

Svensk Förening för Patologi – Svensk Förening för Klinisk Cytologi

Dokumentnamn: Gastrointestinal patologi – KIIPO

Dok.nr:
GE11

Framtagen av:
GE-KVAST/Béla Veress

Utgåva:
2.0

Fastställt:
1999-11-30

Sida:
1(5)

METODBOK FÖR KIIPO-UTREDNING

Patomorfologisk analys

Omarbetad version

Béla Veress

**Avdelningen för klinisk cytologi och patologi
Universitetssjukhuset MAS, Malmö**

Två objektiva metoder används för närvarande i diagnostiken av kronisk idiopatisk intestinal pseudoobstruktion (KIIPO): tarmmanometri och histomorfologisk analys. Den sistnämnda metoden är mycket tids- och resurskrävande eftersom de cellulära förändringarna är subtila och fläckvis förekommande. Flera specialtekniker används parallellt med varandra: klassisk ljusmikroskopi med specialfärgningar och immunohistokemiska färgningar, morfometri samt elektronmikroskopi.

MATERIAL

Allmänt:

Hela tarmväggen (sk. fulltjockleksbiopsi) måste undersökas.

Blodcirkulationen till det biopsierade området måste vara intakt under den kirurgiska proceduren för att minimera uppkomsten av ischemiska skador.

Biopsins längsaxis bör vara antingen i 90° eller 180° vinkel till tarmens längsaxis, i tjocktarmen bör både taenial och intertaenial tarmvägg vara med.

De centrala delarna av biopsin får absolut inte röras, hållas, dras eller klämmas med pincett under biopsitagandet.

För att undvika muskelkontraktion bör biopsin nålas på en korkplatta vid de två ändarna av muskulaturen (se figur 1).

Storlek: Optimal storlek är 10 x 5 mm muskelyta (OBS! ej mukosayta)

METOD

Hantering:

Biopsin bör nålas på korkplatta med mukosa mot korken. Biopsin nålas vid de två kortändarna av muskulaturen, korkplattan läggs ner i 4% buffrad formalin med korkplattan uppåt (se figur 1). Det är önskvärt att lägga pappershandduk ovanpå korkplattan för att trycka ner den in i formalinet.

Fixering:

Den optimala fixeringstiden är 24 timmar i rumstemperatur med hänsyn till immunhistokemi. Den kan vara längre i formalin dock helst inte längre än 3 dygn.

Utskärning:

Biopsin delas i tre ojämnstora delar för ljus- och elektronmikroskopiska undersökningar. För ljusmikroskopi bäddas 2 vävnadsbitar.

1. C:a 1/3 av biopsin skivas eller bäddas i sin helhet på sådant sätt att hela tarmväggen kan tvärsnittas (figur 2);
2. C:a 1/2 av biopsin skall bäddas och snittas parallellt med serosaytan. Först skärs mukosa/submukosa bort med skalpell under lupp; serosaytan skall tuschfärgas för orienteringens skull. Vävnadsbiten bäddas på så sätt att snittningen skall påbörjas från serosan (figur 3);
3. 3. Resten bäddas för elektronmikroskopi i c:a 1 mm³ kuber från hela t. muscularis. Mukosa/submukosa behövs inte för EM.

Snittning:

1. Tvärsnitt: I första omgången snittas 3-4 um tjocka snitt i minst 3 olika djup. Från varje nivå tas 3-5 seriesnitt upp på glaset. Dessa snitt skall HE-färgas. Dessutom tas upp snitt upp på glas för specialfärgning från 2. och 3. djupnivåer: 5 st snitt för ev. specialfärgningar och 9 st snitt för immunhistokemi.

2. Parallellsnitt: Dessa prepareras i andra omgången efter att patologen undersökt tvärsnitten i mikroskopet och bestämt tjockleken av serosa+yttre muskellager. Måttet behövs för att kunna avgöra hur djupt ligger Auerbach-plexus i den aktuella biopsin. Detta för att kunna undersöka nerv-plexuset i så stor utbredning som möjligt. Lagret mellan det longitudinella och cirkulära muskulaturen brukar vara 15-20 um. Pga vävnadens orientering, som ej är alltid optimal, bör man räkna med att snitta tjockare lager dvs flera snitt. Hela detta mellanlager bör seriesnittas och tas upp för glas, 6 st snitt sparas för immunhistokemiska färgningar, resten HE färgas. Parallellsnitt skall alltid prepareras och undersökas vid misstanke om neuronopati.

3. Snitt för elektronmikroskopi görs endast vid behov.

Färgning:

På tvärsnitt används som rutinfärgning HE. Vid speciell frågeställning skall specialfärgningar göras.

Frågeställningarna kan vara följande:

- a) Inklusioner (PAS, PAS-diasas, Gömöri's metenamin-silver, von Kossa)
- b) Fibros (någon av trikrom-färgningarna)
- c) Mastcell/eosinofil-förekomst (Giemsa)
- d) Neuron-degeneration/kromatolys (kresylviolett).

