

# EBUS TBNA MED ROSE VED UDREDNING AF LYMFADENOPATI INKL. STAGING AF LUNGECANCER

UDARBEJDET AF CYTOBIOANALYTIKER JOAN KORSBÆK

AALBORG UNIVERSITETSHOSPITAL
– i gode hænder

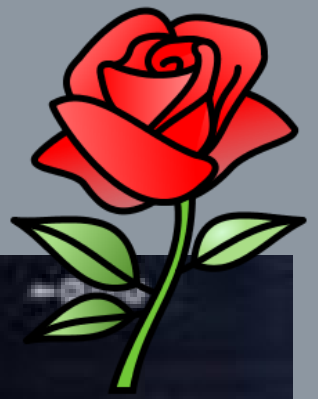



Dbio blad 02/11

1. indstik fra st. 7 :
desværre uegnet, jeg ser blod
og bronkiecylinderepithelceller

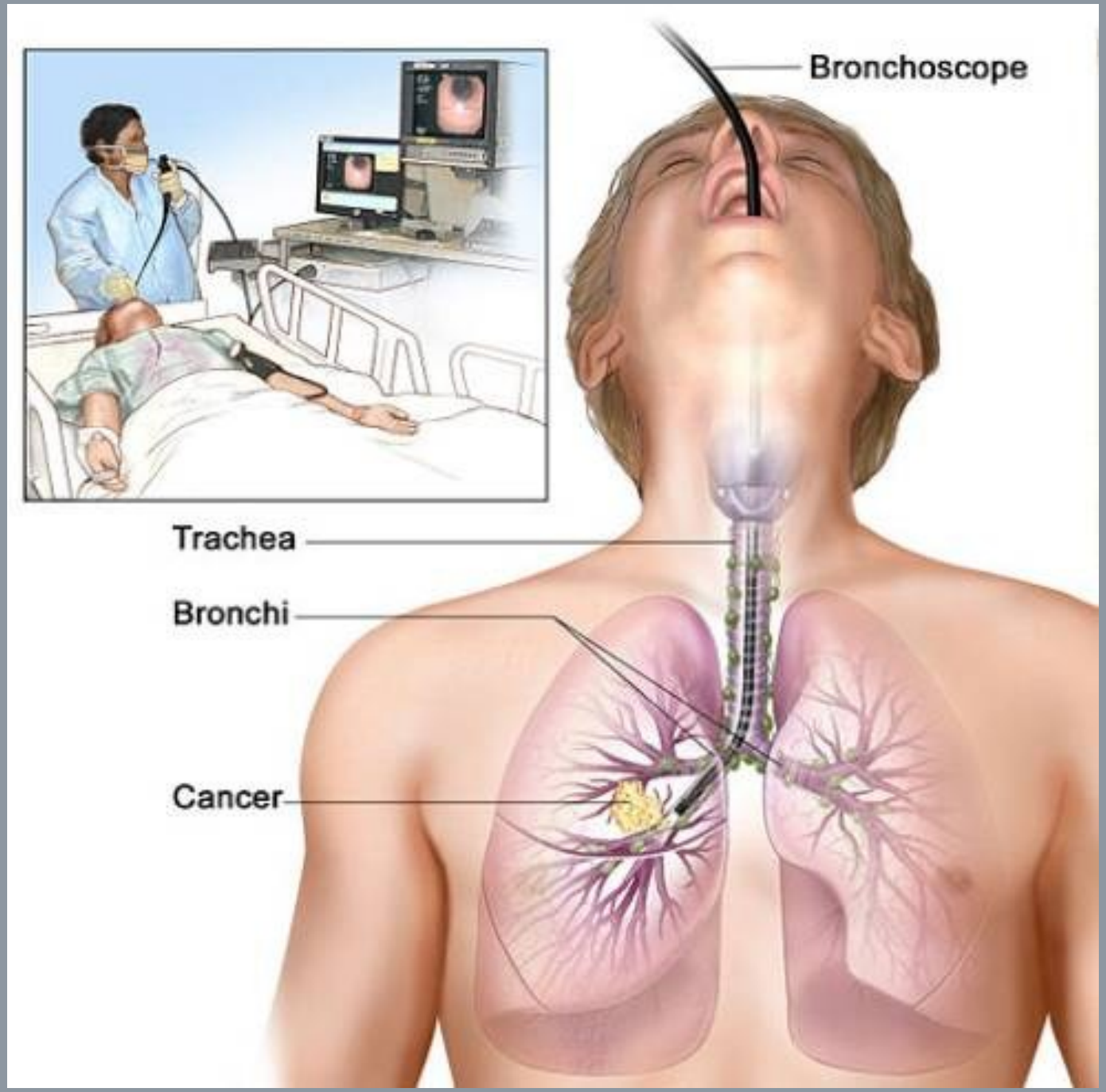

Plimus



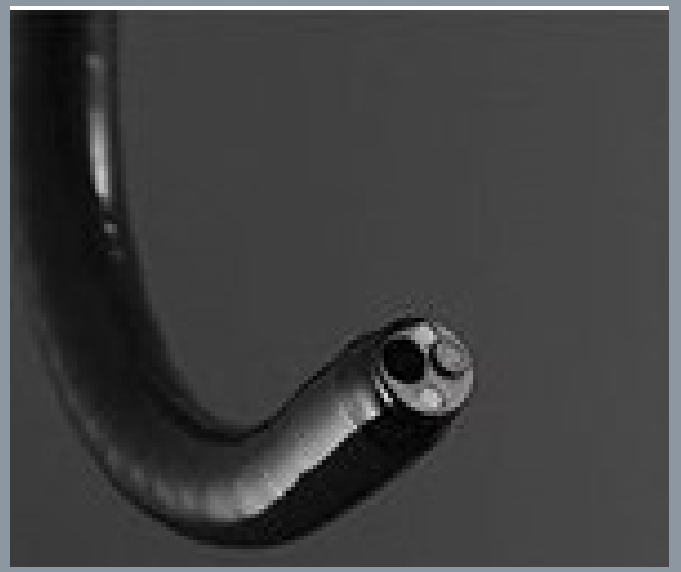


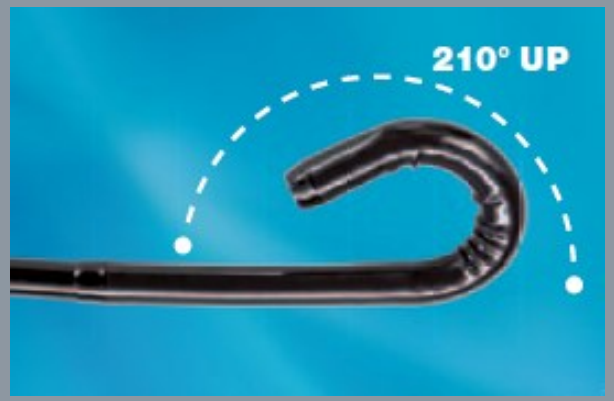
# Udredningens formål

- **Diagnose** *("Hvad fejler jeg?")*
- **Stadie** *("Hvor slemt er det?")*
- **Terapeutiske muligheder** *("Hvad kan der gøres?")*
- **Prognostisering** *("Hvad er mine chancer?")*
- **Tidsplan** *("Hvornår kommer vi så igang?")*


Bronchoscope
Trachea
Bronchi
Cancer






210° UP

# INDIKATION FOR EBUS TBNA VED UNDERSØGELSE AF LYMFEKNUDER

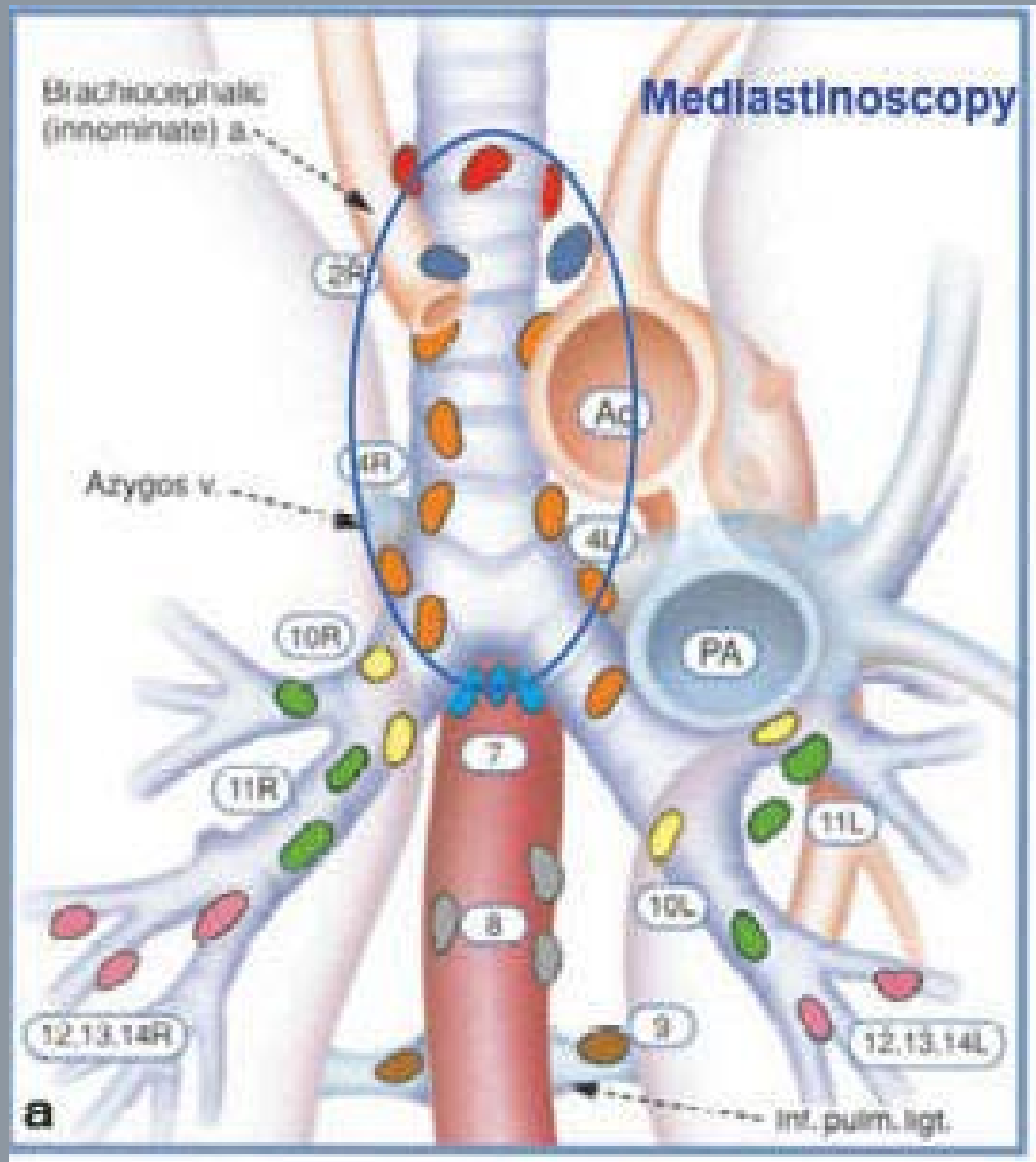
**EBUS-TBNA** (endobronkial ultralydsvejledt transbronkial nåleaspirationsbiopsi /finnål)

