

Συλλογή και προετοιμασία των δειγμάτων

James H. Meinkoth, Rick L. Cowell, Ronald D. Tyler και Rebecca J. Morton

Η εκτίμηση των κυτταρολογικών επιχρισμάτων από αλλοιώσεις που αφορούν διάφορους ιστούς είναι πλέον μια αναγνωρισμένη και καταξιωμένη διαγνωστική μέθοδος. Η κυτταρολογική και η ιστοπαθολογική εξέταση πιθανότατα να συνεχίσουν να θεωρούνται συμπληρωματικές μεταξύ τους διαγνωστικές εξετάσεις, αφενός επειδή η κυτταρολογική εξέταση έχει χαμηλό κόστος, είναι ελάχιστα επεμβατική με άμεσο αποτέλεσμα και αφετέρου επειδή η ιστοπαθολογική εξέταση δίνει λεπτομερέστερη πληροφόρηση για τη μικροσκοπική δομή του εξεταζόμενου ιστού. Παρ' όλα αυτά, στην καθημερινή πράξη χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο εξειδικευμένες απεικονιστικές διαγνωστικές εξετάσεις, με αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των κυτταρολογικών εξετάσεων για την αξιολόγηση εστιακών αλλοιώσεων σε εσωτερικά όργανα, από τα οποία παλαιότερα δεν ήταν εφικτό να συλλεχθούν αξιόπιστα δείγματα. Το φάσμα των νοσημάτων που μπορούν να διαγνωστούν με την κυτταρολογική εξέταση έχει διευρυνθεί και η αξιοπιστία και η ακρίβεια της διάγνωσης των αλλοιώσεων διάφορων ιστών έχει βελτιωθεί, καθώς οι κτηνίατροι τη χρησιμοποιούν όλο και περισσότερο και οι κυτταρολόγοι αποκτούν εμπειρία στην εξέταση δειγμάτων από ποικίλες αλλοιώσεις και ιστούς.

Πέρα από την εμπειρία του κυτταρολόγου, ένας από τους κύριους παράγοντες που καθορίζει τη διαγνωστική αξία ενός κυτταρολογικού επιχρίσματος είναι η ποιότητα του δείγματος. Η διαγνωστική αξία των κυτταρολογικών επιχρισμάτων είναι σημαντικά υψηλότερη, όταν συλλέγονται από κτηνίατρος με μεγάλη εμπειρία στη λήψη δειγμάτων για κυτταρολογική εξέταση. Στα δείγματα που προορίζονται για ιστοπαθολογική εξέταση από τη στιγμή που γίνει η λήψη του ιστού και η εμφάνισή του στην ενδεδειγμένη ποσότητα φορμόλης, ο χειρισμός του δείγματος περνά στα χέρια του βοηθού εργαστηρίου. Στην κυτταρολογική εξέταση, ο κλινικός έρχεται αντιμέτωπος με την ευθύνη όχι μόνο να συλλέξει ένα ικανοποιητικό και αντιπροσωπευτικό δείγμα, αλλά και να παρασκευάσει τα κυτταρολογικά επιχρίσματα που πρόκειται να εξεταστούν, όπως και να ολοκληρώσει τη διαδικασία της χρώσης τους. Επειδή τα κύτταρα που πρόκειται να εξεταστούν δεν είναι ορατά κατά τη συλλογή του δείγματος και την προετοιμασία των επιχρισμάτων, πολλές φορές είναι δύσκολο να εκτιμηθεί εάν κατά τη στιγμή της δειματοληψίας έχει συλλεχθεί ικανοποιητικό δείγμα.

