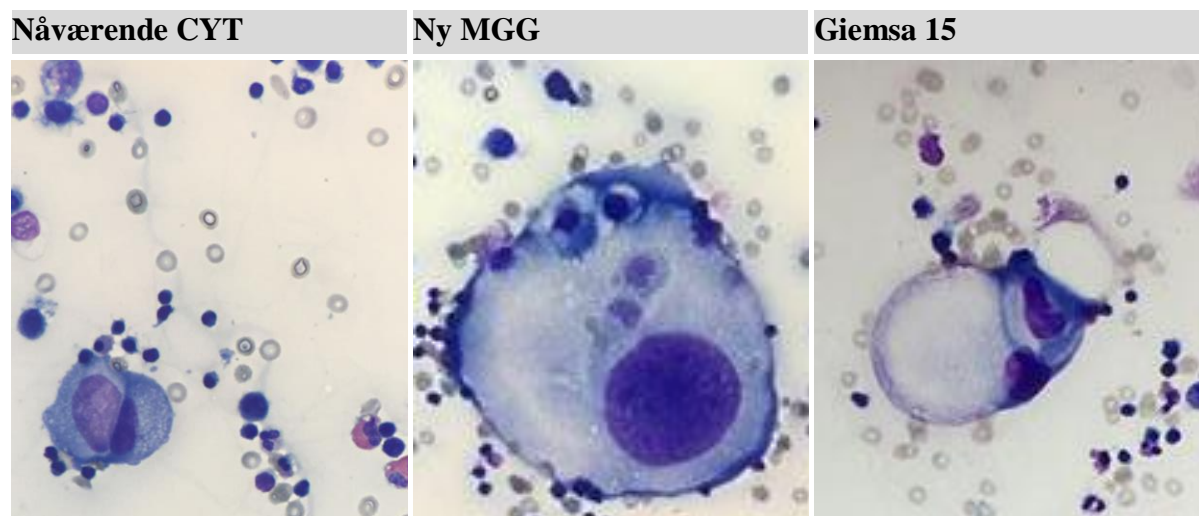
Inntrykk: → Mer utydelig, "greit nok" preg

Det oppsummerte inntrykket etter å ha sammenlignet hvor mye detaljer som kommer frem i de større cellegruppene på preparatene som ble farget med de ulike protokollene, ser man at flest detaljer kommer frem med de to nye fargeprotokollene ny MGG og G15. Den nåværende fargeprotokollen for MGG (CYT) ved seksjonen har problemer med å få frem den samme detaljrikdommen på cellegruppene som det både den nye MGG fargeprotokollen og med G15-fargeprotokollen klarer.

3.7.3 Hvordan atypiske celler farges med de ulike fargeprotokollene

For å sammenligne hvordan fargekvalitet på atypiske celler blir med tanke på synliggjøring og vurdering av disse cellenes morfologi, så ble fargerresultatet ved farging av disse cellene med de to nye fargeprotokollene, G15 og ny MGG, sett opp mot det resultatet som oppnås med seksjonens nåværende fargeprotokoll for MGG (CYT). I tabell 3.7ii vises bilder av fargede preparater fra pasientprøve SFA5 og SFA6, som er de to prøvene i dette prosjektet hvor det var funn av atypiske celler som kan indikere kreft. Bilder av preparater tillagd fra prøve SFA5, og som er farget med de tre ulike fargeprotokollene, henholdsvis nåværende MGG (CYT), ny MGG og Giemsa 15 minutter (G15) er satt inn i den første raden, mens bilder fra preparater tillagd fra prøve SFA6 som er farget med de samme fargeprotokollene som SFA5 er satt i den andre raden.

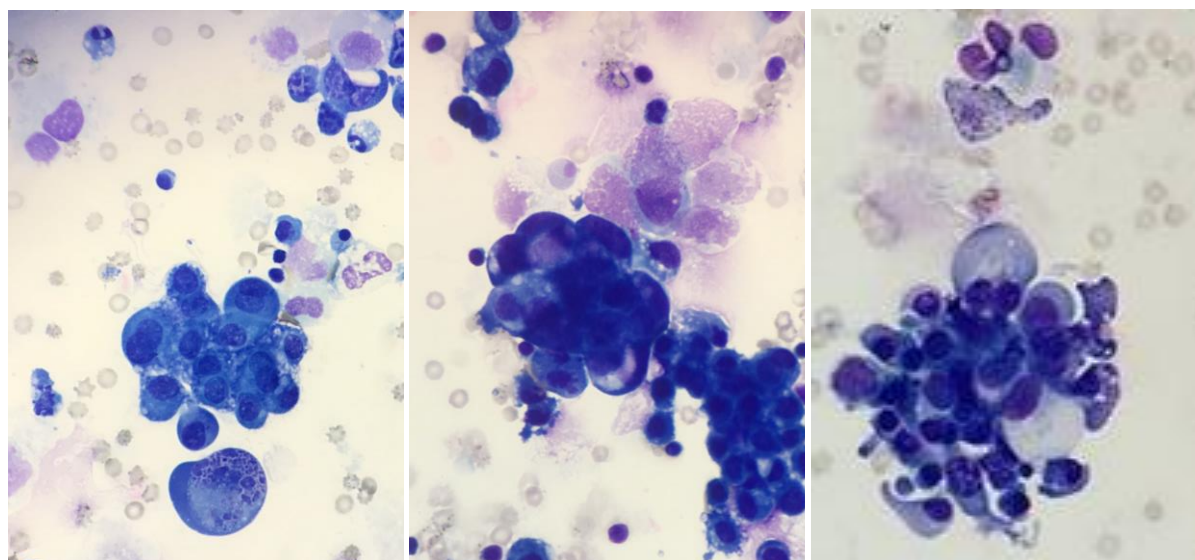
Tabell 3.7ii Viser bilder av fargede preparater fra pasientprøve SFA5 og SFA6, som er de to prøvene i dette prosjektet hvor det var funn av atypiske celler. Bilder fra den nåværende brukte fargeprotokollen (CYT) vises i den første kolonnen, mens bilder av preparater farget med den nye MGG fargeprotokollen vises i den andre kolonnen, bilder fra preparater farget med protokoll for Giemsa 15 minutter (G15) vises i den tredje kolonnen.



Prøve: SFA5

Prøve: SFA5

Prøve: SFA5



Prøve: SFA6

Prøve: SFA6

Prøve: SFA6

Oppsummert inntrykket når man vurderer oppnådd fargekvalitet på de atypiske cellene med enten den nye MGG- eller G15- fargingen, sammenlignet med den nåværende MGG- fargingen (CYT), så ses det at det samme fargemønsteret som er blitt sett hos de ulike protokollene i det forrige avsnittet (avsnitt 3.7.2) gjelder også for fargingen av disse atypiske cellene.

4 Diskusjon

4.1 Preparering

Som en del av dette prosjektet skulle vurdering av fargerresultatet oppnådd også ses i sammenheng med valg av prepareringsmetode for prøvematerialet. Prepareringsmetodene som ble brukt og som skulle sammenlignes var Megafunnelpreparat kontra direktestryk. Ved fargerekvalitetsvurderingen som ble gjort for de ulike fargeprotokollene, ble det vurdert som hensiktsmessig å utelate direkteutstrykene som hadde blitt laget. Dette ble gjort fordi at det etter sentrifugering av prøvematerialet ved tillaging av utstrykene, rett og slett ikke blitt helt av tilstrekkelig med supernatant. Noe som igjen medførte at dråpene med cellemateriale som ble overført til objektglassene ikke var blitt nok konsentrert. Direkteutstrykene ble derfor for cellefattige i forhold til preparatene laget med Megafunnel. Dette oppstod både på grunn av uerfarenhet, men også på grunn av frykt for at det skulle bli for lite prøvemateriale til å lage alle utstrykene som behøvdes. Etter hvert som teknikken for å lage direkteutstryk ble bedre, ble resultat av prepareringen på de to siste prøvematerialene, henholdsvis prøve SFA5 og SFA6, ganske mye bedre. For prøve SFA6 ble visualiseringen av cellebildet i utstryket muligens noe bedre enn det den ble på Megafunnel- preparatet.

Prøve SFA6 var et veldig cellerikt materiale, og ved mikroskopering av preparat fra Megafunnel, ble det sett mange degenererte celler i form av utvaskede lyselilla kjerner uten cytoplasma. Når det manuelle utstryket ble mikroskopert, var disse degenererte cellene ikke til stede. Cellerestene ser ut til å ha blitt fjernet/vasket vekk sammen med supernatanten, noe som er til forskjell fra Megafunnel- preparatet, hvor prøvematerialet slynges direkte på objektglass. Disse degenererte cellene kom derfor med, og gav et cellebilde som var mer forstyrret, da disse cellerestene ikke kan være med i noe bedømming av hverken fargekvalitet eller morfologi i en diagnostisk sammenheng.

Ved bruk av Megafunnel ble det valgt å overføre 1,0 mL som prøvevolum til traktet i preparering av alle pasientprøvene. Et prøvevolum på 1,0 mL viste seg i mange av tilfellene å være litt for mye, og et overskudd med materiale havnet som tilbakeslag i nederste del på

preparatet når objektglass skulle knekkes ut av sentrifugetrakten. Overskuddsmaterialet som fremdeles befant seg i Megafunneltrakten etter sentrifugeringen, kunne også dersom man ikke var forsiktig ved knekkingen for å få ut objektglasset, skvulpe over på glasset, slik at man fikk et ytterligere tykt cellelag.

Dette problemet med tilbakeslag av væske var mest problematisk i de mindre viskøse, og tyntflytende pasientprøvene. Mengde med prøvemateriale som ble overført til Megafunneltrakten, burde vært mer individuelt bedømt. Hvor man ved lav viskositet på prøvemateriale, burde overført et mindre prøvolum til megafunneltrakten. Denne feilen kunne vi observere på noen av preparatene i form av at det i øverste del av et slikt preparat var oppnådd et monolag med celler, noe som er det mest gunstige for en Romanowsky- farging, mens det i den nederste del av preparatet var samlet seg et overskudd med materiale. Overskuddet nederst, gjorde at det ikke lengre var det ønskelige monolaget med celler, men heller et flerlag med celler og bakgrunnsvæske, som bidro til bakgrunnsfarging. Bakgrunnsfargen var synlig med at det i den nedre del av preparatet ble et for blått fargebilde, som gjorde både omgivelsene rundt cellene, men også cellenes kjernedetaljer og morfologi mindre synlig. Dette skjer siden det er flere elementer til stede i form av celler og bakgrunnsvæske som konkurrerer om fargemolekylene, men også fordi fargemolekylene, spesielt eosin Y som er større enn azur B, ikke slipper like godt til. Blåfarge fra azur B vil derfor dominere, mens eosin Y vil være mer fraværende. Ved vurdering av fargekvaliteten oppnådd med de ulike fargeprotokollene ble derfor alle preparatene vurdert i det øverste området hvor det var oppnådd et monolag, og hvor fargingen som følge av dette hadde blitt mest korrekt.