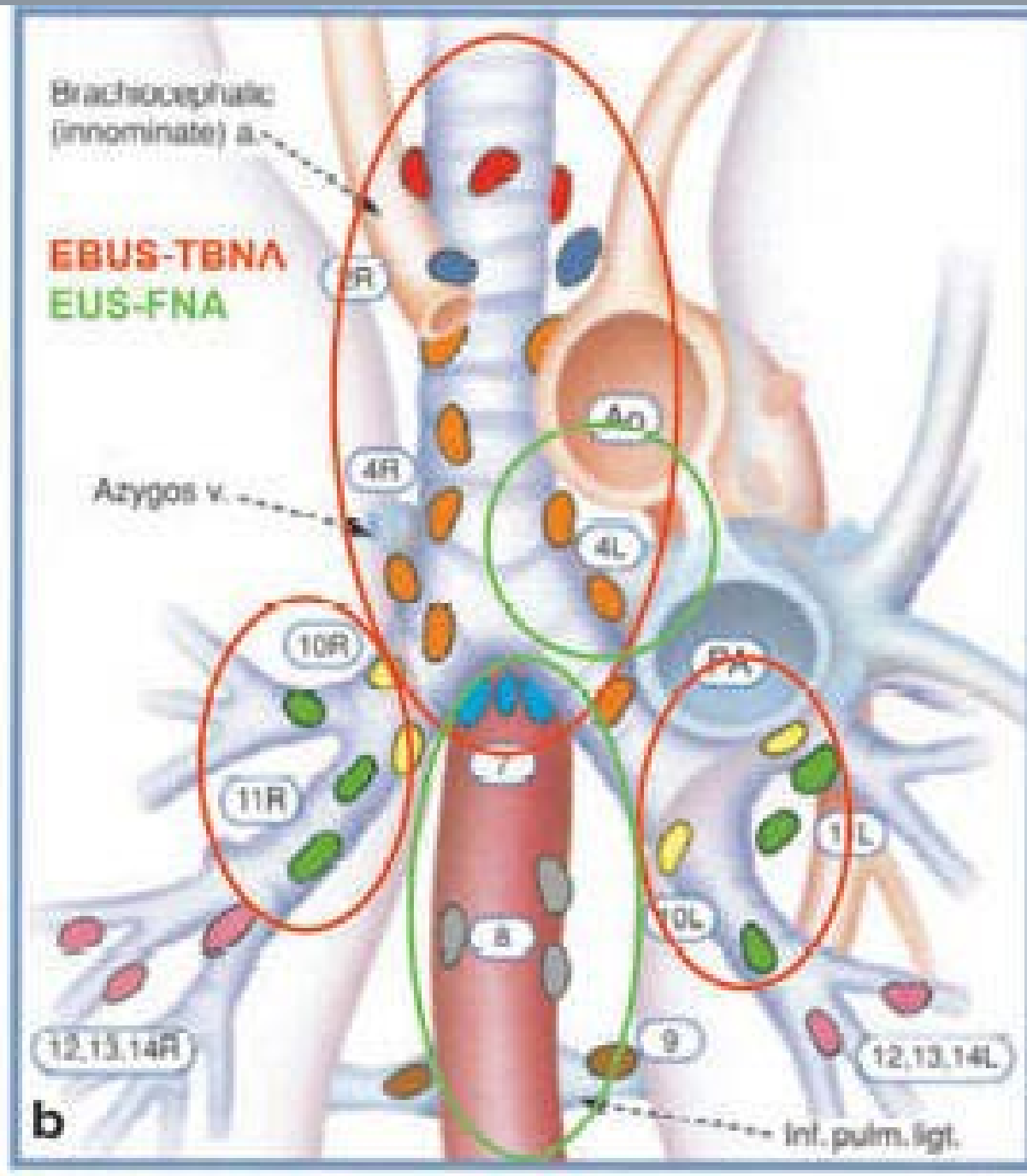
1. Udredning i forbindelse med lungecancer, undersøgelse af lymfeknuder der ikke nødvendigvis er forstørrede

2. PET / CT scanning viser lymfeknuder der er forstørret – årsag?

– granulomdannelse
(malign: lymfom, benign: f.eks. sarcoidose eller immunrelateret inflammatorisk sygdomme f.eks. Wegeners)

– metastase fra kræft andet steds i kroppen, eks.vis lungekræft


Mediastinoscopy
Brachiocephalic (innominate) a.
Azygos v.
2R
4R
Ao
4L
10R
PA
7
11R
11L
10L
8
9
12,13,14R
12,13,14L
Int. pulm. ligt.
a


Brachiocephalic (innominate) a.
EBUS-TBNA
EUS-FNA
R
4R
Ao
Azygos v.
4L
10R
PA
7
11R
11L
10L
8
9
12,13,14R
12,13,14L
Int. pulm. ligt.
b

# • Terapeutiske muligheder *("Hvad kan der gøres?")*

## TNM-stadiet => behandlingstilbud

Venligst udlånt af overlæge Torben Riis Rasmussen, PhD, Klinisk Lektor ved lungemedicinsk afd. AUH

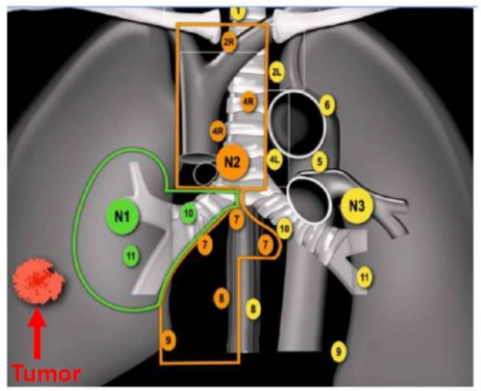
| STAGE | T | N | M |
|---|---|---|---|
| Occult carcinoma | TX | N0 | M0 |
| 0 | Tis | N0 | M0 |
| IA1 | T1mi | N0 | M0 |
| | T1a | N0 | M0 |
| IA2 | T1b | N0 | M0 |
| IA3 | T1c | N0 | M0 |
| IB | T2a | N0 | M0 |
| IIA | T2b | N0 | M0 |
| IIB | T1a | N1 | M0 |
| | T1b | N1 | M0 |
| | T1c | N1 | M0 |
| | T2a | N1 | M0 |
| | T2b | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | M0 |
| IIIA | T1a | N2 | M0 |
| | T1b | N2 | M0 |
| | T1c | N2 | M0 |
| | T2a | N2 | M0 |
| | T2b | N2 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| | T4 | N0 | M0 |
| | T4 | N1 | M0 |
| IIIB | T1a | N3 | M0 |
| | T1b | N3 | M0 |
| | T1c | N3 | M0 |
| | T2a | N3 | M0 |
| | T2b | N3 | M0 |
| | T3 | N2 | M0 |
| | T4 | N2 | M0 |
| IIIC | T3 | N3 | M0 |
| | T4 | N3 | M0 |
| IVA | Any T | Any N | M1a |
| | Any T | Any N | M1b |
| IVB | Any T | Any N | M1c |

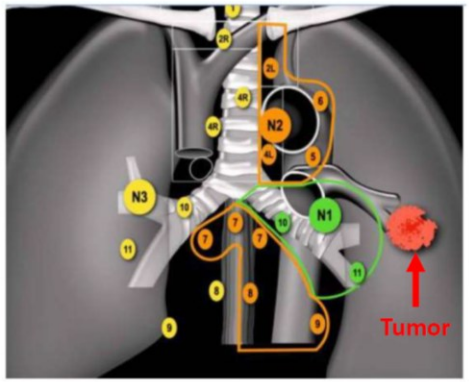
**KURABLE –**
Primært ved Kirurgi,
Sekundært ved Stereotaktisk stråleterapi (SBRT) eller mikrobølge ablation (MWA)

**MÅSKE KURABLE –**
Primært ved kombineret Kemo- & Stråleterapi,
Enkelte ved Kirurgi.

**IKKE KURABLE –**
Behandles med
- Kemoterapi,
- Immunterapi og
- Targeteret behandling.

### Lymfeknudestationer




https://radiologyassistant.nl/chest/lung-cancer/tnm-classification-8th-edition

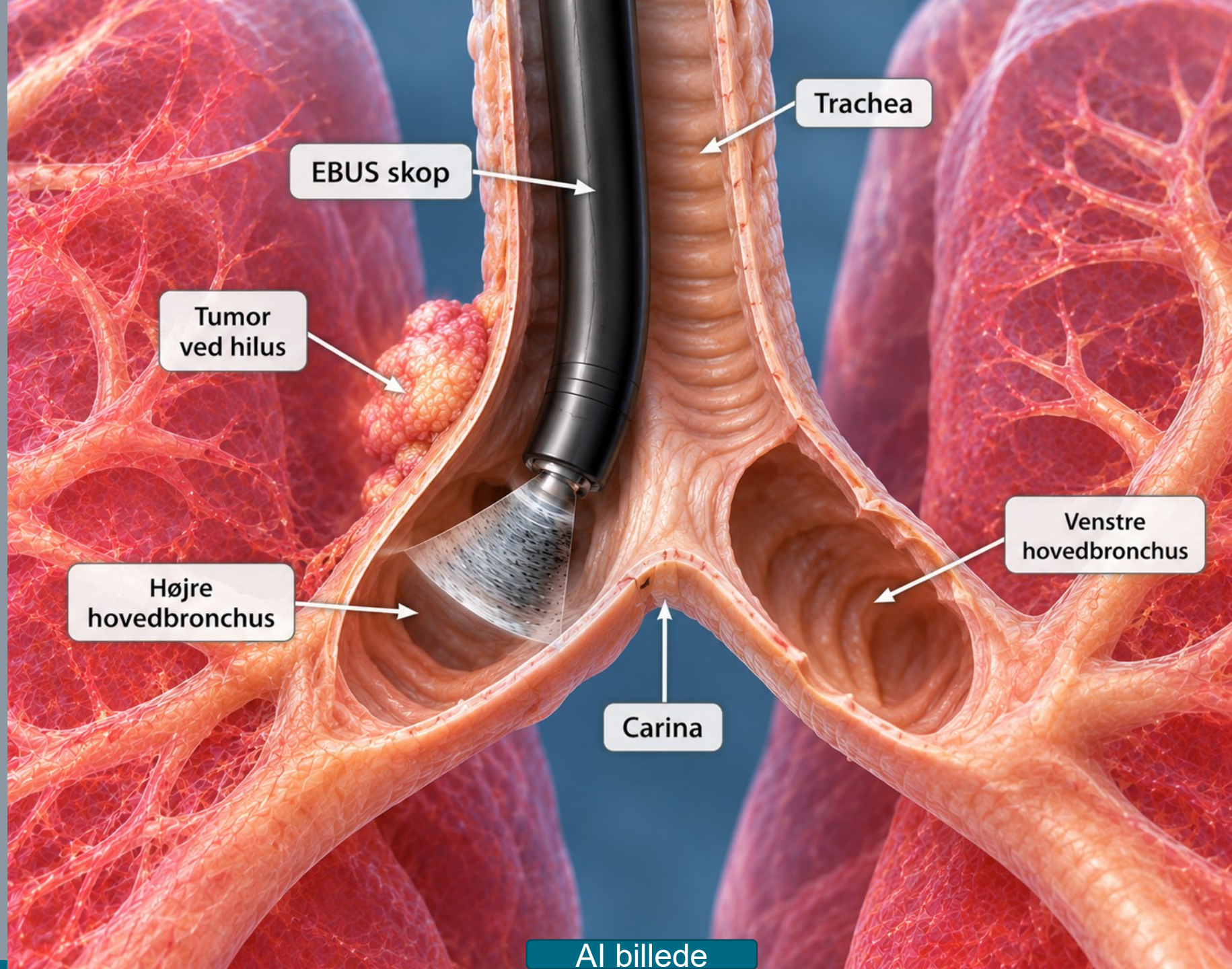

Dräger
OLYMPUS



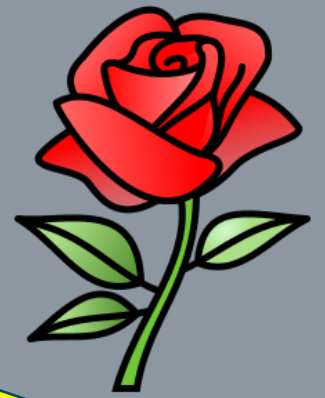


**Figur 1:** Mediastinale og hilære lymfeknuders tilgængelighed ved EBUS og EUS.

EBUS TBNA anvendes også til indstik i tumor beliggende nær bronkus



# KUNSTEN VED EBUS TBNA



”At få nålen ind i læsionen,
og få celler fra læsionen ind
i nålen”