Η συλλογή και η προετοιμασία των κυτταρολογικών επιχρισμάτων είναι δεξιότητα που αποκτάται μόνο μέσα από την εμπειρία και τη βελτίωση της τεχνικής δειματοληψίας με βάση το τελικό αποτέλεσμα. Πολλοί κτηνίατροι (και ιδιοκτήτες) είναι λογικό να απογοητεύονται, όταν ένα δείγμα εκτιμάται ως μη διαγνωστικό. Ευτυχώς, η κατανόηση των βασικών αρχών της συλλογής δειγμάτων και η εξοικείωση

με τα συχνότερα τεχνουργήματα που σχετίζονται με την προετοιμασία ενός κυτταρολογικού επιχρίσματος αυξάνουν την πιθανότητα λήψης διαγνωστικού δείγματος.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τη συλλογή κυτταρολογικών δειγμάτων. Οι ενδείξεις κάθε τεχνικής παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1.

Παρακέντηση με λεπτή βελόνα

Η παρακέντηση με λεπτή βελόνα (ΠΛΒ) μπορεί να γίνει με τη χρήση κοινής σύριγγας και βελόνας, με την ταυτόχρονη ή μη άσκηση αρνητικής πίεσης (όπως περιγράφεται παρακάτω). Γενικά, είναι η καλύτερη μέθοδος για τη συλλογή δείγματος από υποδόριες μάζες ή υπερπλαστικές αλλοιώσεις.¹ Με την ΠΛΒ συλλέγονται κύτταρα από το κέντρο της αλλοίωσης και αποφεύγεται η επιμόλυνση από φλεγμονικά κύτταρα ή μικροοργανισμούς που εντοπίζονται στην επιφάνειά της, η οποία είναι συχνή, όταν η δειματοληψία γίνεται με τη μέθοδο του αποτυπώματος, του βαμβακοφόρου στειλεού ή του ξέσματος. Συνήθως τα κύτταρα στην επιφάνεια της αλλοίωσης δεν διατηρούνται ακέραια, με αποτέλεσμα να διαπιστώνονται τεχνουργήματα που σχετίζονται με τη γήρανση των κυττάρων και την έκθεσή τους σε δευτερογενή φλεγμονή, ιδίως όταν πρόκειται για μάζες που έχουν εξελκωθεί. Αυτές οι μεταβολές εμφανίζονται ως κυτταρική ατυπία, της οποίας η διαγνωστική σημασία δεν είναι εύκολο να εκτιμηθεί. Ένα κλασικό παράδειγμα αυτού είναι οι μάζες που εντοπίζονται στην ουροδόχο κύστη. Τα δείγματα που συλλέγονται με καθετηριασμό της ουρήθρας πολλές φορές περιέχουν κύτταρα που εμφανίζουν σημαντικό βαθμό εκφύλιση και τεχνουργήματα, λόγω της γήρανσης και της παρατεταμένης έκθεσής τους στα ούρα (Εικόνα 1.1). Αντίθετα, δείγματα που συλλέγονται από το κέντρο της αλλοίωσης με τη μέθοδο της ΠΛΒ είναι συνήθως καλύτερα διατηρημένα και η εκτίμηση τους ευκολότερη (βλ. Εικόνα 1.1, Α). Η ΠΛΒ είναι, επίσης, η μόνη πρακτική μέθοδος για τη συλλογή δειγμάτων από υποδόριες μάζες ή μάζες που εντοπίζονται σε εσωτερικά όργανα.

Επιλογή σύριγγας και βελόνας

Η ΠΛΒ εκτελείται με βελόνες 22–25 gauge και σύριγγα των 3–20 mL. Όσο πιο μαλακός είναι ο ιστός που πρόκειται να παρακεντηθεί, τόσο πιο μικρή πρέπει να είναι η σύριγγα και η βελόνα που θα χρησιμοποιηθούν. Σπάνια, ακόμα και σε συμπαγείς ιστούς, κρίνεται σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί για την αναρρόφηση βελόνα διαμετρήματος μεγαλύτερου από 22 gauge. Όταν χρησιμοποιούνται βελόνες διαμετρήματος

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1 Ενδείξεις για τις διάφορες μεθόδους δειγματοληψίας