Ved tilføring av fysiologisk saltvann for å fortynne prøve som var vurdert til å være mer viskøs og tyktflytende, så ble dette kun tilført til den delen av prøvematerialet som skulle prepareres med Megafunnel og ikke til den delen som direkteutstrykene skulle lages fra. Her ble det observert at på preparatet som var fortynnet, oppstod det mindre bakgrunnsfarging i forhold til direkteutstryket som ikke var fortynnet. Men siden fortynning kun ble utført på to av de totalt åtte prøvene, så er det vanskelig å gi en sikker konklusjon, men vi tror at fortynning kan hjelpe til å vaske bort noe av innholdet i bakgrunnsvæsken som bidrar til å gi bakgrunnsfarge på preparatene.

På de preparatene som ble farget gjennom en uke, så ble det sett at etter hvert som preparatene ble av eldre prepareringsdato før farging, så kunne en økt degenerering på celler observeres. Denne degenereringen medførte ikke bare en endring i cellens evne til å ta til seg farge på grunn av endret permeabilitet, men den gjorde også at de mindre holdbare cellene, og da spesielt granulocytter, gikk i mer og mer oppløsning slik at de ble vanskeligere å finne.

4.2 Resultat av avdelingens nåværende fargeprotokoll for May Grünwald Giemsa

Det kan tydelig ses at det er ugunstig med skylling med springvann mellom May- Grünwald-fargekaret og Giemsa- fargekaret. Dette er fordi at når preparatet har vært i karet med May- Grünwald, for så å bli senket ned i et kar med springvann, så stoppes den allerede igangsatte fargeprosessen. Springvannets pH, som er ble målt til å være på hele 8,0, er alt for høy i forhold den anbefalte pH som er på 6,8. Behandling av preparat med en løsning med for høy pH rett før Giemsa- karet, er nok den største innvirkende faktoren til denne fargeprotokollens oppnådde fargekvalitet og dårlige Romanowsky- effekt. Ved en så høy pH som 8,0, så vil tilstedeværelse av ladning på cellekomponenter som favoriserer fargemolekylet eosin Y være mer fraværende, mens ladning på cellekomponenter som favoriserer fargemolekylet azur B er tilstede. Preparatene farget med denne fargeprotokollen vil derfor få et alt for blållilla preg.

I tillegg til at skylling med springvann innvirker på ladningen til cellekomponentene, så kommer dråper av dette vannet også med over i Giemsa- karet, noe som både fortynner og forurenser fargeløsningen, og som fremmer en ytterligere dannelse av presipitat. Presipitattannelsen medfører at det blir stadig færre aktive fargemolekyler igjen i fargeløsningen. Det at man velger å kun ha nye farger to ganger i uken, er ugunstig i forhold at fargemolekyler blir tapt gjennom presipitattannelse, noe som igjen bidrar til at det oppnås et noe mer variabelt fargerresultat gjennom uken. Derimot så er det gunstige med denne gjenbruken som gjøres på nåværende tidspunkt, hvor bufferløsningen har for høy pH, at pH blir litt lavere for hver dags bruk. Den noe lavere pH gjør at flere cellekomponenter får ladning slik at flere fargemolekyler, spesielt eosin Y, kan binde seg, og en tydeligere Romanowsky- effekt oppstår i form av en tydeligere lilla kjernefarge på cellene.

Resultatet av denne fargingen er et uklart cellebilde med noe mer duse farger, enn det som oppnås de to nye fargeprotokollene ny MGG og G15. Cellene ser nesten litt degenererte ut når man sammenligner preparater fra denne fargeprotokollen med tilsvarende preparat som farget med enten ny MGG- eller G15. Dette noe uklare cellebildet med noe mer duse farger, var med på å gi denne nåværende fargeprotokollen for May- Grünewald- Giemsa (CYT) en sammenlagt kvalitetsscore på 3.

4.2.1 Måling av pH

Giemsa-fargens pH viste seg å være tilnærmet den samme pH som buffer- bruksløsningen, noe som indikerer at bufferens pH er avgjørende for hvilken pH bruksløsning for Giemsa-fargen får til slutt. Stamsløsning med buffer, altså konsentrert buffer før blanding med sterilt vann, ble målt med labens pH-meter og ble funnet til å ha en pH- verdi på 6,88 noe som er mer lik 6,9, i stedet for den oppgitte pH 6,8 fra fabrikanten. Det sterile vannet som ble brukt til å lage bruksløsning med buffer, fikk en målt pH på 8,47. For å lage en buffer- bruksløsning er forholdet mellom buffer- stamsløsning og sterilt vann 5:95. Dette kan forklare hvorfor buffer- bruksløsningen som ble tillaget alle ukedagene hadde en pH- verdi som lå på mellom 7,04-7,08, som er langt over den ideelle pH på 6,8.

Det ble målt pH i de helt nylagde fargeløsningene, men også i de samme fargeløsningene etter både én og to dagers bruk. Dette medførte at det ble sett at pH i begge fargeløsningene synker fra de er nyttillaget til både etter en dags bruk, men også fra etter én dags bruk og over til etter to dagers bruk. Dette kan være med på å forklare hvorfor det ble observert at cellekjernene får en noe mer lillafarge ved både neste dags bruk og etter to dagers bruk av de samme fargeløsningene. Denne lillafargen oppstår til tross for at det er filtrert bort en del fargemolekyler som har inngått i presipitatdannelse, men siden pH er så høy første dag, så er det muligens mindre eosin Y tilstede i cellen for kompleksdannelse denne dagen på grunn av fravær av ladning på de cellekomponenter som binder eosin, og at eosin derfor ikke er i nærheten av azur B. Preparatene farget den første dagen med seksjon for cytologi sin nåværende protokoll MGG får derfor kjerner som er farget mer blå enn blålilla, enn det de blir både den andre og tredje dagen med farging hvor de samme fargeløsningene brukes.

4.3 Ny MGG farging

I den nye MGG fargeprotokollen i forhold til den nåværende, så ble det valgt å både fjerne skylling i springvann mellom May- Grünwald- og Giemsa- fargekaret, samt å i tillegg sette inn et ekstra giemsa- karett, slik at det ble to giemsa- karett rett etter hverandre. Dette ble gjort for at det siste karett med Giemsa skulle holde seg mer uforurenset. I det første karett med Giemsa lot vi direkteutstryk og preparat stå i 5 minutter, mens de resterende 10 minuttene med giemsa- farging ble gjort i det andre mer “renere” giemsa- karett. Dette ble gjort for å ha mest mulig kontroll på at mesteparten av Romanowsky- fargingen skulle skje i et mindre forurenset og mer uforynnet giemsa- karett. En annen fordel med å dele opp giemsa- fargingen til to fargekar, er at fargekapasiteten til fargemaskinen økes. Fargekapasiteten økes fordi et fargestativ ikke lengre okkuperer fargekarett i 15 minutter, men at man i stedet nå har to fargekar å fordele tiden på.

Effekten av å ta bort springvannet mellom de to fargekarettene viste seg å være veldig stor, da cellebildet ble mye skarpere ved at det ble en mye mer tydelig kontrast mellom kjerner og cytoplasma, samt at det kom frem flere detaljer i begge disse. Fargemessig ble det en mer korrekt Romanowsky- lillafarge på kromatinet i kjernene. Den celledegenereringen man kunne observere ved seksjonens nåværende protokoll var borte. Denne nye May- Grünwald- Giemsa- fargeprotokollen fikk en helhetlig score på 4 ut i fra kriterier som er listet i *Staining Criteria Handbook*.

4.4 Giemsa farging

I denne protokollen ble det heller ikke brukt springvann, men det ble opprettet et ekstra giemsa- karett, med de samme tidene for Giemsa- farging som i den nye MGG- protokollen. Her går preparatene fra metanolkarett direkte over i det første karett med Giemsa. Dette giemsa- karett vil da få tilført metanol i sitt kar, mens det neste påfølgende karett med Giemsa vil bli holdt mer rent. Dette gir muligens noe mer kontroll på Romanowsky- fargingen med tanke på at det forhindrer forurensning og eventuelt noe økt presipitatdannelse. I hvor stor grad dette ekstra karett har å si for fargekvaliteten dersom man skifter farger hver dag, er noe usikkert, men ved mye bruk i løpet av en dag så holdes det andre karett som preparatene farges lengst tid i renere. Kvaliteten på fargingen i løpet av dagen holdes derfor kanskje noe mer stabilt. Det som er sikkert er at fargekapasiteten økes til fargemaskinen med et slikt program. Ved valg av videre bruk av to

giemsakar, så kan det andre giemsa-karet som er reneest eventuelt kanskje tas vare på til neste dag, og settes inn som det første karet i rekkefølgen, mens et nytillaget giemsa-akar settes inn som nummer to. Noe som gjør at det spares litt på forbruket av fargeløsning både med tanke på økonomi og miljø.

Effekten av å utelate springvann, kunne også observeres tydelig i G15 protokollen, og mye av de samme detaljene som ved ny MGG fargeprotokoll ble observert. Forskjellen mellom disse to protokollene er både at erytrocyttene blir noe svakere rødrosa- farget med bare Giemsa enn med ny MGG- fargeprotokoll. Men også at den nye MGG gir en noe mer tonet og dimensjonal- følelse i visualiseringen av cellebildet, i forhold til fargeprotokoll for Giemsa 15 minutter, hvor dette får et noe “flattere” preg. Denne protokollen fikk en helhetlig score på 4 ut i fra kriterier som er listet opp i *Staining Criteria Handbook*.

Ved farging av Giemsa i 20 minutter ble kjernefargen vurdert til å være for mørk. Kjernene ble mer kraftig lilla og det ble oppnådd en høyere kontrast mellom en del cellulære komponenter, men dette kom på bekostning av at kromatindetaljene i kjernene forsvant helt i den mørke lillafargen.