”Tissue truly is the issue”

# TEKNISKE UDFORDRINGER FOR OPERATØR (HOVEDÅRSAG TIL IKKE-D ØVER)

DUR-DUR IKKE

- Manglende identifikaton af target (Lymf
- Vanskelig lokation af target
- Tilblanding med blod
- Tilblanding med bronkiecylindre
- Fibrotiske lymfeknuder (arvæv, gam senchymale tumorer, lymfomer med fibrose)
- Uerfaren



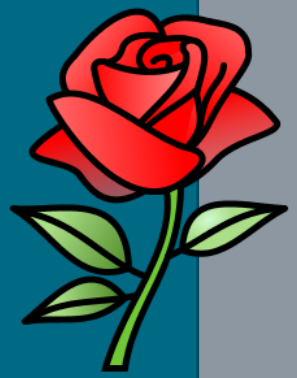
KUNSTEN VED EBUS TBNA

"At få nålen ind i læsionen, og få celler fra læsionen ind i nålen"

"Tissue truly is the issue"







**Udstrygning:**

2 sygeplejersker nødvendige

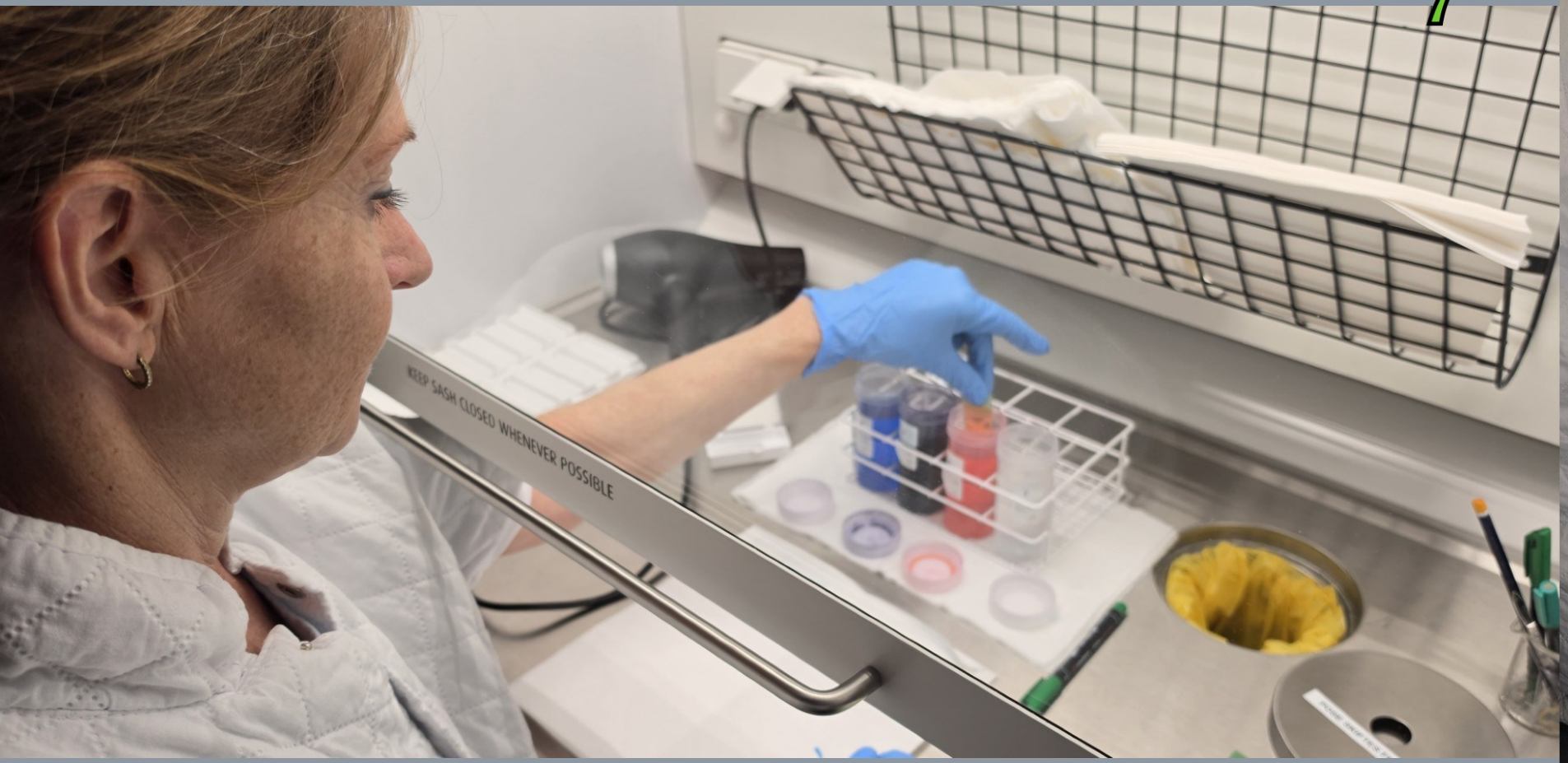
Stylet indsættes i nål, som føres frem, stylet skubber cellemateriale ud op glas, efterfølgende fjernes stylet og nål gennempustes v.hj.a. sprøjte

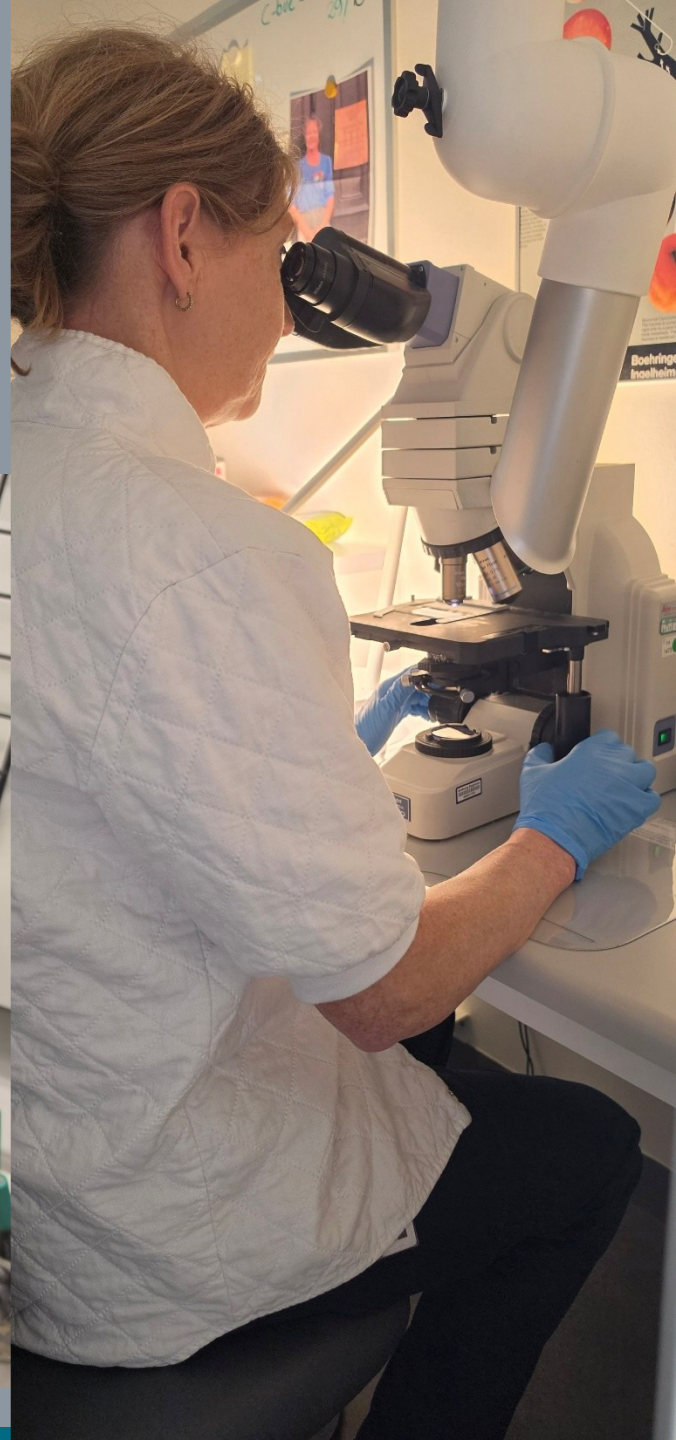
Cellemateriale udstryges (sandwich metode), typisk 2 glas fra hvert indstik

Evt resterende cellemateriale overføres til (centrifuge) restglas ved at skylle nål med fysiologisk saltvand
Ved fund af maligne celler udføres der ekstra dedikerede indstik til rest-glasset.
Transportmedie: fysiologisk saltvand

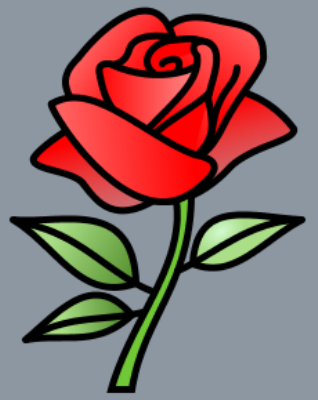


# 1. MGGQ
# 2. RAPID ON-SITE EVALUATION (ROSE)



# BIOANALYTIKERS OPGAVE VED EBUS TBNA MED ROSE



- Vurdere egnethed
  inkl. at skelne mellem ikke-diagnostiske prøver og negative prøver
- *Uegnet prøve* vil oftest indeholde mange bronkiecylinderepithelceller, meget blod, og ses uden indhold af lymfocytter, granulomatøs inflammation, maligne celler