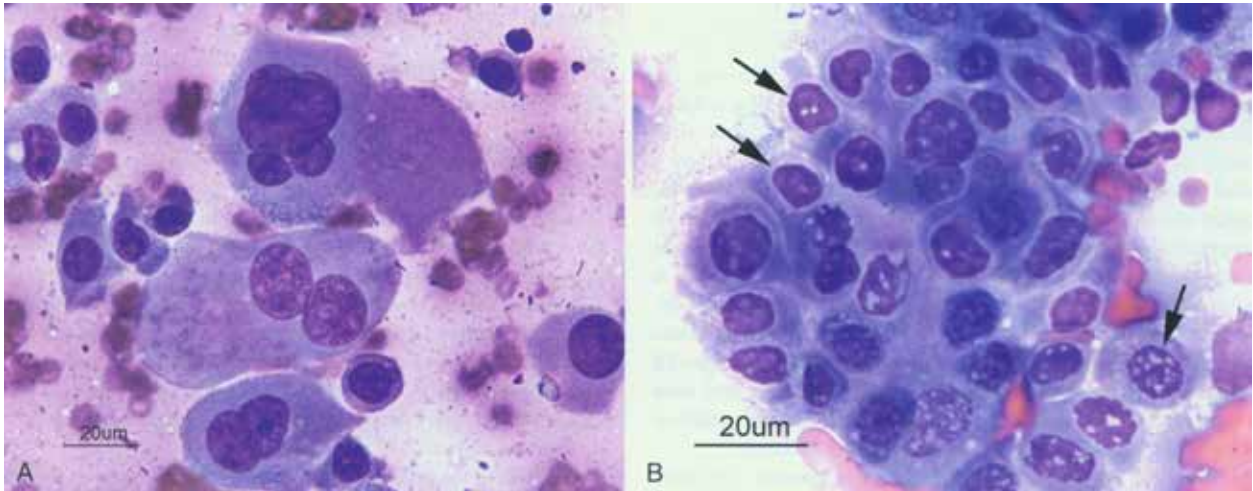
Μέθοδος συλλογής	Ενδείξεις χρήσης	Σχόλια
Παρακέντηση με λεπτή βελόνα (μέθοδος με ή χωρίς την άσκηση αναρρόφησης)	Μάζες (επιφανειακές ή εσωτερικές)	Η καλύτερη μέθοδος για δερματικές ή υποδόριες μάζες, επειδή έτσι αποφεύγεται η επιμόλυνση από την επιφάνεια της αλλοίωσης.
	Λεμφαδένες	
	Εσωτερικά όργανα	Η καλύτερη μέθοδος για ελάχιστα επεμβατική δειγματοληψία από εσωτερικά όργανα και μάζες.
Επιχρίσματα αποτύπωσης	Συλλογή υγρών	
	Εξιδρωματικές δερματικές αλλοιώσεις	Η καλύτερη μέθοδος για την αναγνώριση λοιμογόνων μικροοργανισμών.
	Ενδέχεται να συλληχθούν μόνο επιφανειακά κύτταρα και να υπάρξει επιμόλυνση (πρόβλημα στους εξελκωμένους όγκους).	
Ξέσματα	Προετοιμασία κυτταρολογικών επιχρισμάτων από ιστοτεμάχια που προορίζονται για βιοψία.	Εάν πρόκειται για αποτύπωμα από ιστοτεμάχιο βιοψίας, πρέπει να γίνει απόμαξη του αίματος από το δείγμα.
	Εφαρμόζονται σε επίπεδες δερματικές αλλοιώσεις, στις οποίες δεν μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος της παρακέντησης με λεπτή βελόνα.	Τα επιχρίσματα αποτύπωσης από ιστοτεμάχια βιοψίας θα πρέπει να γίνονται πριν από την έκθεση του ιστοτεμαχίου στη φορμόλη.
	Παρασκευή κυτταρολογικών επιχρισμάτων από ιστοτεμάχια βιοψίας που αποφοιδιώνουν ελάχιστα.	Στις ξηρές δερματικές αλλοιώσεις (π.χ. δερματοφυτίωση) είναι σημαντικό τα ξέσματα να είναι αρκετά βαθιά, ώστε να προκληθεί τριχοειδική αιμορραγία, που διευκολύνει την προσκόλληση των κυττάρων πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα.
Στειλεοί	Κολπικά επιχρίσματα	Γενικά, χρησιμοποιούνται μόνο όταν η ανατομική εντόπιση της αλλοίωσης δεν επιτρέπει άλλου τύπου δειγματοληψία.
	Αυλός συριγγίου	
	Στους αυλούς των συριγγίων το πιο σημαντικό είναι η ταξινόμηση του τύπου της φλεγμονώδους αντίδρασης και η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών.	

