

Svensk Förening för Patologi – Svensk Förening för Klinisk Cytologi			
Dokumentnamn: Gastrointestinal patologi – KIIPO		Dok.nr: GI11	
Framtagen av: Béla Veress, Ester Lörinc	Utgåva: 3	Fastställt: 2013-05-15	Sida: 1(3)

METODBOK FÖR KIIPO-UTREDNING

Patomorfologisk analys

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 special- och immunohistokemiska färgningar, morfometri samt eventuell elektronmikroskopi.

En expertkommitté (Gastro 2009 International Working Group) utarbetade detaljerade riktlinjer och rekommendationer för biopsitagande och histopatologiska metoder, samt klassifikation av gastrointestinala neuromuskulära sjukdomar (Knowles et al., *Acta Neuropathol* 2009; 118:271-301, Knowles et al., *Gut*, 2010; 59:882-7). Ett översiktsarbete med sammanställande av tillgängliga kvantitativa data beträffande olika cellulära komponenter av myenterisk plexus blev också publicerat (Knowles et al., *Neurogastroenterol Motil*, 2011; 115-24). Dessa refereras till nedan som ”Rekommendationer”.

Tillgänglighet av histomorfologisk analys i Sverige

För närvarande finns inte undersökningsmetoden uppsatt på något svenskt patologi laboratorium. Vid behov finns möjlighet att skicka materialet utomlands för analys. Direktkontakt med Dr Béla Veress rekommenderas.

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 längdaxis bör vara antingen i 90° eller 180° vinkel till tarmens längdaxis. 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. Biopsin nålas på en korkplatta (se nedan ”Materialhantering”)

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

METOD

Hantering

Biopsin bör nålas vid de två kortändarna på korkplatta med slemhinnan mot korken för att undvika muskelkontraktion. Vävnaden får inte töjas/sträckas. Korkplattan läggs ner i 4% buffrad formalin med korkplattan uppåt och en pappershandduk ovanpå.

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 ljusmikroskopiska undersökningar: två vinkelgradiga skivor för tvärsnitt och en större för transversell/parallell bäddning. Om önskemål och möjlighet finns för elektronmikroskopi då ska en lämplig liten vävnadsbit tas och prepareras för detta ändamål.

1. C:a 1/3 av biopsin skivas eller bäddas i sin helhet på sådant sätt att hela tarmväggen kan tvärsnittas (figur 2). Vinkelgradiga snitt behövs för att kunna analysera både längd- och tvärsnitt av cirkulär och longitudinell muskulatur;
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). *Anmärkning*: denna typ av bäddning finns inte med i "Rekommendationer" men är enligt författarens erfarenheter överlägsen i studerande av myenteriska ganglia.

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 12 st snitt för immunhistokemi.
2. Parallellsnitt: Dessa prepareras i andra omgången efter att tjockleken av serosa+yttre muskellager är känd eftersom dessa lager måste kapas för att komma ner i nivån av Auerbach-plexus. Det intermyenteriska lager brukar vara 15-20 um. Hela den intermyenterisk platta bör seriesnittas och tas upp för glas, var 7:e snitt H&E-färgas, mellanliggande 6 st snitt sparas för immunhistokemiska färgningar.

Färgning

På tvärsnittet används som rutinfärgning HE. Följande specialfärgningar kan användas (kursiv: bör alltid färgas):

- a) Inklusioner (*PAS, PAS-diastas, Gömöri's methenamin-silver, von Kossa*)
- b) Fibros/avsaknad av intermyenterisk platta (någon av *trikrom*-färgningarna)
- c) Mastcell/eosinofil-förekomst (*Giemsa*)
- d) Neuron-degeneration/kromatolys (*kresylviolet*).

Cellkomponenter som alltid ska undersökas med immunhistokemi

- a) Muskelceller (intermediära filamenter: aktin, glattmuskelcellsaktin/ α -aktin, desmin, vimentin)
- b) Neuroner (HuC/D, neurofilament, bcl-2, synaptofysin, vasoactive intestinal protein, substans P)
- c) Schwann-celler/gliaceller (S100)
- d) Cajalska intestitiella celler (c-kit/CD117)
- e) T-Lymfocyter (CD3)

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

ANALYS

Morfometri

Hänvisas till "Rekommendationer".

Mikroskopisk undersökning

Mikroskoperingen påbörjas alltid med tvärbäddade seriesnitt där man också avgör om specialfärgningar eller fullständig analys av parallellsnitt är nödvändig eller icke. Om myopati kan

diagnostiseras på tvärsnitt och neuronerna inte visar degeneration behövs inte fullständig IH-undersökning på parallellsnitt.

Samtliga vägglager måste undersökas mycket noggrant och analyseras i varje snitt för att de fläckvisa, subtila cellförändringarna ska 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, karyorrhexis eller pyknos, apoptos), axon-degeneration i form av vakuolisering/svullnad, gliacell-ökning/härddar, 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 intraganglionärt , periganglionärt kan man mycket sällan hitta enstaka T-celler (gränsvärde: 5 st vid en ganglion)
- b) Inflammatoriska angrepp är fläckvisa och mestadels diskreta.
- c) Det finns alltid tecken på neuronskada/glios vid ganglionit.
- d) Intraepitelial lymfocytos bör diagnostiseras enligt KVASt-dokument.

Fallgröpar:

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 områden eller kanter bör avfärdas och tolkas som oäkta.

För ytterligare detaljer hänvisas till Knowles *et al.* (Acta Neuropathol 2009; **118**; 271-301).

REFERENSER

Knowles CH *et al.* Gastrointestinal neuromuscular pathology: guidelines for histological techniques and reporting on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Acta Neuropathol* 2009; **118**:271-301.

Knowles CH *et al.* The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Gut* 2010; **59**: 882-7.

Knowles CH *et al.* Quantitation of cellular components of the enteric nervous system in the normal human gastrointestinal tract – report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Neurogastroenterol Motil* 2011; **23**: 115-24.

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