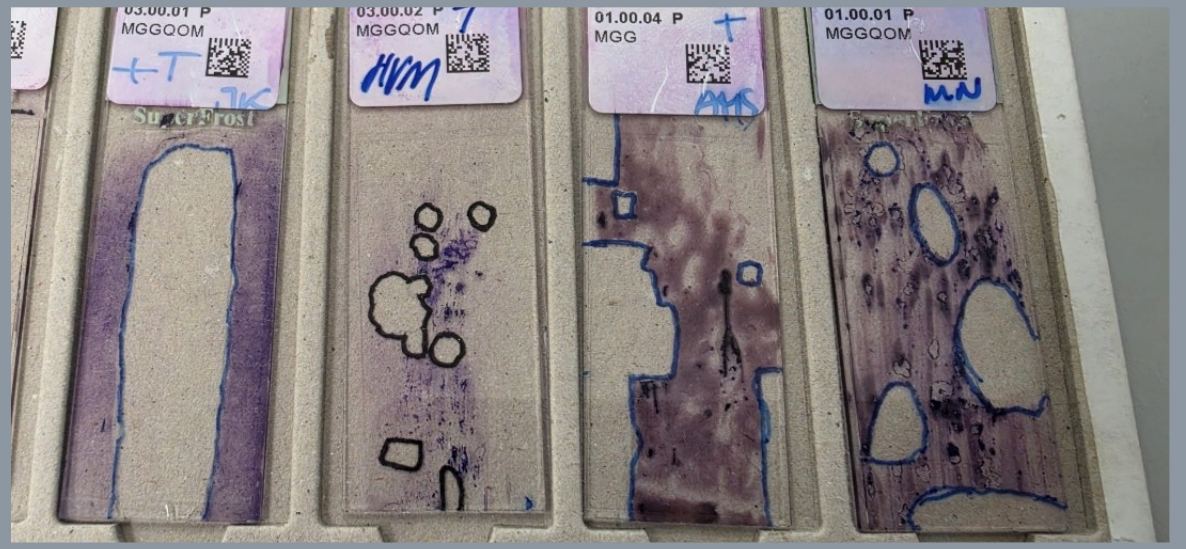
*Egnet prøve /diagnostisk* dvs kan forklare lymfadenopati: indeholde maligne celler/ granulomatøs inflammation/ tilstrækkeligt med lymfocytter/celler fra lymfeknude

Når erklæret egnet ➡ nyt fokus: triage

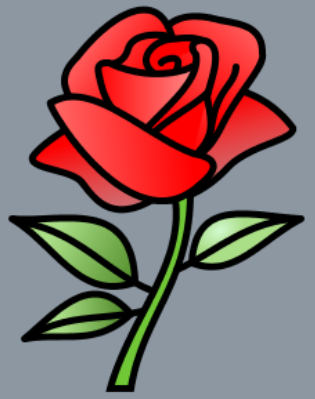
dvs sikre tilstrækkeligt med egnet prøvemateriale til øvrige analyser som IHC, MOL, FLOW, mikrobiologi
(dvs ekstra udstrygningsglas /materiale til celleblok)

IHC:
PDL-1
(immunterapi)

MOL lunge:
BRAF, KRAS, EGFR, ERBB2, ALK, MET, STK11, RET, NTRK1-3, ROS1
(targeteret terapi)



# TILSTRÆKKELIGT REPRÆSENTATION AF CELLER FRA LYMFEKNUDE?

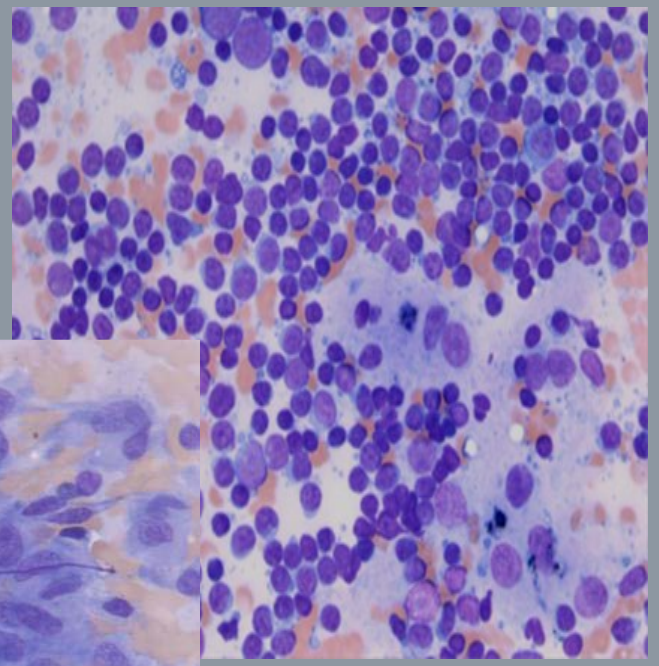


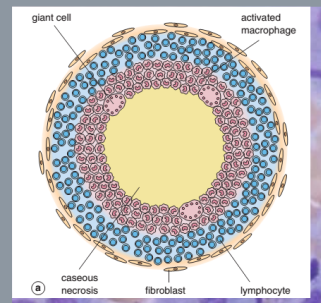
- 1. èt glas med mange lymfocytter eller lymfocytter skal udgøre > 30 % af cellerne
- 2. > 40 lymfocytter pr. 40 HPF /
  > 100 lymfocytter pr 10 LPF ( ikke angivet i hvor mange synsfelter)
- 3. > 40 lymfocytter pr. 40 HPF i alle cellulære områder
- 4. maligne celler
- 5. tegn på granulomatøs inflammation (epitheloidceller)
- 6. skal ses germinalcenter fragmenter (ex.vis plasmaceller) og grupper af pigmentholdige/antrakotiske (kulstøv) makrofager (tingible body makrofager)
- 7. fraråder at erklære prøvematerialet egnet ved kontaminering med bronkiecylinderepithelceller

# EGNETHEDSKRITERIER
# EBUS TBNA /EUS FNA LYMFEKNUDE (AALBORG)

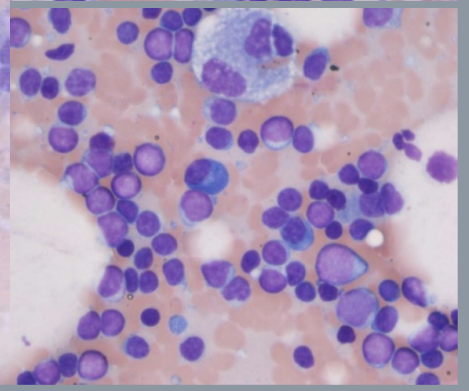
Repræsentativ for en lymfeknude:

- En blandet population af lymfoide celler og plasmaceller
  > 40 lymfocytter ved 40 HPF (Christos: i minimum 10 synsfelter )
- Makrofager ofte med indhold af pigment/kulstøv (tingible makrofager)
- Få granulocytter
- Baggrund med lymfoglandulære legemer







- Fund af maligne celler (OBS ved manglende tilstede
- Fund af granulomatøs inflammation

- *Cancer (Cancer Cytopathol) 2014;122:561-76*
- Christos Meristoudis: ”ved kontaminering med bronkiecyl: (som udgangspunkt) uegnet

# KULSTØV PIGMENT LOOK-A-LIKE

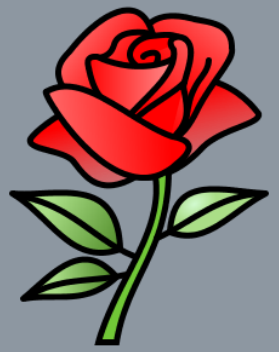
(UDFORDRINGER/DIFFERENTIAL DIAGNOSTIK)



- Pigmentholdige makrofager KAN ses som tilblanding fra bronkieslimhinde (”stenlunger”), vurderes alligevel som et rimeligt specifik fund fra lymfeknude
- Metastatiske celler fra malignt melanom med pigment
- Makrofager med hæmosiderin pigment
- Pigment fra stylet (små metal partikler)
  (Lejret ekstracellulært, større partikler end antrakotisk pigment, fravær af omkringliggende makrofager)
- Grafitstøv fra blyant

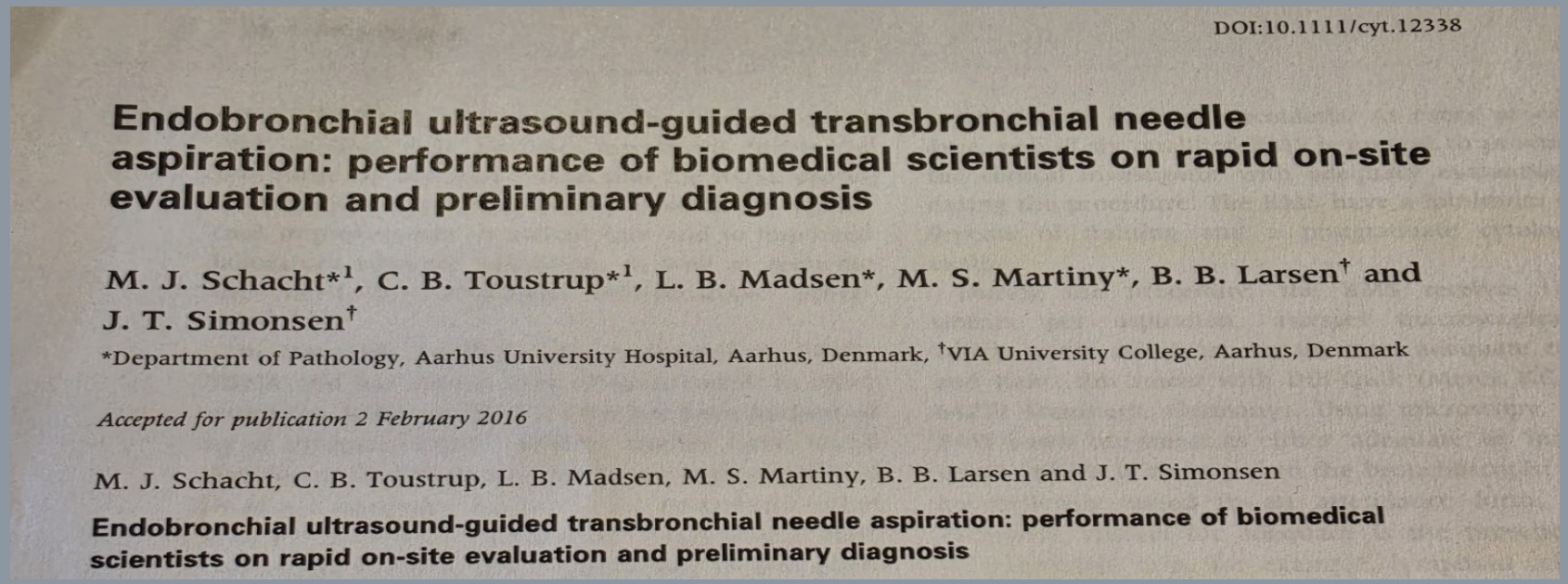
# ØVRIGE UDFORDRINGER/ LOOK-A-LIKE (DIFFERENTIALDIAGNOSTIK)





- Dårligt farvede MGGQ - ses specielt ved tilblanding med mucus
- Benigne / reaktive bronkie cyl / bægercellehyperplasi > < højt diff. Lunge ADC / metastase ADC anden oprindelse
- Enkelt liggende / få maligne celler
- Malign > < granulomatøs inflammation
- Kun maligne celler uden lymfoid baggrund
- Primære lymfeknude neoplasier (maligne hæmatologiske)

# DUR (vi) – DUR (vi) IKKE



DOI:10.1111/cyt.12338

**Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration: performance of biomedical scientists on rapid on-site evaluation and preliminary diagnosis**

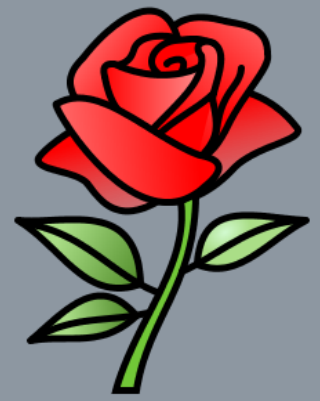
M. J. Schacht*[1], C. B. Toustrup*[1], L. B. Madsen*, M. S. Martiny*, B. B. Larsen[†] and J. T. Simonsen[†]

*Department of Pathology, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark, [†]VIA University College, Aarhus, Denmark

*Accepted for publication 2 February 2016*

M. J. Schacht, C. B. Toustrup, L. B. Madsen, M. S. Martiny, B. B. Larsen and J. T. Simonsen

**Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration: performance of biomedical scientists on rapid on-site evaluation and preliminary diagnosis**



- Formål:
  EBUS TBNA: Bioanalytikers præstation ved ROSE og foreløbig diagnose.
- Konklusion:
  Både ROSE og foreløbig egnetheds vurdering og foreløbig diagnose foretaget af bioanalytiker viste høj overensstemmelse sammenlignet med den endelige vurdering foretaget af cytopatolog.