4.5 Hurtigfarge

Hurtigfargen gav et svært ujevnt fargerresultat. I de fleste tilfeller ble fargerresultatet såpass dårlig at tolkningen av morfologien til cellene ble vanskelig. Fargemetoden klarte å levere enkelte forholdsvis greie fargerresultat som muliggjorde noe visualisering av cellenes morfologi, men dette var sporadisk. Hvorfor denne fargemetoden ikke klarte å levere et jevnt fargerresultat er vanskelig å forstå, da dette skjer tilsynelatende helt vilkårlig. Det ble også opplevd at noe av prøvematerialet forsvant under selve fargingen. Da det ikke er gitt noen opplysninger om hva fargeløsningene i Color Rapid sine fargeløsninger inneholder, så er det vanskelig å tenke seg fram til hvilke feilkilder som ligger bak. Celledegraderingen som ble observert var ganske stor, til tross for at dette var et av de nyest lagde preparatene som ble farget.

Denne celledegenereringen ble ikke observert på noen av de andre preparatene tillaget fra det samme pasientmaterialet som ble farget med en av de andre fargeprotokollene. Noe av

celledegraderingen kan skyldes den lave pH i fargeløsningene, siden løsning A hadde en målt pH på 6,69, og løsning B hadde en målt pH på 6,59. Målt pH for løsning B begynner å bli såpass lavt at cellene muligens begynner å ta noe skade, siden denne pH- verdien begynner å bli veldig nær den nedre verdien som er på 6,5 i det anbefalte pH-området for Romanowsky- farging.

4.6 Endret pH av buffer og farger

Det å endre pH i fargekar og i buffer-skyllekar, ble gjort for å teste ut hvor viktig rett pH var for å få til en best mulig Romanowsky- effekt i form av en klar lillafarge. Og vi fikk bekreftet at pH har stor betydning for å kunne oppnå denne fargeeffekten ved at både den nye MGG- og G15- fargeprotokollen klarte å oppnå en klarere og lysere lilla kjernefarge.

Ved syretilsats i bufferen, kan det hende at bufferkapasiteten ble ødelagt, og at den ikke lenger var en buffer, men en løsning med pH 6,78. Siden pH på buffer var på 7,04 før syretilsatsen skjedde, og at pH ble endret med 0,26. Preparatene som ble farget med denne fargemetoden viste mye degenererte celler. En mulig forklaring til dette kan være et sammensatt bilde av at det både var et gammelt preparat med degenererte celler, samtidig som at løsningene fikk en noe for lav pH og at bufferen muligens var ødelagt, slik at cellene ble ytterligere noe degenererte. Av de erytrocyttene som var bevart så hadde de fått en mer rett rødoransje farge, samt at kromatin i alle celler hadde en mer tydelig lillafarge, altså at det ble oppnådd en bedre Romanowsky-effekt. Preparatene som ble farget med ny MGG viste mer degenerering enn de som ble farget med G15, og dette kan kanskje forklares med at preparatene var 5 minutter lenger i fargeløsningene. Men ut i fra at det ble oppnådd en bedre Romanowsky- lillafarge, så kan buffer som er laget korrekt uten justering på denne måten med pH 6,8 se ut til å kunne gi et godt resultat. Nyere tillagde preparater ville nok også gjort at det ble mindre degenerering av celler og at fargekvaliteten hadde blitt bedre.

4.7 Sammenligning av store grupper

Ved sammenligning mellom de store cellegruppene kunne man tydelig se forskjell på fargekvalitet mellom de ulike fargeprotokollene. Her kom det fram hvor utydelig cellebildet blir ved bruk av seksjonens nåværende fargeprotokoll. De nye fargeprotokollene MGG og G15

gjorde det mulig å se flere detaljer i 3D- grupper med celler enn det som det er mulig å se etter farging med seksjonens nåværende fargeprotokoll for May- Grünwald- Giemsa (CYT).

4.8 Vurdering av fargekvalitet, og gi score

Ved vurdering av fargekvalitet og bestemmelse av oppnådd score møtte vi på noe utfordring fordi vi ikke hadde eksempelbilder å forholde oss til, men kun beskrivelser i tekstform, av hvordan et godt farget preparat burde være hentet fra *Staining Criteria Handbook*. Normalt blir fargede preparater og utstryk ikke bedømt av laboratoriet selv etter disse kriteriene, men sendes heller til det eksterne stedet som er ansvarlig for kriteriene. På det eksterne stedet så vurderes disse preparatene og utstrykene av to trente fagkyndige personer. Disse to fagpersonene både ser på og gir score til preparatene uavhengig av hverandre, før et sammenlagt resultat sendes tilbake til laboratoriet.

Siden vi ikke hadde preparert serøse væsker før dette prosjektet, så ville vi aldri klart å få til en full score på 5, siden kvaliteten på selve prepareringen var for dårlig til dette. For å oppnå en score på 5, så er det viktig at man klarer å få til et monolag med celler over hele preparatet, og at det er klart å unngå bakgrunnsfarging ved at de prøvematerialene med mye egenfarge er vasket med saltvannsløsning, og at de prøvene som er lite viskøse er blitt overført i et mindre volum til megafunnel- trakten. Hvis en slik preparering hadde vært gjort, så tror vi at det kunne ha blitt oppnådd en mer jevn farging over hele preparatet, noe som ville kunne ha medført at det på noen av preparatene ble oppnådd en kvalitetscore som var nærmere 5.

5 Konklusjon

Vi anbefaler ny May- Grünwald- Giemsa- fargeprotokoll (ny MGG), da denne protokollen gir mer toning og dimensjon i visualiseringen av cellebildet i forhold til Giemsa 15 minutter- fargeprotokollen (G15). Begge disse protokollene oppnår et mye bedre fargerresultat enn det den nåværende brukte May- Grünwald- Giemsa- fargeprotokollen ved seksjonen klarer å oppnå. Det er ikke en veldig stor fargekvalitetsforskjell som skiller G15 fra ny MGG. G15 gir kanskje ikke det fyldige og like dimensjonale- preget som ny MGG, men til gjengjeld er det en protokoll som er 5 minutter mer effektiv å farge med, samtidig som man vil spare både noe bruk av fargeløsninger og miljøet.

6 Referanser

- Bashir, Asma. 2010. “NOTER I LUNGESYGDOMME.” *stud med.*, 53.
- Bibbo, Marluce, and David Wilbur, eds. 2008. *Comprehensive Cytopathology: An Expert Consult Title ; Online + Print*. 3. ed. Philadelphia, Pa: Saunders, Elsevier.
- Davidson, Ben, and Aasmund Berner. n.d. “Serøse væsker.” Tidsskrift for Den norske legeforening. Accessed May 13, 2019. <https://tidsskriftet.no/2000/02/tema/serose-vaesker>.
- “Fakta om kreft.” n.d. Accessed April 3, 2019. <https://www.kreftregisteret.no/Generelt/Fakta-om-kreft/>.
- Gill, Gary W. 2013. *Cytopreparation: Principles & Practice*. Essentials in Cytopathology Series. New York: Springer.
- “Glycosaminoglycan; Produktion; Klassifikasjon; Forkortelser.” n.d. Accessed March 28, 2019. <http://potterager.com/article/glycosaminoglycan>.
- Holck, Per. 2018a. “pleura.” In *Store medisinske leksikon*. <http://sml.snl.no/pleura>.
- ———. 2018b. “serøse hinner.” In *Store medisinske leksikon*. http://sml.snl.no/ser%C3%B8se_hinner.
- ———. 2019. “bukhinnen.” In *Store medisinske leksikon*. <http://sml.snl.no/bukhinnen>.
- Horobin, R. W. 2011. “How Romanowsky Stains Work and Why They Remain Valuable — Including a Proposed Universal Romanowsky Staining Mechanism and a Rational Troubleshooting Scheme.” *Biotechnic & Histochemistry* 86 (1): 36–51. <https://doi.org/10.3109/10520295.2010.515491>.
- “Hva er kreft?” n.d. Kreftforeningen. Accessed April 5, 2019. <https://kreftforeningen.no/om-kreft/hva-er-kreft/>.
- Klepp, Olbjørn. 2018. “kreft – diagnose.” In *Store medisinske leksikon*. http://sml.snl.no/kreft_-_diagnose.
- Koss, Leopold G., Myron R. Melamed, and Leopold G. Koss, eds. 2006. *Koss' Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Krafts, Kp, and Se Pambuccian. 2011. “Romanowsky Staining in Cytopathology: History, Advantages and Limitations.” *Biotechnic & Histochemistry* 86 (2): 82–93.

<https://doi.org/10.3109/10520295.2010.515492>.

- “Kreft.” n.d. Folkehelseinstituttet. Accessed April 3, 2019. <http://www.fhi.no/nettpub/hin/ikke-smittsomme/kreft/>.
- Mecsei, Reidun. 2007. *Clinical Cytology, Cellular Morphology Reflecting Biological Activity*. NTNU Grafiske Senter.
- “NEQMANMA003- Special Stain Criteria Handbook Non Gynae Edition 3 Jan 2015.Pdf.” n.d.
- “Non Gynae.” n.d. Accessed March 11, 2019. <https://www.ukneqascpt.org/non-gynae>.
- Piaton, E., M. Fabre, I. Goubin-Versini, M-F. Bretz-Grenier, M. Courtade-Saïdi, S. Vincent, G. Belleannée, et al. 2016. “Guidelines for May-Grünwald-Giemsa Staining in Haematology and Non-Gynaecological Cytopathology: Recommendations of the French Society of Clinical Cytology (SFCC) and of the French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFA.” *Cytopathology* 27 (5): 359–68. <https://doi.org/10.1111/cyt.12323>.
- “Pinterest (Norge / Norway).” n.d. Pinterest. Accessed April 5, 2019. <https://no.pinterest.com/lisaatkinson4/ap/>.
- Roald, Borghild. 2016. “cytologisk prøve.” In *Store medisinske leksikon*. http://sml.snl.no/cytologisk_pr%C3%B8ve.
- ———. 2018a. “neoplasi.” In *Store medisinske leksikon*. <http://sml.snl.no/neoplasi>.
- ———. 2018b. “patologi.” In *Store medisinske leksikon*. <http://sml.snl.no/patologi>.
- ———. 2018c. “svulst.” In *Store medisinske leksikon*. <http://sml.snl.no/svulst>.
- ———. 2019. “histologi.” In *Store medisinske leksikon*. <http://sml.snl.no/histologi>.
- Roald, Borghild, Torill Sauer, and Olbjørn Klepp. 2018. “kreft.” In *Store medisinske leksikon*. <http://sml.snl.no/kreft>.
- “The Biological Significance of Hyaluronic Acid and Hyaluronidase.Pdf.” n.d. Accessed March 24, 2019. <https://pdfs.semanticscholar.org/9268/3cc9f3f780809414286824bac43e834257cc.pdf>.
- “The Top 10 Causes of Death.” n.d. Accessed April 5, 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- “Three Types of Membrane.” n.d. Accessed April 7, 2019. <https://antranik.org/three-types-of-membrane/>.