Cellkomponenter som alltid skall undersökas med immunhistokemins hjälp är följande:

- a) Muskelceller (intermediära filamenter: aktin, glattmuskelcellsaktin/ α -aktin, desmin)
- b) Neuroner (neuron specifik enolas, neurofilament, bcl-2)
- c) Schwann-celler/gliaceller (S100)
- d) Cajalska intestitiella celler (c-kit/CD117)
- e) Lymfocyter (CD45)

På parallellsnitt används HE, samt IH för neuron/Schwann cell/lymfocyt/Cajal cell.

Silverimpregnering på 50 μ m tjocka fryssnitt: vi har frångått denna metod pga tekniska svårigheter som gjorde utvärderingen ytterst arbetsam och osäkerhet i tolkningen. I stället infördes parallellsnitt som är överlägsen vid utvärderingen av nervsystemets histomorfologi.

MORFOMETRI

Med hjälp av okulär-mikrometer bestäms muskulaturens tjocklek, likaledes kan storleken av enskilda muskelceller mätas.

För närvarande rekommenderar jag inte bedömningen av neuron-densitet. Pga nervsystemets tredimensionella struktur är räknandet inte pålitligt på tvärsnitt. Utarbetande av optimal neuron-räkning på parallellsnitt pågår. Däremot kan man ange det maximala antalet neuronerna i den största submukosala ganglionen som finns i biopsin samt mäta tjockleken av perifera nervgrenar i submukosan vid misstänkt intestinal neuronal dysplasi resp. M. Hirschsprung. I en "jätte Meissner-ganglion" finns mer än 7 st neuronerna i neuronal dysplasi och nervgrenar tjockare än 40 μ m nervgrenar bör finnas i submukosan i aganglionos.

Mikroskopisk undersökning

Mikroskoperingen påbörjas alltid med tvärbäddade seriesnitt där man också avgör om specialfärgningar eller fullständig analys av parallellsnitt är nödvändig eller icke. T ex om man konstaterar någon typ av muskelåkomma kan man spara immunfärgningar för neuroner på parallellsnitt.

Samtliga vägglager måste undersökas mycket noggrant och analyseras i varje snitt för att de fläckvisa, subtila cellförändringarna kunna upptäckas.

Särskilt uppmärksamhet bör riktas mot följande detaljer:

Antalet intraepiteliala lymfocyter, neuron-förekomst i mukosa, vakuolär-degeneration av muskelceller, ”inklusioner” i muskelceller (intracytoplasmatiska eller intranukleära), intranukleära inklusioner i neuroner, degeneration av neuroner (svullnad/vakuolisering, cell-skrumpning, cytoplasma-basofili, karyorrhesis eller pyknos, apoptos), axon-degeneration i form av vakuolisering/svullnad, gliacell-ökning/härdar, neuronofagi, intra- och periganglionär förekomst av lymfocyter/eosinofiler/mastceller, bortfall av muskelceller och/eller fibros, tjockleken av perifera nerver i submukosan.

Arkitekturrubbning av muskulatur (flera/färre skikt än normalt, hypoplasi/atrofi eller hypertrofi/hyperplasi), antalet och storleken av ganglioner/neuroner/nervgrenar bör också noteras.

Beträffande de inflammatoriska tillstånden bör följande beaktas:

- a) Normalt finns det inga lymfocyter/eosinofiler/mastceller intra-ganglionärt
- b) Inflammatoriskt angrepp är fläckvist och mestadels diskret. Man kan exempelvis se endast någon enda lymfocyt intraganglionärt på tvärsnitt bland helt normala ganglia medan på parallellsnitt syns en mer markant lymfocyt-förekomst.
- c) Det finns alltid tecken på neuron-skada/glios vid ganglionit.
- d) Intraepitelial lymfocytos betraktas som abnormalt vid mer än 20 st intraepiteliala lymfocyter (IEL) / 100 epitelceller i tunntarm och mer än 10 st IEL / 100 epitelceller i kolon. Alltid minst 300 epitelceller räknas.

FALLGROPAR

Patologen måste vara kritisk eftersom mekanisk skada/ischaemi kan orsaka artefakter som i viss mån kan likna muskel- eller neurondegeneration. Välavgränsade grupper av muskelceller med eosinofil cytoplasma och ”pyknotiska” kärnor kan vara kläm/skärningsartefakter. Neuronförändringar i närheten av dessa område eller kanter bör avfärdas och tolkas som inte äkta.

REFERENSER

Som tidigare samt följande:

Monforte-Munoz et al. Increased submucosal nerve trunk caliber in aganglionosis.
Arch Pathol Lab Med 1998; 122: 721.

Meier-Ruge et al. The neuropathological diagnosis of neuronal intestinal dysplasia.
Eur J Pediatr Surg 1994; 4:267.

Veress B. Histopathologic investigation in chronic idiopathic intestinal pseudoobstruction. Internet hemsida <http://www.ki.se/medhs/gastro/psob>