- Ref.:

- Kompendium Klinisk cytologi, Lungecytologi, Dansk Cytologiforening
- Endobronkial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration EBUS-TBNA
  A Practical Approach (EBUS bog)
- Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration: performance of biomedical scientist on rapid on-site evaluation and preliminary diagnosis (Bachelor projekt artikel)
- Egne erfaringer

| Program Papanicolau | | Station | Time | Critical |
|---|---|---|---|---|
| Start: | 96% ethanol | | | |
| Step 1: | 70 % ethanol | stn 1 | 30 sek. | NO |
| Step 2: | Demineraliseret vand | stn 2 | 30 sek. | NO |
| Step 3: | Hæmatoxylin | stn 3 | 1 min. | YES |
| Step 4: | Postevand | stn 4 | 30 sek. | NO |
| Step 5: | Postevand | stn 5 | 30 sek. | NO |
| Step 6: | Demineraliseret vand | stn 6 | 5 min. | NO |
| Step 7: | 70 % ethanol | stn 7 | 30 sek. | NO |
| Step 8: | 96 % ethanol | stn 8 | 30 sek. | NO |
| Step 9: | OG 6 | stn 9 | 1 min. | YES |
| Step 10: | 96 % ethanol | stn10 | 1 min. | YES |
| Step 11: | EA 50 | stn 11 | 1 min. | YES |
| Step 12: | Absolut ethanol | stn 12 | 10 sek. | YES |
| Step 13: | Absolut ethanol | stn 13 | 10 sek. | YES |
| Slut: | Absolut ethanol | Unload C | | |

Fiksering i min. 15 minutter

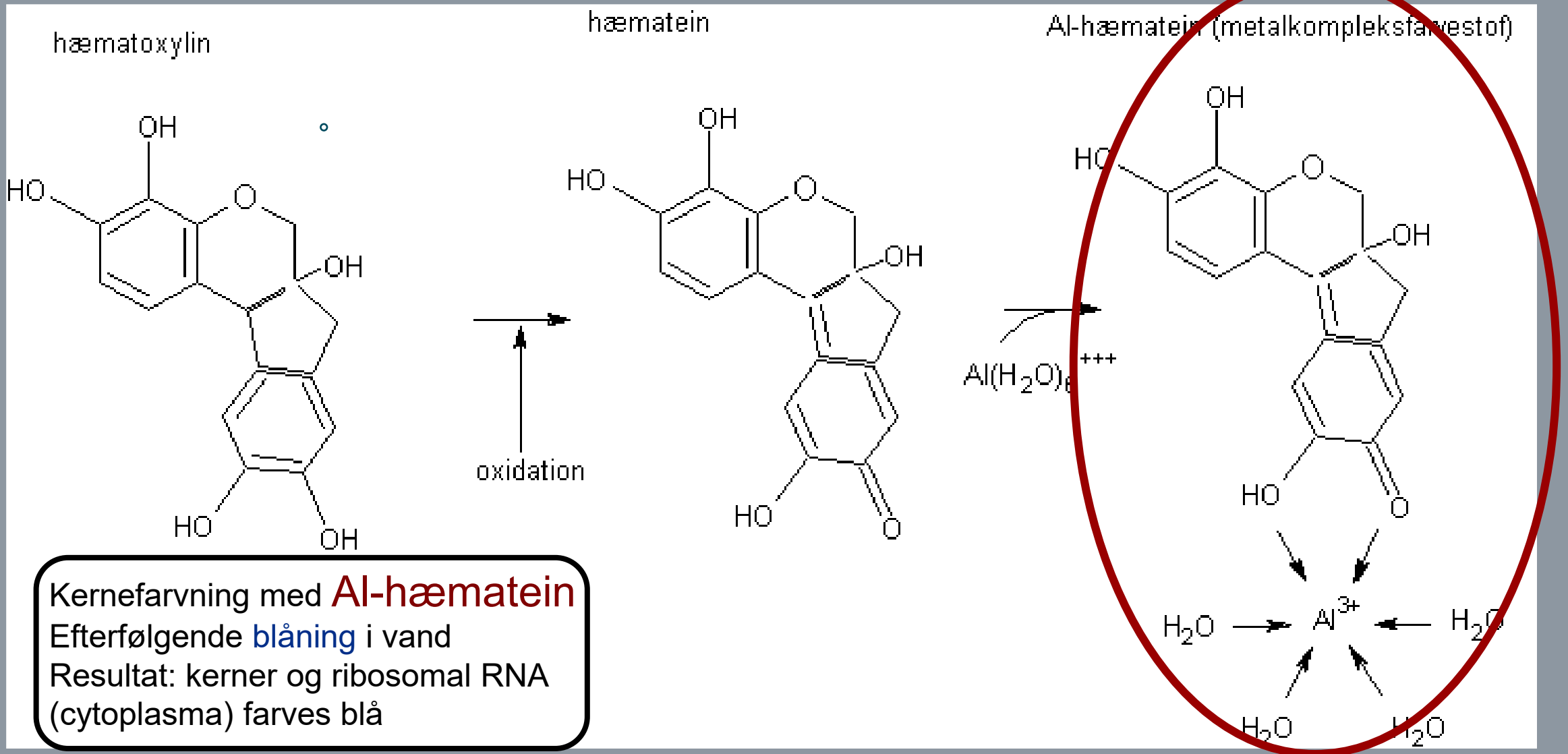
Farveforskrift ”anden cytologi” PAI Aalborg

Q-pulse dokument: B.C Farveforskrifter, anden cytologi

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Step 3: | Hæmatoxylin | stn 3 | 1 min. | YES |

# FARVNING AF KERNER (PAP) OG RIBOSOMAL RNA I CYTOPLASMA

$R\text{-}PO_4^- \rightleftarrows R\text{-}PO_4H$

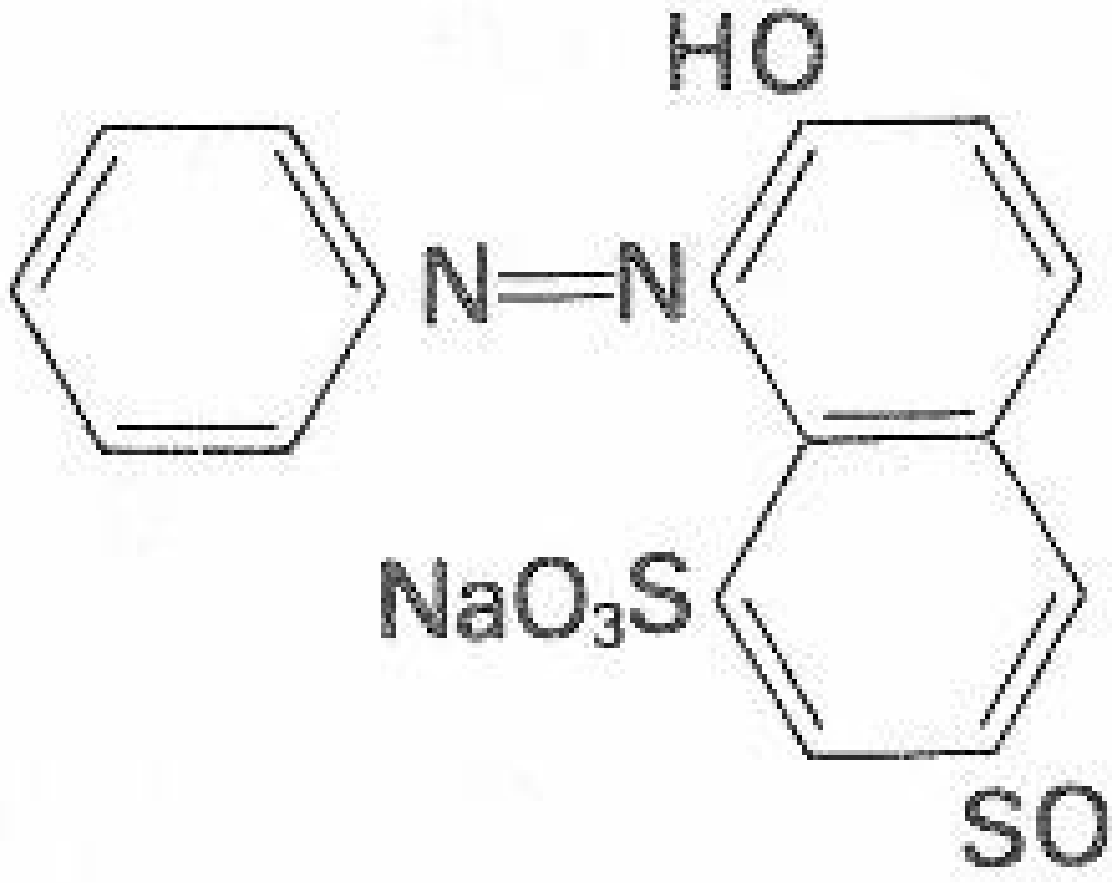



Kernefarvning med Al-hæmatein
Efterfølgende blåning i vand
Resultat: kerner og ribosomal RNA (cytoplasma) farves blå

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Step 9: | OG 6 | stn 9 | 1 min. | YES |

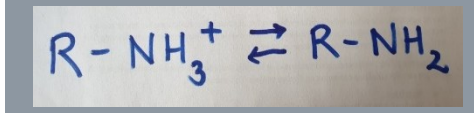
Cytoplasma farvning med OG6

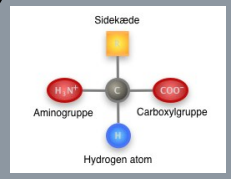
# 1.TRIKROMFARVNING CYTOPLASMA (PAP)