7 Vedlegg

Vedlegg 1: Molde sykehus:

Dokument «Farge: May-Grunwald Giemsa», ID 6149 - EQS

Page 1 of 3

Farge: May-Grunwald Giemsa

Forfatter: Siw Janne Basmoen, Emmakaisa Metsämäki
Godkjent av: Tove Gimse

Gyldig fra: 27.03.2019
Revisjonsfrist: 26.03.2022

Revisjon: 1.15
ID: 6149

Hensikt	Luftfiksert cytologisk materiale farges med May-Grunwald Giemsa for å klargjøre materialet til mikroskopering.
Prinsipp	May-Grunwald Giemsa inneholder anionfargestoffet eosin og kationfargestoffene metylenblått og azur B. Fargestoffenes affinitet til vevet er avhengig av pH, pKa-verdi og samspillet mellom fargestoffene. Azur B og eosin bindes til kromatin. Med denne metoden oppnår man en god differensiering av detaljer i kjerne og cytoplasma.
For-behandling	Lufttørkes før fiksering i metanol (tørring: ca 15-30 min).
Utstyr	Fargeglass, vannbad, varmeskap og monteringsmaskin.
Praktiske tips/feilkilder	NB! Hele glasset skal dekkes med metanol for å unngå smitte. Farging av preparater bør foregå så raskt som mulig etter at de er lufttørket og helst innen 2-3 timer. Hvis det tar lengre tid før farging fikseres de i METANOL i ca 5 min og så lufttørkes.
Kontroller	Nei.
Resultat	Vurderes av screener.
Ansvar	Bioingeniør følger retningslinjer for tillaging av reagenser (se relatert), utfører fargemetode og kontrollerer fargerresultat.
Referanser	- Koss, Leopold G., Diagnostic cytologi and its histopathologic bases, side 1200-1202 og 1211-1221. - Bancroft and Gamble, Theory and Practice of Histological Techniques, side 631.
Innført som rutine	Metoden har vært brukt rutinemessig over lang tid, og er godkjent av patolog.

Løsninger/kjemikalier

Oversikt over løsninger





Løsning/kjemikalier	Formel	Varenr.	Produsent/Leverandør
Metanol	CH ₄ O	20847-295	Prolabo /Chemi Teknik
Phosphate Buffer x50 concentrate (Sorensen) pH 6,8	-	PRC/R/185	Chemi Teknik
May-Grünwald	-	04703	Merck/Chemi Teknik
Giemsa	-	04706	Merck/Chemi Teknik

HMS: May Grünwald

Benytt vernehansker /verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm/avtrekk/maske etter bruksområde. Ved eksponering eller ubehag:
Kontakt umiddelbart et giftinformasjonssenter (22 59 13 00) eller lege.

Kjemikalie	Fare-symbol	Tiltak	Avfalls-håndtering
------------	-------------	--------	--------------------

http://eqshmr/cgi-bin/admin/document/document.pl?pid=hmr&RevisionID=89762&show_do... 27.03.2019

Metanol	 <p>H225 Meget brannfarlig væske og damp. H301 Giftig ved svelging. H311 Giftig ved hudkontakt. H331 Giftig ved innånding. H370 Forårsaker organskader</p>	<p>Ved hudkontakt: Vask med mye såpe og vann. Ved innånding: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende hviler i en stilling som letter åndedrettet. Oppbevares på et godt ventilert sted. Oppbevares kjølig.</p>	<p>Små mengder kan tømmes i etanolavfall. Merkes med avfallsetikett og nr. 7042.</p>
Phosphate buffer x50 concentrate (Sorensen) pH 6,8 er laget av Kaliumdi-hydrogenfosfat og Di-Natriumhydrogenfosfat 2- hydrat	<p>Stoffet trenger ingen faremerking i henhold til EU direktiv eller nasjonale forskrifter.</p>	<p>Bruk verneutstyr.</p>	<p>Kan tømmes i spylervasken. Skyll godt med vann.</p>
May-Grünwald	 <p>H225 Meget brannfarlig væske og damp. H301 Giftig ved svelging. H311 Giftig ved hudkontakt. H331 Giftig ved innånding. H370 Forårsaker organskader</p>	<p>Ved svelging: Skyll munnen. IKKE framkall brekning. Ved hudkontakt: Vask med mye såpe og vann. Ved innånding: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende hviler i en stilling som letter åndedrettet.</p>	<p>Samles i kanne. Merkes med avfallsetikett og nr. 7152.</p>
Giemsa	 <p>H225 Meget brannfarlig væske og damp. H301 Giftig ved svelging. H311 Giftig ved hudkontakt. H331 Giftig ved innånding. H370 Forårsaker organskader</p>	<p>Ved svelging: Skyll munnen. IKKE framkall brekning. Ved hudkontakt: Vask med mye såpe og vann. Ved innånding: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende hviler i en stilling som letter åndedrettet.</p>	<p>Giemsa samles i kanne merket med nr. 7152.</p>
Pertex	 <p>H226 Brannfarlig væske og damp. H304 Kan være dødelig ved svelging om det kommer ned i luftveiene. H312 Farlig ved hudkontakt. H315 Irriterer huden. H332 Farlig ved innånding. H373 Kan forårsake organskader ved langvarig eller gjentatt eksponering</p>	<p>Ved svelging: Skyll munnen. IKKE framkall brekning. Ved hudkontakt: Vask med mye såpe og vann. Ved innånding: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende hviler i en stilling som letter åndedrettet.</p>	<p>Brukes opp ved montering av dekkglass.</p>

Tillaging av løsninger

Alle løsninger ny-lages før bruk, vær spesielt obs på at det er ny metanol/fargeløsninger før farging av SPINALVÆSKE!

Metanol - ferdig til bruk, husk den må være NY (ren) før farging!.NB! Husk å fylle etter med metanol slik at hele objektglasset dekkes, dette for å unngå smitte.

Bruksløsning buffer lages av phosphate buffer x50 concentrate (Sorensen) pH 6,8. En flaske består av 100 ml som skal blandes med 5 Liter dH₂O. Anbefaler å lage halvparten av bufferløsningen hvor 50 ml konsentrert buffer fortynnes med 2,5 Liter dH₂O.

May Grünwald fargeløsning

May-Grünwald	50 ml	Ny-lages før bruk: Blandes godt og filtreres.
Bruksløsning buffer	50 ml	

Giemsa fargeløsning

Giemsa	10 ml	Ny-lages før bruk: Blandes godt og filtreres.
Bruksløsning buffer	90 ml	

Utførelse

Nr.	Løsninger	Tid	Kritisk punkt
	NB! Prøven må lufttørkes til det er tørt før farging.		
1	Metanol	20 min	Bruk ny metanol!
2	May-Grünwald fargeløsning	5 min	Nylaget.
3	Giemsa fargeløsning	15 min	Nylaget.
4	Skyll i bruksløsning (buffer 1)	20 s	Ny (ren)
5	Skyll i ny bruksløsning (buffer 2)	5 min	Ny (ren). Pass tiden!
6	Glassene tørkes i avtrekkskap, la de stå vertikalt til de er helt tørre, før montering		
7	Fargerresultat vurderes av screener		

Finnes i papirversjon på laboratoriet.

Vedlegg

 Utskriftsversjon av Farge:May-Grunwald Giemsa

Vedlegg 2: Skien sykehus:

Giemsa - fargemetode for Non Gyn cytologi. - FS Quality

Side 1 av 2



ID: 9054
Versjon: 1.0 (21.07.2017)

Type: Prosedyre
Revideres før: 01.04.2018

Giemsa - fargemetode for Non Gyn cytologi.

Distribuert til tarifold ved kjøleskap og perm merket "Klinisk Cytologi" på prøvemottaket.

1. HENSIKT

Sikre god teknisk fargekvalitet på prøvene for optimal diagnostisering.

Giemsa brukes til lufttørkede utstryk av væsker som ikke er tilsatt etanol, som tillegg til Pap-farging, og til å farge lufttørkede punksjonsutstryk. Både Giemsa og Pap fargemetode har ulemper og fordeler, og de utfyller hverandre.

2. MÅLGRUPPE

Ansatte på avdeling for patologi som preparerer non gyn cytologi prøver.

3. ANSVAR

Den som utfører arbeidet på laboratoriet er ansvarlig for at det utføres etter prosedyren.

Bioingeniør med delegert opplæringsansvar er ansvarlig for opplæring i bruk og oppdatering av prosedyren.

4. FREMANGSMÅTE

Giemsa-farging, etter den tyske kjemikeren og bakteriologen Gustav Giemsa (1867-1948), ble utviklet som fargemetode for blodutstryk.

For best mulig resultat må utstryket lufttørkes raskt med føner før fiksering i rektifisert etanol (den.96%).

4.1. Tillaging av Giemsa fargeløsning:

Sett glasstrakten med filterpapir i en 25 ml målesylinder.

Hell Giemsa farge i trakten, og la det dryppe til ca 3,75 ml. Fyll opp med Sørensens fosfatbuffer pH 6,8 til 25 ml. Overfør blandingen til et 50 ml glass fargekar. Ta ytterligere 25 ml buffer i fargekaret. Lag ny løsning hver dag.

Sett det lufttørkede preparatet i et kar med 96% etanol i minst 20 minutter.

Ta 50:50 mengde buffer(Sørensens fosfatbuffer pH 6.8) og springvann i et fargekar. Skyll preparatet i denne blandingen til væskeflaten er homogen.

Farg preparatet med Giemsa fargeløsning i 15 min (sett på klokke).

Skyll i springen og lufttørk med hårføner.

<https://kvalsys.sykehuspartner.no/>

03.04.2019

Legg opp med dekkglass. Glassene tørkes i varmeskap på cytologisk lab.