Orange G

Anion farvestof




Opløsning indeholder desuden:
Fosforwolframsyre = Stort ufarvet poly anionmolekyle

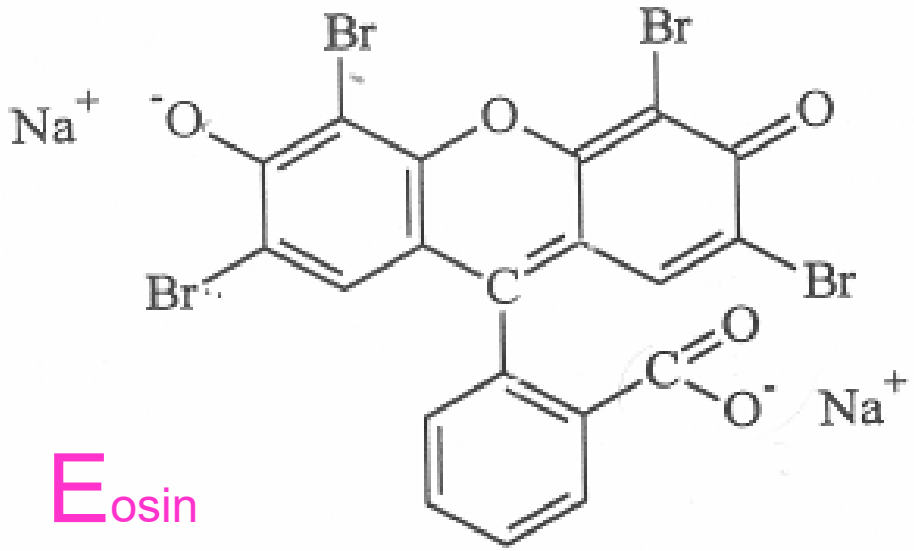
Negativt ladet

| Step 11: | EA 50 | stn 11 | 1 min. | YES |
|---|---|---|---|---|

$R-NH_3^+ \rightleftarrows R-NH_2$

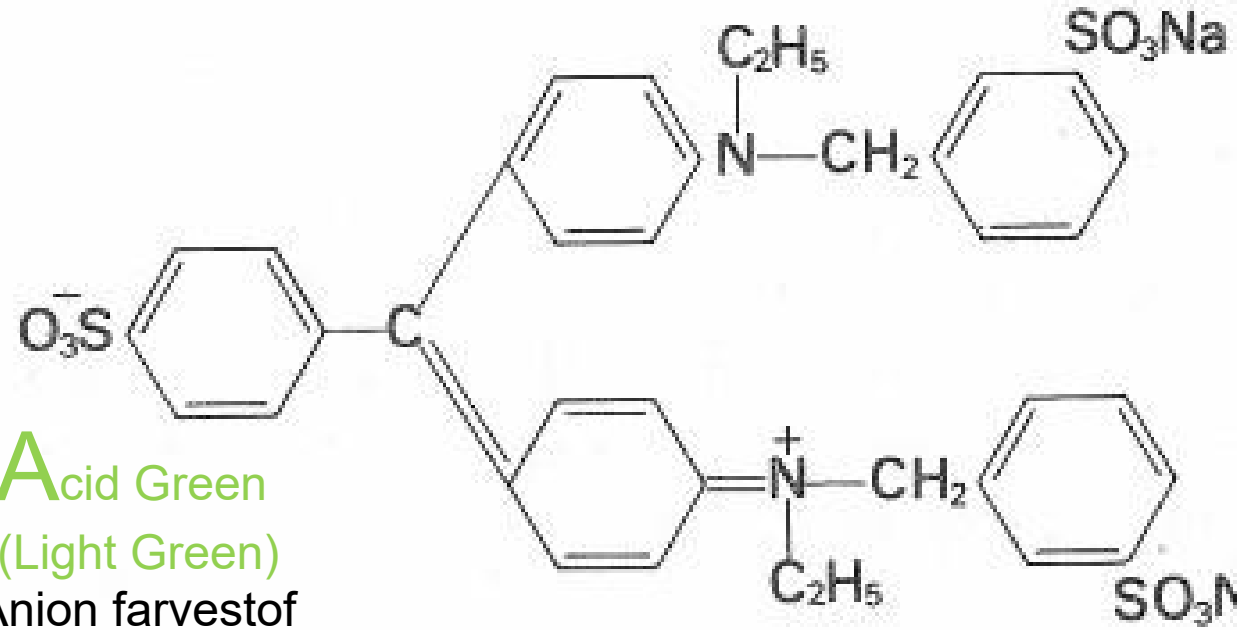
Cytoplasmafarvning med EA50

# 2.TRIKROMFARVNING CYTOPLASMA (PAP)




Eosin

Anion farvestof




Acid Green

(Light Green)

Anion farvestof

Negativt ladet

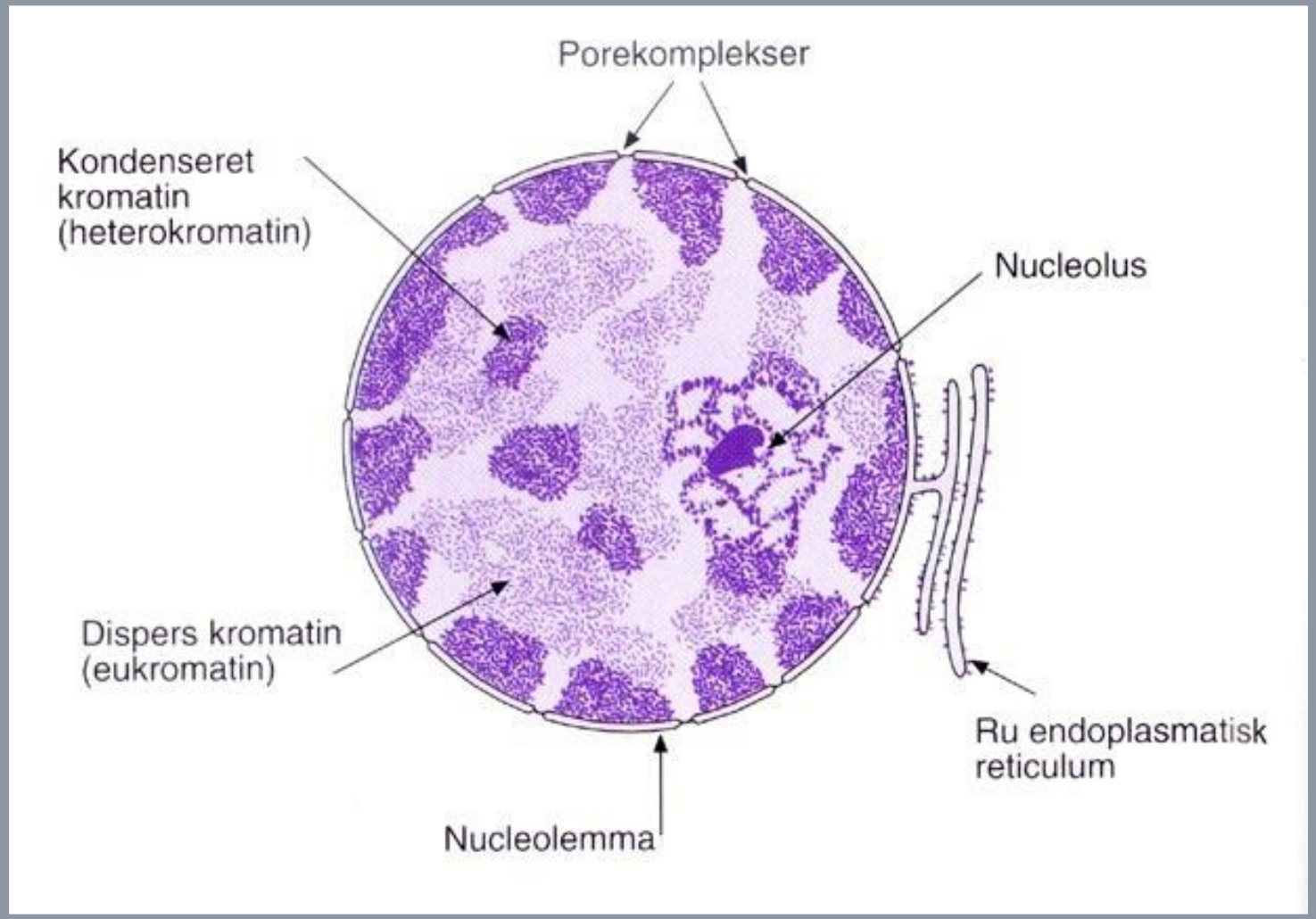
Opløsning indeholder desuden:
Fosforwolframsyre =
Stort ufarvet poly anionmolekyle

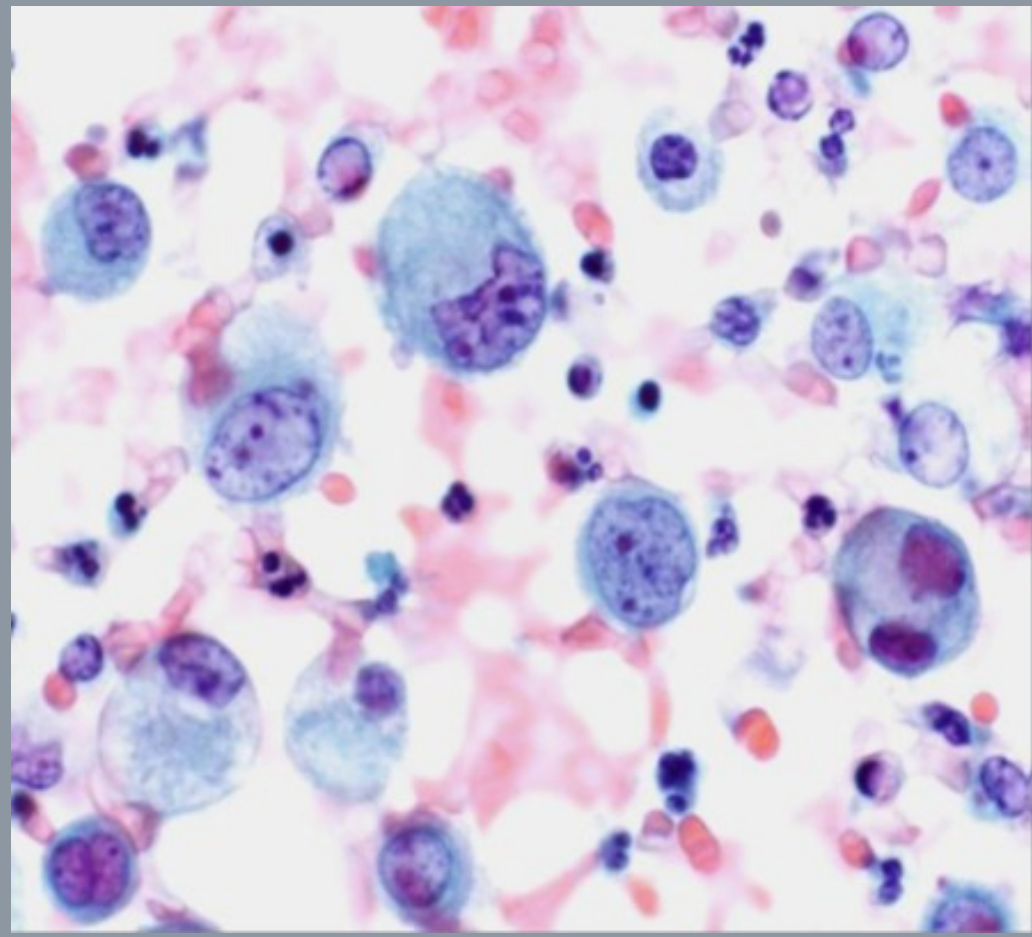
| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Step 3: | Hæmatoxylin | stn 3 | 1 min. | YES |

# KERNEN:

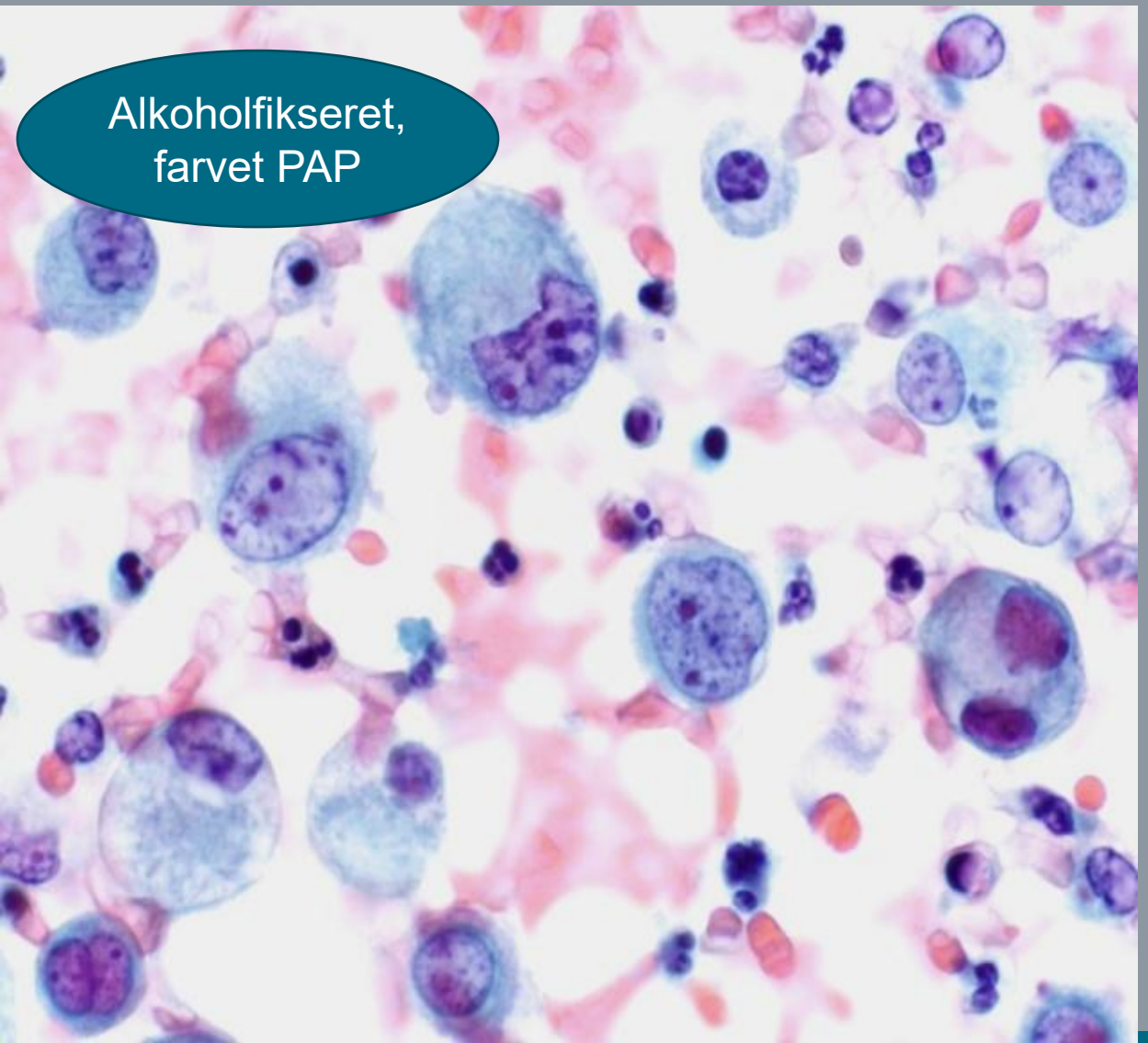
**CELLEKERNERS KROMATIN STRUKTUR: VIGTIG DIAGNOSTISK KRITERIUM I CYTODIAGNOSTIK.**

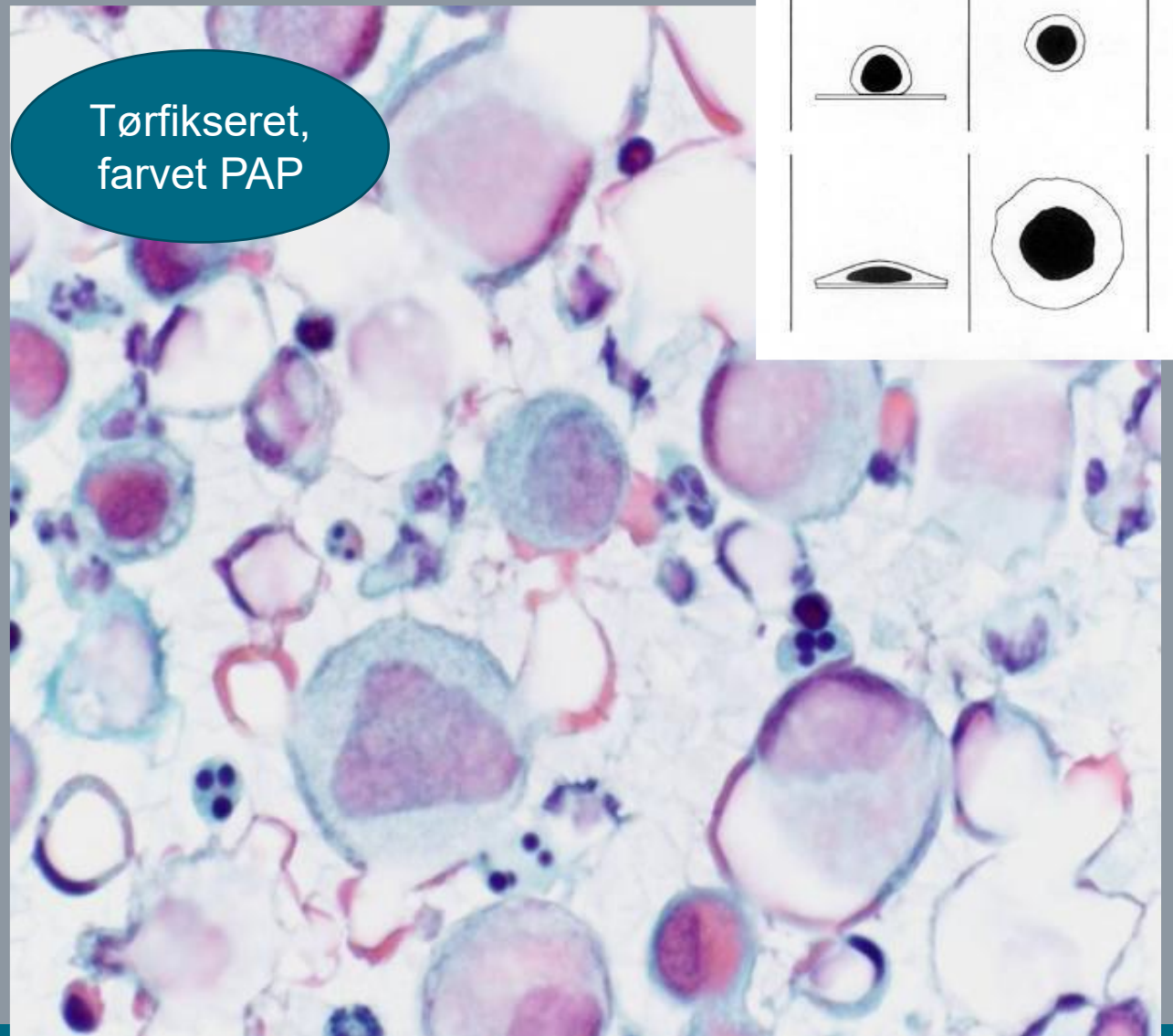




# PAP FARVNING AF HENHOLDVIS ALKOHOL- OG TØR-FIKSERET CELLEUDSTRYGNING (SERØS VÆSKE)



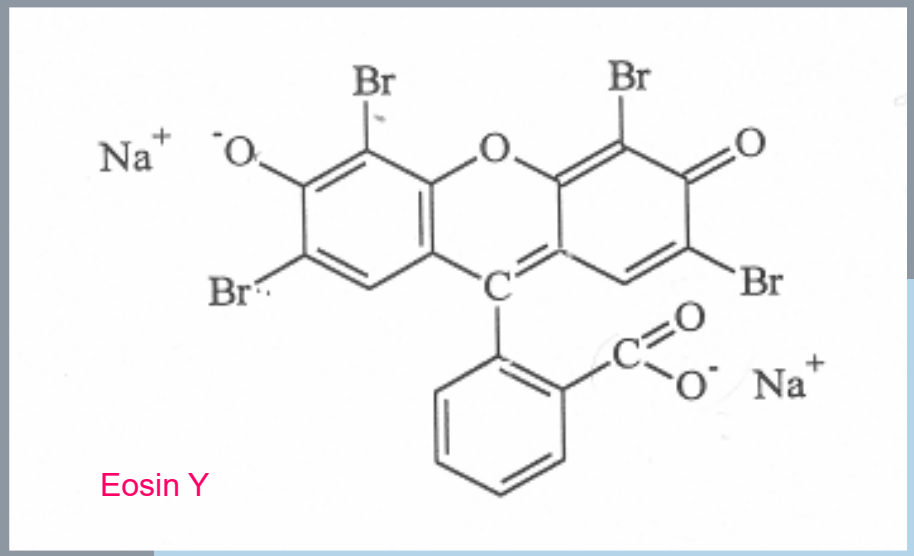



| **Program MGG** | | | **Station** | **Time** | **Critical** |
|---|---|---|---|---|---|
| Start: | Tomt kar | Load B | | | |
| Step 1: | Methanol | | stn 14 eller 23 | 15 min. | YES |
| Step 2: | May-Grünwald | | stn 21 eller 22 | 5 min. | YES |
| Step 3: | Giemsa | | stn 24,25 eller 26 | 15 min. | YES |
| Step 4: | Phosphatstødpudeblanding (buffer) | | stn 15,16 eller 17 | 10 min. | YES |
| Step 5: | Tomt kar | | stn 18,19 eller 20 | 30 sek. | NO |
| Slut: | Tomt kar | Unload D | | | |