4.2. Sikkerhet:

Arbeidet utføres på avtrekksbenk. Bruk hansker.

4.3. Avfallshåndtering:

Dagens bruksløsning av Giemsa fargeløsning helles i kanne merket avfall Giemsa. Denne sendes til forbrenning etter prosedyre ID: 689 – Avfallhåndtering ved STHF.

DOKUMENTASJON

Utført fargemetode blir dokumentert i patologiprogrammet SymPathy.

REFERANSER

Clinical Cytotechnology, D.V.Coleman, P.A.Chapman

Etter Derk Berends' (nederlandsk patolog) anbefaling har vi byttet ut May-Grunwald Giemsa med bare Giemsa.

Manual and Atlas og Fine Needle Aspiration Cytologu. S.R.Orell, G.F.Sterrett. M.N-1.Walrers.D.Whitaker.

Rev./Dato	Avsnitt	Beskrivelse av endring	Referanse
2/ 12.8.13		Prosedyre skrevet i ny mal.	
3/05.06.15		Punkt om avfallshåndtering og sikkerhet.	

TQM ID 551

Dokumentinformasjon

ID:	9054	Versjon:	1.0
Type:	Prosedyre	Modul:	Kjernevirksomhet
Forfatter:	Kristin Kleppen	Godkjent av:	Kristin Kleppen (21.07.2017)
Revideres før:	01.04.2018		
Ansvarlig enhet:	🏥 Sykehuset Telemark HF / Sykehuset Telemark / Medisinsk serviceklinikk / Avdeling for patologi		
Adresse:	https://kvalsys.sykehuspartner.no/#/documents/9054		



ID: 9939
Versjon: Draft (-)

Type: Prosedyre
Revideres før:

Serøse væsker - preparering

Dette er versjon Draft av dokumentet. [Klikk her for å gå til gjeldende versjon \(1.0\).](#)

1. HENSIKT

Formålet med prosedyren er å unngå forbyttning av prøver og sikre god teknisk kvalitet på preparatene for optimal diagnostisering.

Prosedyren gjelder for serøse væsker fra pleura, ascites, bukhinne, perikard. Prosedyren omfatter preparering fram til prøvene er klare for farging.

2. MÅLGRUPPE

Teknisk personell som preparerer cytologiske prøver.

DEFINISJONER

Serøse væsker: Væske fra membranen som omgir kroppens hulrom.

KC: Klinisk Cytologi, betegnelse på alle cytologiske prøver med unntak av utstryk fra endometrium, cervix, vagina og vulva.

Pap: Papanicolaous fargemetode, rutinefarge.

Rpm: Revolutions per minute. Mål på sentrifugens rotasjonshastighet.

3. ANSVAR

Rekvirenten er ansvarlig for at prøven blir behandlet etter retningslinjer for innsending av serøse væsker.

Bioingeniøren som står oppført på lab på arbeidslista er ansvarlig for at prosedyren utføres og at eventuelle feil ved innsending og prosessering av prøven blir registrert i TOM og/eller Sympathy.

Bioingeniøren med delegert opplæringsansvar er ansvarlig for opplæring i bruk av prosedyren og oppdatering av prosedyren.

4. FREMGANGSMÅTE

- Sjekk at navn og fødselsnummer på glass og remisse stemmer overens.
- Registrer prøven i Sympathy (se prosedyre for registrering av prøver). I labbildet bestilles to pap dersom prøven er tilsatt sprit eller en pap og en giemsa dersom prøven ikke er tilsatt sprit. Prøven blir blakket dersom den er tilsatt sprit.

- Bruk vanlige objektglass og merk glassene med KC, prøvenummer og henholdsvis A og B. **NB se punkt 4.1**
- Om prøven mottas på andre glass en standard 20 ml prøveglass, må det overføres ca 20 ml væske (eller så mye som mulig) til et standardglass. Merk glasset med navn og fødselsnummer.
- Sentrifuger prøven i 7 min ved 2000 rpm (Centrifuge 5702).
- Hell eller pipetter av supernatanten og bland opp bunnfallet. Det bør være ca 1 ml igjen i glasset.
- **Som regel vil bunnfallet være så tykt at det kan lages direkte utstryk:**
 1. Legg et par dråper på det ene glasset og legg det andre glasset over.
 2. Stryk dem fra hverandre og fikser glasset merket A dersom væsken er ufiksert. Hold sprayen minst 20 cm unna glasset og bruk rikelig med spray.
 3. Om væsken er fiksert gjentas punkt 2 med glass merket B. Er væsken ufiksert lufttørkes utstryket og farges med giemsa.
- **Dersom bunnfallet er tynt lages det cytospin (se prosedyre for cytospin):**
 1. Klargjør glassene for cytospin og finn fram cytospinkarusellen. Merk filtrene med P for pap og G for giemsa hvis væsken er ufiksert.
 2. Sett klipsene i motstående posisjoner i karusellen. For oversiktens skyld bør man alltid begynne med posisjon nr. 1. Utstryket som skal fikseres settes her.
 3. Pipetter ca 0,5 ml i hver trakt.
 4. Sett karusellen i cytosentrifugen og velg program nr. 1 (4 min ved 1500 rpm. Trykk load, deretter 1 og enter).
 5. Trykk start.
 6. Etter endt sentrifugering sprayfikseres utstrykene merket P med CytoFix. Hold sprayen minst 20 cm unna glasset.
 7. Utstryk merket G lufttørkes.
 8. Legg klips og trakter i 70 % etanol (hvit plastbøtte i avtrekket). Filtrene kastes i risikoavfall.
 - Legg prøveglassene under riktig dag i kjøleskapet. Oppbevares en uke.
 - Utstrykene bør tørke ca en time før farging.
 - Når utstrykene som skal papfarges har tørket settes de i stativ med materialsiden fram. Begynn bakerst i stativet.
 - Utstrykene som skal giemsafarges settes i ståglass med 96 % alkohol.

4.1. Preparering av pleura og ascites til Thin Prep.

Pleura og ascitesvæske skal prepareres med et glass til Giemsa farging som merkes B - restmateriale overføres i en Thin Prep beholder og fremføres på Thin Prep maskinen - glasset merkes A med tusj.

Vær oppmerksom på at prøven bør vaskes så fort en ser noe rødt bunnfall

4.2. Avfallshåndtering:

Supernatanten kastes i vasken. La vannet renne.

Brukt engangsutstyr som pipetter, petriskåler, filtre og prøveglass kastes i den gule plastdunken under benken. Prøveglass som har stått i kjøleskapet en uke kastes også her.

Hansker og papir kastes ikke i dunken, men i søppelbøtta. De gule plastdunkene er svært dyre og bør ikke fylles fortere enn nødvendig. Når de er fulle bringes de til avfallsrommet. Sett på lokk og merkelapp med "biologisk avfall".

DOKUMENTASJON

Initialene til bioingeniøren som har preparert prøven blir registrert i Sympathy.

Eventuelle avvik blir dokumentert i TQM og/eller Sympathy.


REFERANSER

Tidligere prosedyrer.

Relaterte dokumenter

 Vasking av blodige cytologiprøver.

Dokumentinformasjon

ID:	9939	Versjon:	Draft
Type:	Prosedyre	Modul:	Kjernevirksomhet
Forfatter:	Kristin Kleppen	Godkjent av:	(-)
Revideres før:	-		
Ansvarlig enhet:	 Sykehuset Telemark HF / Sykehuset Telemark / Medisinsk serviceklinikk / Avdeling for patologi / seksjon for patologi		
Adresse:	https://kvalsys.sykehuspartner.no/#/documents/9939/revisions/Draft		

Giemsa for cytologi

Forfatter: Anita Giske, Hilde Guttormsen
 Godkjent av: Hilde Guttormsen

Gyldig fra: 15.05.2017
 Revisjonsfrist: 14.05.2020

Revisjon: 1.6
 ID: 10649

Hensikt

Giemsa farges på utstryk for å kunne differensiere neutrofile, eosinofile og basofile granulocytter i den myeloide rekke av blodceller. Man ønsker også å kunne differensiere modne og umodne myelocytter.

Ansvar

Screenere har ansvar for oppdatering av prosedyren. Alle ved cytologi lab har ansvar for å lage løsninger, samt utføre fargingen etter prosedyren.

Analyseprinsipp

Ved denne fargeteknikken anvendes anion- og kationfargestoff i samme oppløsning. Prinsipielt vil alle strukturer med ioniserende grupper farges. Om gruppene er ionisert eller ikke er avhengig av pH miljøet proteinet befinner seg i. Riktig pH er da viktig for å oppnå ønsket resultat. Eosin er anionfargestoff gir ulike nyanser av rødfarger. Eosin er lett oppløselig i vann og tungt oppløselig i alkohol. Kationfargestoffet metylenblått og oksyderte derivater av metylenblått gir blå fargenyanser. Stoffet er løselig i vann og alkohol.

HMS

Bruk alltid hansker i kontakt med fargeløsninger og andre kjemikalier. Arbeid i avtrekksskap (evt. vernebriller/friskluftsmaske). Ved søl på øye eller hud, skyll lenge med vann. Forhåndsregler ut over dette vil stå i tabell.

Kjemikalie	Faresymbol	Forhåndsregler	Avfalls-håndtering
Metanol			Samles opp, avfallsnr 7042
May Grunwald bruksløsning			Samles opp, avfallsnr 7152
Giemsa bruksløsning			Samles opp, avfallsnr 7152
Sørensens fosfatbuffer	Ikke merkepliktig		Skylles i avløp med mye vann
Etanol			Eget avløp. Se  Håndtering av xylene, sprit og formalin (Gyldig)
Xylen			
Pertex			Løses i xylene, avfall som xylene.
May Grunwald stamløsning			Samles opp, avfallsnr 7152
Giemsa stamløsning			Samles opp, avfallsnr 7152

Arbeidsbeskrivelse**Analysemateriale**

Lufttørket materiale som crista, sternalmarg, rullepreparat fra beinmarg, blodutstryk, spinalvæske og lignende.

Farging

- Utstrykene fikseres 15 min. i Metanol.
- Farges 5 min. i May-Grünwald bruksløsning.
- Farges 15 min. i Giemsa bruksløsning.
- Skyll av fargevæsken med Sørensens fosfatbuffer bruksløsning.
- La utstrykene stå i 5 min. i Sørensens fosfatbuffer bruksløsning.
- Lufttørkes før de legges opp med Xylen, Pertex og dekkglass.

Reagenser

Metanol

Sørensens fosfatbuffer stamløsning pH 6,8:

- 51 ml av Løsning A
- 49 ml av Løsning B
- 100 ml rensa vann

Still inn pH 6,8 med 2 M NaOH eller 2 M HCL. Oppbevares i kjøleskap.

- Løsning A: 13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (N 9) i 500 ml rensa vann
- Løsning B: 14,2 g Na_2HPO_4 vannfri (N 8) i 500 ml rensa vann.

Sørensens fosfatbuffer bruksløsning:

20 ml Sørensens fosfatbuffer stamløsning + 380 ml rensa vann. Oppbevares i romtemperatur.

May-Grünwald:

Eosin-Metylenblått. Oppbevares i romtemperatur.

May-Grünwald bruksløsning:

45 ml May-Grünwald + 45 ml Sørensens fosfatbuffer bruksløsning. Holdbar i 2-3 døgn i romtemperatur.

Giemsa:

Azur-Eosin-metylenblått. Oppbevares i romtemperatur.

Giemsa bruksløsning:

8 ml Giemsa + 72 ml Sørensens fosfatbuffer bruksløsning. Bruksløsningen filtreres før bruk. Holdbar i 2-3 døgn i romtemperatur.

Resultater

Kjerner	Blå	
Cytoplasma	Eosine granulocytter	røde granula
	Basofile granulocytter	blå/svarte granula
	Nøytrofile granulocytter	svakt farget azurblått cytoplasma

Relevant/Vedlegg

Stoffkartotek, [Ecoonline](#). Firmakode 71. Brukernavn/passord behøves ikke.

 Håndtering av xylen, etanol og formalin (*Gyldig*)

 Håndtering av kjemikalier ved Avdeling for patologi, Ålesund HMRHF (*Høringsrunde*)

Papirkopi

To eksemplarer ved cytologi lab, i prosedyreperm og i avtrekksskap.

Vedlegg 4: Haukeland sykehus

Hei, jo vi farger alltid halvparten pap, ved ufiksert blir det da et utstryk og en cytospin som er pap og de andre maygr/giemsa. Jeg er ikke sikker på hvorfor vi både lager cytospin og utstryk, tror det er fordi noen væsker har lite celler, og egner seg for cytospin mens andre har mye og derfor lager vi med begge metodene (det vurderes ikke cellemengde på forhånd).

På Ullevål da jeg var der, så brukte vi cytospin for serøse væsker, et pap og et grynw/giemsa, men da var vi mye flinkere til å vurdere celleinnholdet i væskene på forhånd og fortynnet eventuelle væsker på forhånd. På Haukeland har jeg prøvd å innføre dette, men de har ikke vært mottakelig for forslag tidligere. Da kunne vi ha klart oss med kun cytospin.

Steg	Navn på løsning	Tid	Forsinkelse	Miksing
1	Startstasjon	-	-	-
2	Metanol	0:15:00	**	På
3	May-Grünwald	0:05:00	50 %	På
4	Giemsas	0:15:00	50 %	På
5	Sørensens buffer	0:00:05	**	På
6	Sørensens buffer	0:05:00	**	På
7	Tørkestasjon	0:15:00	**	Av
8	Endestasjon	-	-	-

- **Giemsas/May Grünwald:**
 - May Grünwald helles direkte i kar uforynnet.
 - Giemsas fortyndes med Sørensens bufferløsning i forholdet: 20 ml Giemsas til 280 ml fortyndet Sørensens bufferløsning, 300 ml totalvolum.
 - May Grünwald- og Giemsas-karene fylles opp til ca. 1 cm under nederste strek.
- Maskinen slås på. Bruker logger på. Kvitter i instrumentlogg for gjennomført oppstart/vedlikehold.

SIKKERHETS DATBLAD	
Colorrapid B	

Sikkerhetsdatabladet er i samsvar med Kommissjonsforordning (EU) 2015/830 av 28 mai 2015 om endring av europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering, godkjenning og begrensning av kjemikalier (REACH)

AVSNITT 1: IDENTIFIKASJON AV STOFFET / STOFFBLANDINGEN OG AV SELSKAPET / FORETAKET

Utgitt dato	01.11.2007
Revisjonsdato	06.09.2017

1.1. Produktidentifikator

Kjemikaliets navn	Colorrapid B
Artikkelnr.	L2504

1.2. Relevante identifiserte bruksområder for stoffet eller stoffblandingen og bruk som frarådes

Kjemikaliets bruksområde	Kjemikalie til laboratorie- og teknisk bruk.
--------------------------	--

1.3. Opplysninger om leverandøren av sikkerhetsdatabladet

Etterfølgende bruker

Firmanavn	MED-KJEMI AS
Besøksadresse	Drengsrudbekken 9
Postadresse	Postboks 413
Postnr.	1373
Poststed	ASKER
Land	NORGE
Telefon	66764900
Telefaks	66764901
E-post	firmapost@med-kjemi.no
Hjemmeside	http://www.med-kjemi.no/
Org. nr.	943568758
Kontaktperson	Med-Kjemi AS

1.4. Nødtelefonnummer

Nødtelefon	Telefon: 22 59 13 00 Beskrivelse: Giftinformasjonssentralen
------------	--

AVSNITT 2: FAREIDENTIFIKASJON

2.1. Klassifisering av stoffet eller stoffblandingen

CLP Klassifisering, kommentarer Er ikke klassifisert som farlig stoff i henhold til (EF) nr. 1272/2008.

2.2. Merkingselementer

Annen merkeinformasjon (CLP) Produktet er ikke merkepliktig.

2.3. Andre farer

PBT / vPvB Dette produktet inneholder ingen PBT/vPvB kjemikalier.

AVSNITT 3: SAMMENSETNING/OPPLYSNINGER OM BESTANDELER

3.2. Stoffblandinger

Komponentkommentarer Vandig buffer - fargeløsning.

AVSNITT 4: FØRSTEHJELPSTILTAK

4.1. Beskrivelse av førstehjelpstiltak

Generelt	I tvilstilfelle bør lege kontaktes.
Innånding	Frisk luft, ro og varme.
Hudkontakt	Vask med mye vann. Fjern tilsølte klær.
Øyekontakt	Skyll straks med mye vann i minst 15 minutter. Kontakt lege ved vedvarende irritasjon.
Svelging	Drick store mengder vann og fremkall brekninger. Kontakt lege.

4.2. De viktigste symptomene og virkningene, både akutte og forsinkede

Generelle symptomer og virkninger Informasjon om helseeffekter og symptomer funnet i Seksjon 11.

4.3. Angivelse av om umiddelbar legehjelp og spesialbehandling er nødvendig

Medisinsk behandling Symptomatisk.

AVSNITT 5: BRANNSLOKKINGSTILTAK

5.1. Slokkingsmidler

Egnede slokkingsmidler Bruk slukningsmiddel som egner seg for brann i omgivelsene.

5.2. Særlige farer knyttet til stoffet eller stoffblandingen

Brann- og eksplosjonsfarer Ikke brannfarlig.

5.3. Råd til brannmannskaper

AVSNITT 2: FAREIDENTIFIKASJON

2.1. Klassifisering av stoffet eller stoffblandingen

CLP Klassifisering, kommentarer Er ikke klassifisert som farlig stoff i henhold til (EF) nr. 1272/2008.

2.2. Merkingselementer

Annen merkeinformasjon (CLP) Produktet er ikke merkepliktig.

2.3. Andre farer

PBT / vPvB Dette produktet inneholder ingen PBT/vPvB kjemikalier.

AVSNITT 3: SAMMENSETNING/OPPLYSNINGER OM BESTANDDELER

3.2. Stoffblandinger

Komponentkommentarer Vandig buffer - fargeløsning.

AVSNITT 4: FØRSTEHJELPSTILTAK

4.1. Beskrivelse av førstehjelpstiltak

Generelt	I tvilstilfelle bør lege kontaktes.
Innånding	Frisk luft, ro og varme.
Hudkontakt	Vask med mye vann. Fjern tilsølte klær.
Øyekontakt	Skyll straks med mye vann i minst 15 minutter. Kontakt lege ved vedvarende irritasjon.
Svelging	Drikk store mengder vann og fremkall brekninger. Kontakt lege.

4.2. De viktigste symptomene og virkningene, både akutte og forsinkede

Generelle symptomer og virkninger Informasjon om helseeffekter og symptomer funnet i Seksjon 11.

4.3. Angivelse av om umiddelbar legehjelp og spesialbehandling er nødvendig

Medisinsk behandling Symptomatisk.

AVSNITT 5: BRANNSLOKKINGSTILTAK

5.1. Slukkingsmidler

Egnede slukkingsmidler Bruk slukningsmiddel som egner seg for brann i omgivelsene.

5.2. Særlige farer knyttet til stoffet eller stoffblandingen

Brann- og eksplosjonsfarer Ikke brannfarlig.

5.3. Råd til brannmannskaper

Øye- / ansiktsvern

Øyevern	Bruk egnede vernebriller.
---------	---------------------------

Håndvern

Håndvern	Benytt hansker, iht. standard NS-EN 374, av motstandsdyktig materiale (f.eks. nitrilgummi, tykkelse 0,11 mm, gjennomtrengningstid > 480 min.). Be alltid hanskeleverandøren om veiledning.
----------	--

Hudvern

Annet hudvern enn håndvern	Benytt laboratoriefrakk.
----------------------------	--------------------------

Åndedrettsvern

Åndedrettsvern	Bruk egnet åndedrettsvern ved dannelse av damp/aerosol. Kontakt og rådfør med leverandør av verneutstyr.
----------------	--

AVSNITT 9: FYSISKE OG KJEMISKE EGENSKAPER**9.1. Opplysninger om grunnleggende fysiske og kjemiske egenskaper**

Tilstandsform	Væske
Farge	Mørk blå
Lukt	Luktfri
pH	Status: I handelsvare Verdi: 6,8
Relativ tetthet	Verdi: 1,01 g/cm ³
Løselighet i vann	Løselig.