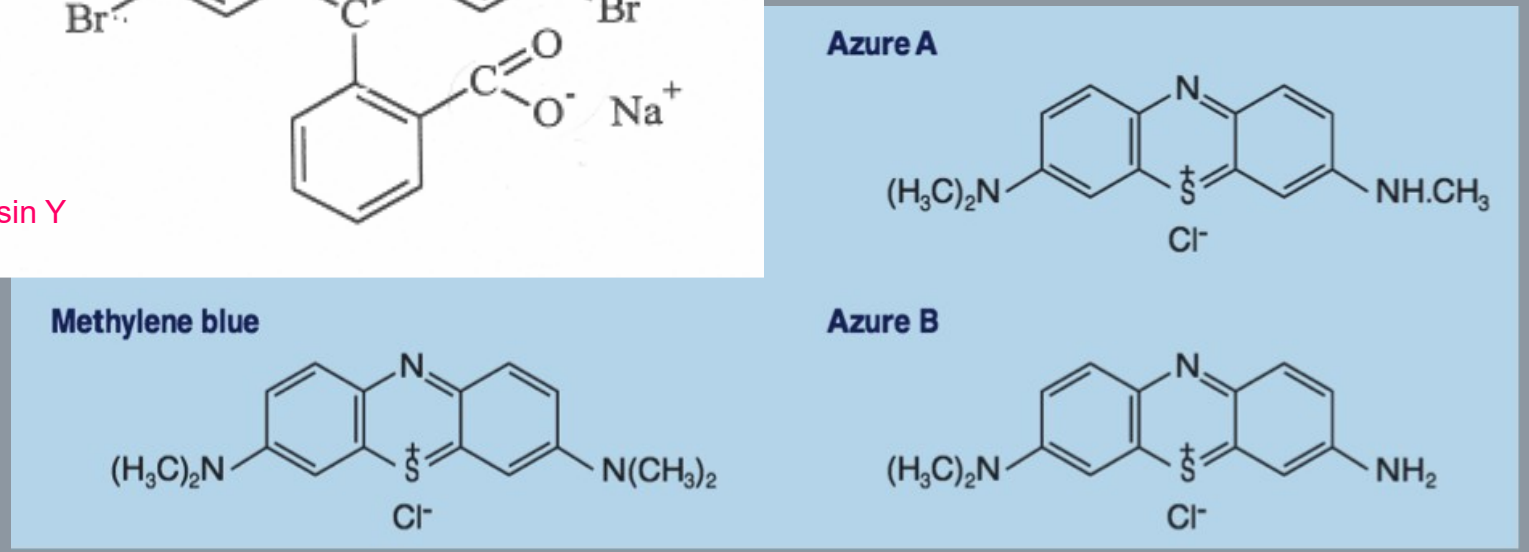
Q-Pulse dokument:
B.C Farveforskrifter, anden cytologi

# MAY GRÜNWALD GIEMSA = MGG

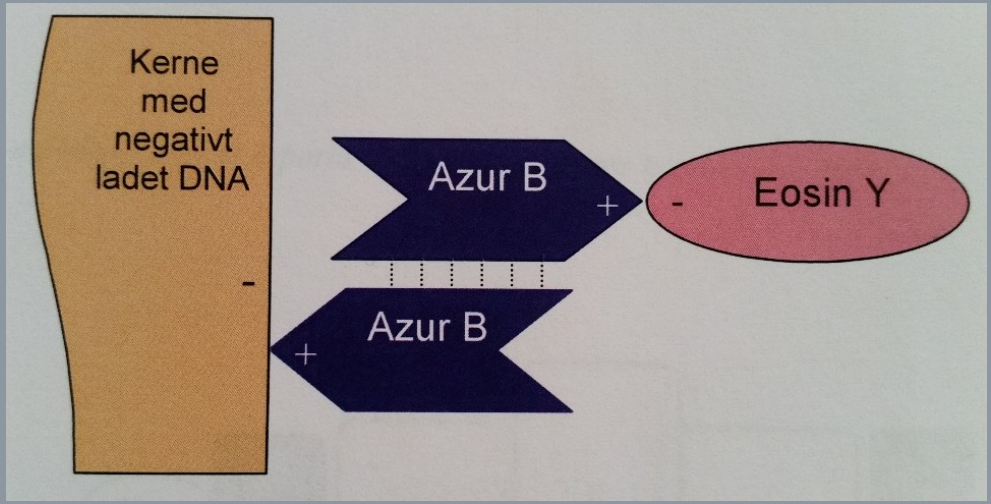
May Grunwald opløsning og Giemsa opløsning består begge af 4 farvestoffer:
Eosin (anion FS)
og Methylenblå, Azur A og Azur B (kation FS)



Eosin Y



# 1. SPECIELLE FARVEEGENSKABER MAY GRUNWALD – GIEMSA: ROMANOWSKI – GIEMSA EFFEKT (FARVE: PURPUR)

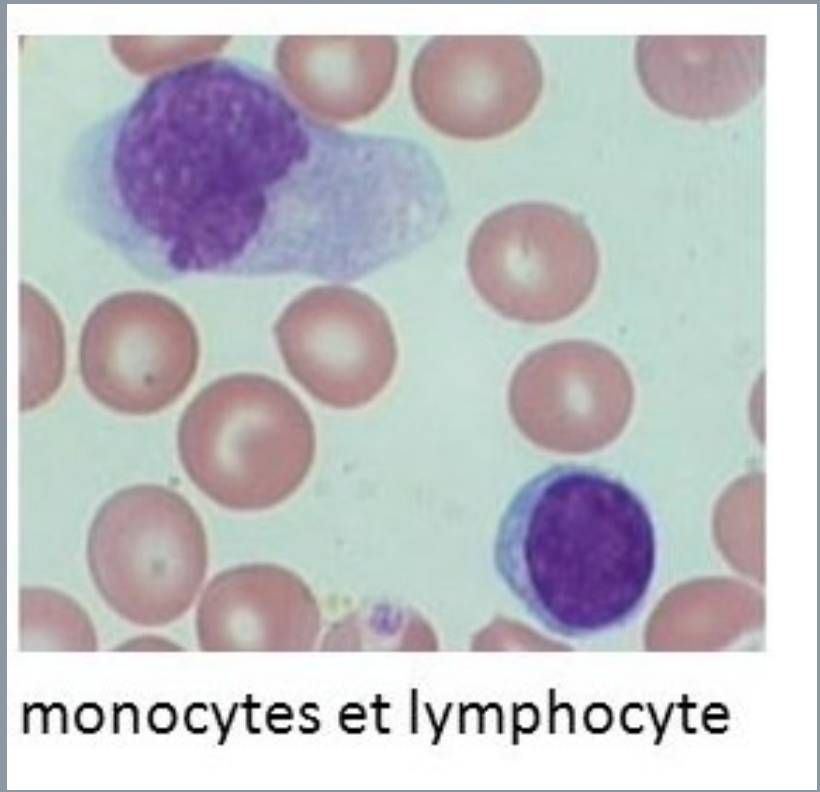



Romanowski – Giemsa effekten

De stiblede linier viser hydrofob interaktion mellem Azur B farvestofferne

Proteinfarvning (histoner) med Eosin også sandsynlig

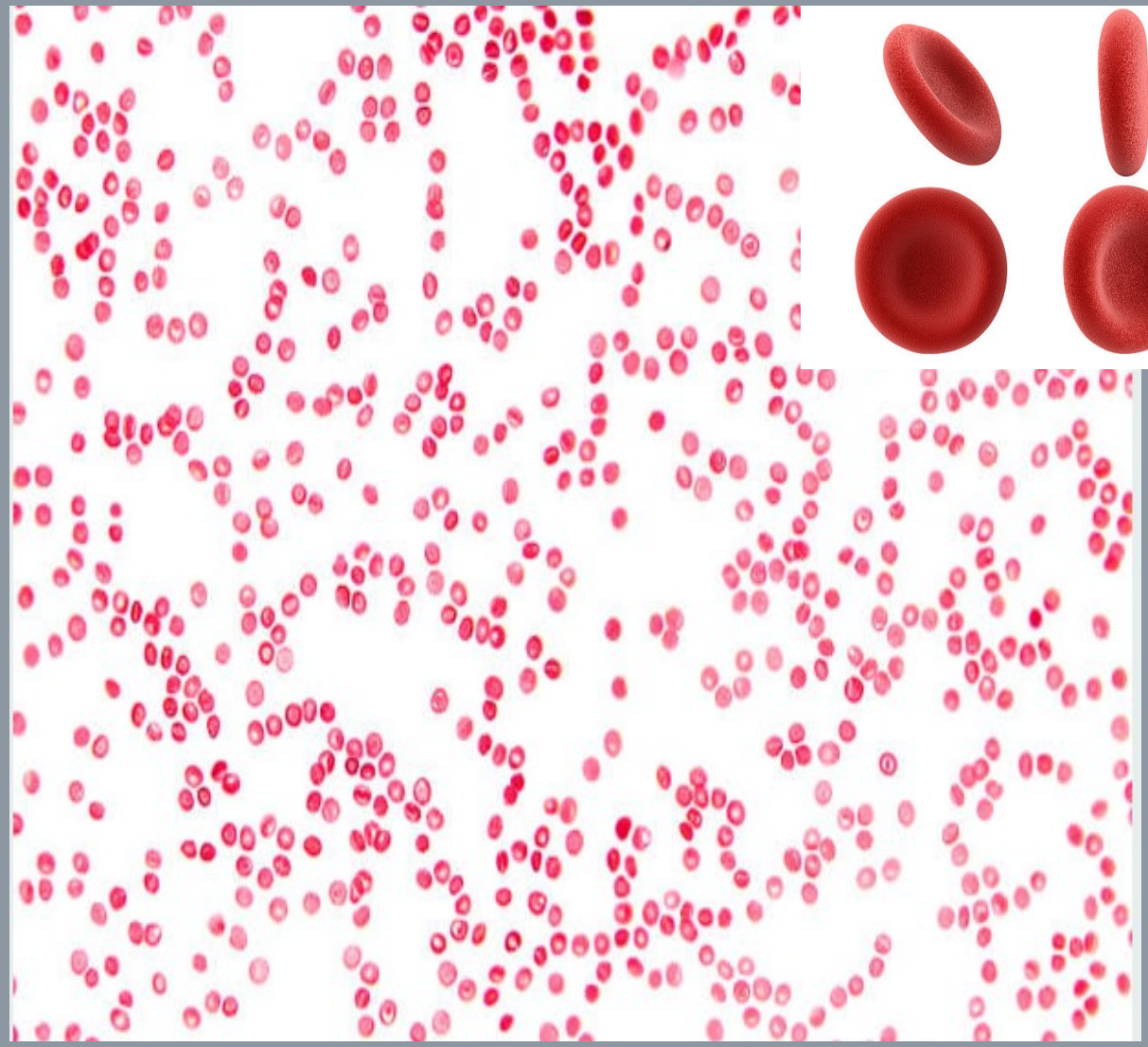
da Romanowsky – Giemsa effekten (purpur farvning ) ikke optræder i celler, der har været udsat for formalin fiksering.




Resultat:
Kerner farves Purpur.
Cytoplasma farves lyseblåt, fordi?

Ref.: Farvning af celler og væv, noter VIA University

# MGG FARVNING AF HÆMATOLOGISKE CELLER





Erytrocytter indeholder ingen kerne

Erytrocytters cytoplasma indeholder store mængder af det basiske protein hæmoglobin (pH iso = 7-8),
hvorfor proteinet overvejende er positivt ladet ved pH 6,5
dermed farves cytoplasma rødt af anionfarvestoffet Eosin Y