9.2. Andre opplysninger**Andre fysiske og kjemiske egenskaper**

Kommentarer	Ingen anbefaling angitt.
-------------	--------------------------

AVSNITT 10: STABILITET OG REAKTIVITET**10.1. Reaktivitet**

Reaktivitet	Ingen kjente farlige reaksjoner.
-------------	----------------------------------

10.2. Kjemisk stabilitet

Stabilitet	Produktet er stabilt ved de angitte lagrings- og bruksbetingelsene.
------------	---

10.3. Risiko for farlige reaksjoner

Risiko for farlige reaksjoner	Ikke kjent.
-------------------------------	-------------

10.4. Forhold som skal unngås

Forhold som skal unngås	Unngå kraftig oppvarming.
-------------------------	---------------------------

10.5. Uforenlige materialer

Materialer som skal unngås	Unngå kontakt med stoffer som reagerer med vann.
----------------------------	--

10.6. Farlige nedbrytningsprodukter

Farlige spaltningsprodukter	Data mangler.
-----------------------------	---------------

AVSNITT 11: TOKSIKOLOGISKE OPPLYSNINGER

11.1. Opplysninger om toksikologiske virkninger

Øvrige helsefareopplysninger

Generelt	Toksikologiske data for produktet er ikke tilgjengelig. Sannsynligheten for at produktet skal ha noen toksiske effekter av betydning er liten pga. lav konsentrasjon av stoffer i vannløsningen. Man skal likevel ta forholdsregler som ved håndtering av kjemikalier generelt.
Innånding	Unngå innånding av damp.
Hudkontakt	Langvarig kontakt kan føre til tørr og sprukket hud.
Øyekontakt	Kan forårsake forbigående irritasjon.
Svelging	Kan gi ubehag ved svelging.
Vurdering av akutt toksisitet, klassifisering	Kriteriene for klassifisering er på grunnlag av de tilgjengelige data ikke ansett å være oppfylt.
Vurdering hudetsende / hudirriterende, klassifisering	Kriteriene for klassifisering er på grunnlag av de tilgjengelige data ikke ansett å være oppfylt.
Vurdering øyeskade / øyeirritasjon, klassifisering	Kriteriene for klassifisering er på grunnlag av de tilgjengelige data ikke ansett å være oppfylt.
Allergi	Kriteriene for klassifisering er på grunnlag av de tilgjengelige data ikke ansett å være oppfylt.
Vurdering av arvestoffskadelig virkning på kjønnseller, klassifisering	Ingen kjente kroniske eller akutte helsefarer.
Kreftfremkallende egenskaper, annen informasjon	Kriteriene for klassifisering er på grunnlag av de tilgjengelige data ikke ansett å være oppfylt.
Vurdering av reproduksjonstoksitet, klassifisering	Kriteriene for klassifisering er på grunnlag av de tilgjengelige data ikke ansett å være oppfylt.
Vurdering av bestemt målorgan SE, klassifisering	Kriteriene for klassifisering er på grunnlag av de tilgjengelige data ikke ansett å være oppfylt.
Vurdering av bestemt målorgan RE, klassifisering	Kriteriene for klassifisering er på grunnlag av de tilgjengelige data ikke ansett å være oppfylt.
Vurdering av aspirasjonsfare, klassifisering	Basert på tilgjengelige data er klassifiseringskriteriene ikke oppfylt.

AVSNITT 12: ØKOLOGISKE OPPLYSNINGER

12.1. Giftighet

Økotoksisitet	Økotoksdata er ikke tilgjengelig.
---------------	-----------------------------------

12.2. Persistens og nedbrytbarhet

Persistens- og nedbrytbarhetsbeskrivelse	Data mangler.
--	---------------

12.3. Bioakkumuleringsevne

Bioakkumuleringspotensial	Ingen data tilgjengelig.
---------------------------	--------------------------

12.4. Mobilitet i jord

Mobilitet	Er vannløselig og kan lett spres i vannmiljøet.
-----------	---

12.5. Resultater av PBT- og vPvB-vurdering

PBT vurderingsresultat	Klassifiseres ikke som PBT / vPvB i henhold til någjeldende EU-kriterier.
------------------------	---

12.6. Andre skadevirkninger

Miljøopplysninger, konklusjon	Forhindrer utslipp til kloakk, vassdrag eller grunn.
-------------------------------	--

AVSNITT 13: SLUTTBEHANDLING

13.1. Avfallsbehandlingsmetoder

Egnede metoder til fjerning av kjemikaliet	Leveres til godkjent mottak for avfall. Avfallskoden over er en anbefaling. Det er opp til brukeren av kjemikaliet å bestemme avfallskoden ut fra bruksområdet.
Avfallskode EAL	EAL: 16 05 09 andre kasserte kjemikalier enn dem nevnt i 16 05 06, 16 05 07 eller 16 05 08

AVSNITT 14: TRANSPORTOPPLYSNINGER

Farlig gods	Nei
-------------	-----

14.1. FN-nummer

Kommentarer	Ikke klassifisert som farlig gods.
-------------	------------------------------------

14.2. FN-forsendelsesnavn

Kommentarer	Ikke relevant.
-------------	----------------

14.3. Transportfareklasse(r)

Kommentarer	Ikke relevant.
-------------	----------------

14.4. Emballasjegruppe

Kommentarer	Ikke relevant.
-------------	----------------

14.5. Miljøfarer

ADR / RID / ADN	Nei
-----------------	-----

IMDG	Nei
------	-----

14.6. Særlige forsiktighetsregler ved bruk

Spesielle forholdsregler	Ingen anbefaling angitt.
--------------------------	--------------------------

14.7. Bulktransport i henhold til vedlegg II i MARPOL 73/78 og IBC-regelverket

Andre relevante opplysninger

Andre relevante opplysninger	Ikke klassifisert som farlig gods.
------------------------------	------------------------------------

AVSNITT 15: OPPLYSNINGER OM REGELVERK

15.1. Særlige bestemmelser/særskilt lovgivning om sikkerhet, helse og miljø for stoffet eller stoffblandingen

Referanser (Lover/Forskrifter)	Europaparlamentet og rådsforordning (EF) nr 1907/2006(REACH). Kommisjonsforordning EF) nr 453/2010 av 20. mai 2010 om endring. Europaparlamentet og rådsforordning (EF) nr 1907/2006 om registrering, vurdering, godkjenning og begrensning av kjemikalier. Annex II Sikkerhetsdatablad. Europaparlamentet og rådsforordning (EF) nr 1272/2008, CLP.
--------------------------------	---

15.2. Vurdering av kjemikaliesikkerhet

Vurdering av kjemikaliesikkerhet er gjennomført	Nei
---	-----

AVSNITT 16: ANDRE OPPLYSNINGER

Leverandørens anmerkninger	Denne informasjon er basert på nåværende nivå i følge vårt kjennskap. Informasjonen vil imidlertid ikke kunne gi forsikringer når det gjelder produktegenskaper og etablerer ingen legale kontraktforhold. Mottakeren av vårt produkt er fullstendig ansvarlig for å iakttatte eksisterende lover og regler.
----------------------------	--

Liste over relevante H-setninger (i avsnitt 2 og 3).	
--	--

Opplysninger som er nye, slettet eller revidert	Oppdatert i henhold til vedlegg II og CLP
---	---

Versjon	2
---------	---

SIKKERHETS DATABLAD

Colorrapid A



Sikkerhetsdatabladet er i samsvar med Kommissjonsforordning (EU) 2015/830 av 28 mai 2015 om endring av europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering, godkjenning og begrensnings av kjemikalier (REACH)

AVSNITT 1: IDENTIFIKASJON AV STOFFET / STOFFBLANDINGEN OG AV SELSKAPET / FORETAKET

Utgitt dato	01.11.2007
Revisjonsdato	06.09.2017

1.1. Produktidentifikator

Kjemikaliets navn	Colorrapid A
Artikkelnr.	L2503

1.2. Relevante identifiserte bruksområder for stoffet eller stoffblandingen og bruk som frarådes

Kjemikaliets bruksområde	Kjemikalie til laboratorie- og teknisk bruk.
--------------------------	--

1.3. Opplysninger om leverandøren av sikkerhetsdatabladet

Etterfølgende bruker

Firmanavn	MED-KJEMI AS
Besøksadresse	Drengsrudbekken 9
Postadresse	Postboks 413
Postnr.	1373
Poststed	ASKER
Land	NORGE
Telefon	66764900
Telefaks	66764901
E-post	firmapost@med-kjemi.no
Hjemmeside	http://www.med-kjemi.no/
Org. nr.	943568758
Kontaktperson	Med-Kjemi AS

1.4. Nødtelefonnummer

Nødtelefon	Telefon: 22 59 13 00 Beskrivelse: Giftinformasjonssentralen
------------	--

AVSNITT 2: FAREIDENTIFIKASJON

2.1. Klassifisering av stoffet eller stoffblandingen

CLP Klassifisering, kommentarer Er ikke klassifisert som farlig stoff i henhold til (EF) nr. 1272/2008.

2.2. Merkingselementer

Annen merkeinformasjon (CLP) Produktet er ikke merkepliktig.

2.3. Andre farer

PBT / vPvB Dette produktet inneholder ingen PBT/vPvB kjemikalier.

AVSNITT 3: SAMMENSETNING/OPPLYSNINGER OM BESTANDDELER

3.2. Stoffblandinger

Komponentkommentarer Vandig buffer - fargeløsning.

AVSNITT 4: FØRSTEHJELPSTILTAK

4.1. Beskrivelse av førstehjelpstiltak

Generelt	I tvilstilfelle bør lege kontaktes.
Innånding	Frisk luft, ro og varme.
Hudkontakt	Vask med mye vann. Fjern tilsølte klær.
Øyekontakt	Skyll straks med mye vann i minst 15 minutter. Kontakt lege ved vedvarende irritasjon.
Svelging	Drikk store mengder vann og fremkall brekninger. Kontakt lege.

4.2. De viktigste symptomene og virkningene, både akutte og forsinkede

Generelle symptomer og virkninger Data mangler.

4.3. Angivelse av om umiddelbar legehjelp og spesialbehandling er nødvendig

Medisinsk behandling Symptomatisk.

AVSNITT 5: BRANNSLOKKINGSTILTAK

5.1. Slokkingsmidler

Egnede slokkingsmidler Bruk slukningsmiddel som egner seg for brann i omgivelsene.

5.2. Særlige farer knyttet til stoffet eller stoffblandingen

Brann- og eksplosjonsfarer Ikke brannfarlig.

5.3. Råd til brannmannskaper

Personlig verneutstyr	Ved omfattende brann må brannpersonell benytte egnet åndedrettsvern og verneutstyr.
Brannsløkkingsmetoder	Unngå at slukningsvann kommer ut i avløp, overflate- eller grunnvann.

AVSNITT 6: TILTAK VED UTILSIKTEDE UTSLIPP

6.1. Personlige forsiktighetsregler, personlig verneutstyr og nødrutiner

Sikkerhetstiltak for å beskytte personell	Unngå kontakt med hud og øyne. Unngå innånding av damp. Bruk egnet verneutstyr, se pkt. 8.
---	--

6.2. Forsiktighetsregler med hensyn til miljø

Sikkerhetstiltak for å beskytte ytre miljø	Unngå utslipp til avløp.
--	--------------------------

6.3. Metoder og materialer for oppsamling og rensing

Metoder for opprydding og rengjøring	Tas opp med egnet absorpsjonsmiddel (f.eks. Chemizorb) og samles i egnet beholder for avfallsbehandling, se pkt. 13. Vask området grundig.
--------------------------------------	--

6.4. Henvisning til andre avsnitt

Ytterligere informasjon	Ingen anbefaling angitt.
-------------------------	--------------------------

AVSNITT 7: HÅNTERING OG LAGRING

7.1. Forsiktighetsregler for sikker håndtering

Håndtering	Unngå kontakt med øyne, hud og tøy. Unngå innånding av damp.
------------	--

7.2. Vilkår for sikker lagring, herunder eventuelle uforenligheter

Oppbevaring	Hold beholderne tett lukket på et tørt og godt ventilert sted ved 15 - 25 °C. Holdes vekk fra antennelseskilder og varme.
-------------	---

7.3. Særlig(e) sluttanvendelse(r)

Spesielle bruksområder	Identifiserte bruksområder for dette produktet er beskrevet i punkt 1.2.
------------------------	--

AVSNITT 8: EKSPONERINGSKONTROLL / PERSONLIG VERNEUTSTYR

8.1. Kontrollparametere

Annen informasjon om grenseverdier	Inneholder ingen stoffer med administrativ norm for forurensning i arbeidsatmosfære.
------------------------------------	--

8.2. Eksponeringskontroll

Begrensning av eksponering på arbeidsplassen	Sørg for god ventilasjon. Unngå kontakt med hud og øyne. Vask hender godt før pauser og etter endt arbeid. Skift/fjern tilsølt tøy. Øyespylingsmuligheter bør finnes på arbeidsplassen. Følg generell god kjemikaliehygiene.
--	--

Øye- / ansiktsvern

Øyevern	Bruk egnede vernebriller.
---------	---------------------------

Håndvern

Håndvern	Benytt hansker, iht. standard NS-EN 374, av motstandsdyktig materiale (f.eks. nitrilgummi, tykkelse 0,11 mm, gjennomtrengningstid > 480 min.). Be alltid hanskeleverandøren om veiledning.
----------	--

Hudvern

Annet hudvern enn håndvern	Benytt laboratoriefrakk.
----------------------------	--------------------------

Åndedrettsvern

Åndedrettsvern	Bruk egnet åndedrettsvern ved dannelse av damp/aerosol. Kontakt og rådfør med leverandør av verneutstyr.
----------------	--

AVSNITT 9: FYSISKE OG KJEMISKE EGENSKAPER**9.1. Opplysninger om grunnleggende fysiske og kjemiske egenskaper**

Tilstandsform	Væske
Farge	Orange-rød
Lukt	Luktfri
pH	Status: I handelsvare Verdi: 6,8
Relativ tetthet	Verdi: 1,01 g/cm ³
Løselighet i vann	Løselig.

9.2. Andre opplysninger**Andre fysiske og kjemiske egenskaper**

Kommentarer	Ingen anbefaling angitt.
-------------	--------------------------

AVSNITT 10: STABILITET OG REAKTIVITET**10.1. Reaktivitet**

Reaktivitet	Ingen kjente farlige reaksjoner.
-------------	----------------------------------

10.2. Kjemisk stabilitet

Stabilitet	Produktet er stabilt ved de angitte lagrings- og bruksbetingelsene.
------------	---

10.3. Risiko for farlige reaksjoner

Risiko for farlige reaksjoner	Ikke kjent.
-------------------------------	-------------

10.4. Forhold som skal unngås

Forhold som skal unngås	Unngå kraftig oppvarming.
-------------------------	---------------------------

10.5. Uforenlige materialer

Materialer som skal unngås	Unngå kontakt med stoffer som reagerer med vann.
----------------------------	--

10.6. Farlige nedbrytningsprodukter

Farlige spaltlingsprodukter	Data mangler.
-----------------------------	---------------

AVSNITT 11: TOKSIKOLOGISKE OPPLYSNINGER**11.1. Opplysninger om toksikologiske virkninger****Øvrige helsefareopplysninger**

Generelt	Toksikologiske data for produktet er ikke tilgjengelig. Sannsynligheten for at produktet skal ha noen toksiske effekter av betydning er liten pga. lav konsentrasjon av stoffer i vannløsningen. Man skal likevel ta forholdsregler som ved håndtering av kjemikalier generelt.
Innånding	Unngå innånding av damp.
Hudkontakt	Langvarig kontakt kan føre til tørr og sprukket hud.
Øyekontakt	Kan forårsake forbigående irritasjon.
Svelging	Kan gi ubehag ved svelging.
Vurdering av akutt toksisitet, klassifisering	Kriteriene for klassifisering er på grunnlag av de tilgjengelige data ikke ansett å være oppfylt.
Vurdering hudetsende / hudirriterende, klassifisering	Kriteriene for klassifisering er på grunnlag av de tilgjengelige data ikke ansett å være oppfylt.
Vurdering øyeskade / øyeirritasjon, klassifisering	Kriteriene for klassifisering er på grunnlag av de tilgjengelige data ikke ansett å være oppfylt.
Allergi	Kriteriene for klassifisering er på grunnlag av de tilgjengelige data ikke ansett å være oppfylt.
Vurdering av arvestoffskadelig virkning på kjønnseller, klassifisering	Ingen kjente kroniske eller akutte helsefarer.
Kreftfremkallende egenskaper, annen informasjon	Kriteriene for klassifisering er på grunnlag av de tilgjengelige data ikke ansett å være oppfylt.
Vurdering av reproduksjonstoksitet, klassifisering	Kriteriene for klassifisering er på grunnlag av de tilgjengelige data ikke ansett å være oppfylt.
Vurdering av bestemt målorgan SE, klassifisering	Basert på tilgjengelige data er klassifiseringskriteriene ikke oppfylt.
Vurdering av aspirasjonsfare, klassifisering	Basert på tilgjengelige data er klassifiseringskriteriene ikke oppfylt.

AVSNITT 12: ØKOLOGISKE OPPLYSNINGER

12.1. Giftighet

Økotoksitet	Økotoksdata er ikke tilgjengelig.
-------------	-----------------------------------

12.2. Persistens og nedbrytbarhet

Persistens- og nedbrytbarhetsbeskrivelse	Data mangler.
--	---------------

12.3. Bioakkumuleringsevne

Bioakkumuleringspotensial	Ingen data tilgjengelig.
---------------------------	--------------------------

12.4. Mobilitet i jord

Mobilitet	Er vannløselig og kan lett spres i vannmiljøet.
-----------	---

12.5. Resultater av PBT- og vPvB-vurdering

PBT vurderingsresultat	Klassifiseres ikke som PBT / vPvB i henhold til någjeldende EU-kriterier.
------------------------	---

12.6. Andre skadevirkninger

Miljøopplysninger, konklusjon	Forhindre utslipp til kloakk, vassdrag eller grunn.
-------------------------------	---

AVSNITT 13: SLUTTBEHANDLING**13.1. Avfallsbehandlingsmetoder**

Egnede metoder til fjerning av kjemikaliet	Leveres til godkjent mottak for avfall. Avfallskoden over er en anbefaling. Det er opp til brukeren av kjemikaliet å bestemme avfallskoden ut fra bruksområdet.
Avfallskode EAL	EAL: 16 05 09 andre kasserte kjemikalier enn dem nevnt i 16 05 06, 16 05 07 eller 16 05 08

AVSNITT 14: TRANSPORTOPPLYSNINGER

Farlig gods	Nei
-------------	-----

14.1. FN-nummer

Kommentarer	Ikke klassifisert som farlig gods.
-------------	------------------------------------

14.2. FN-forsendelsesnavn

Kommentarer	Ikke relevant.
-------------	----------------

14.3. Transportfareklasse(r)

Kommentarer	Ikke relevant.
-------------	----------------

14.4. Emballasjegruppe

Kommentarer	Ikke relevant.
-------------	----------------

14.5. Miljøfarer

ADR / RID / ADN	Nei
-----------------	-----

14.6. Særlige forsiktighetsregler ved bruk

Spesielle forholdsregler	Ingen anbefaling angitt.
--------------------------	--------------------------

14.7. Bulktransport i henhold til vedlegg II i MARPOL 73/78 og IBC-regelverket**Andre relevante opplysninger**

Andre relevante opplysninger	Ikke klassifisert som farlig gods.
------------------------------	------------------------------------

AVSNITT 15: OPPLYSNINGER OM REGELVERK**15.1. Særlige bestemmelser/særskilt lovgivning om sikkerhet, helse og miljø for stoffet eller stoffblandingen**

Referanser (Lover/Forskrifter)	Europaparlamentet og rådsforordning (EF) nr 1907/2006(REACH). Kommisjonsforordning EF nr 453/2010 av 20. mai 2010 om endring. Europaparlamentet og rådsforordning (EF) nr 1907/2006 om registrering, vurdering, godkjenning og begrensning av kjemikalier. Annex II Sikkerhetsdatablad. Europaparlamentet og rådsforordning (EF) nr 1272/2008, CLP.
--------------------------------	--

15.2. Vurdering av kjemikaliesikkerhet

Vurdering av kjemikaliesikkerhet er gjennomført	Nei
---	-----

AVSNITT 16: ANDRE OPPLYSNINGER

Leverandørens anmerkninger	Denne informasjon er basert på nåværende nivå i følge vårt kjennskap. Informasjonen vil imidlertid ikke kunne gi forsikringer når det gjelder produktegenskaper og etablerer ingen legale kontraktforhold. Mottakeren av vårt produkt er fullstendig ansvarlig for å iakttas eksisterende lover og regler.
Opplysninger som er nye, slettet eller revidert	Oppdatert i henhold til vedlegg II og CLP
Versjon	2