μεγαλύτερου από 22 gauge συνήθως αναρροφώνται μικρά τεμάχια ιστού, με αποτέλεσμα στο επίχρισμα να υπάρχουν ελάχιστα ελεύθερα κύτταρα προς εκτίμηση. Επίσης, οι βελόνες μεγαλύτερου διαμετρήματος συνήθως οδηγούν σε πιο αιμορραγικά επιχρίσματα. Για την παρακέντηση αλλοιώσεων που εντοπίζονται βαθιά μέσα στις κοιλότητες του σώματος μπορεί να απαιτούνται μακρύτερες βελόνες, αλλά η διάμετρος θα πρέπει να παραμένει η ίδια. Όταν παρακεντούνται αλλοιώσεις μέσα στις κοιλότητες του σώματος, η βελόνα ενδέχεται να διαπεράσει και άλλα όργανα που δεν είναι το αντικείμενο της εξέτασης και να συλλέξει κύτταρα και από αυτά. Η παρουσία μεσοθηλιακών κυττάρων είναι αρκετά συχνό εύρημα. Η χρήση βελόνας με στειλεό, ο οποίος απομακρύνεται μόνο όταν η βελόνα έχει φτάσει μέσα στην αλλοίωση, μπορεί να βοηθήσει στην αποφυγή λήψης υλικού από άλλα όργανα.

Το μέγεθος της σύριγγας δεν είναι σημαντικό, όταν κατά τη δειγματοληψία δεν ασκείται ταυτόχρονα και αναρρόφηση. Εάν εφαρμοστεί η τεχνική με αναρρόφηση, το μέγεθος της σύριγγας εξαρτάται από τη σύσταση του προς παρακέντηση ιστού. Οι μαλακοί ιστοί, όπως οι λεμφαδένες, μπορούν να παρακεντηθούν με σύριγγα των 3 mL. Οι σκληροί ιστοί, όπως το ίνωμα και το καρκίνωμα του πλακώδους επιθηλίου, απαιτούν τη χρήση μεγαλύτερης σύριγγας, ώστε να ασκηθεί επαρκής αρνητική πίεση (αναρρόφηση) για τη συλλογή ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων. Όταν η σύσταση του ιστού είναι άγνωστη, καλή επιλογή είναι η σύριγγα των 12 mL.

Προετοιμασία του σημείου παρακέντησης

Εάν πρόκειται να γίνουν μικροβιολογικές εξετάσεις σε μέρος του συλλεγόμενου δείγματος ή πρόκειται να παρακεντηθεί κάποια κοιλότητα του σώματος (η περιτοναϊκή ή η θωρακική



Εικόνα 1.1 Φωτογραφία μικροσκοπίου από δείγμα που συλλέχθηκε από καρκίνωμα του μεταβατικού επιθηλίου. (Α) Δείγμα που συλλέχθηκε μετά από παρακέντηση της μάζας με λεπτή βελόνα. Τα κύτταρα έχουν διατηρηθεί πολύ καλά, επιτρέποντας την αξιολόγηση των χαρακτηριστικών του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. (Β) Δείγμα που συλλέχθηκε μετά από τραυματικό καθετηριασμό. Σε τέτοιου είδους δειγματοληψία συλλέγονται επιφανειακά κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές ως αποτέλεσμα της γήρανσης και της έκθεσής τους στα ούρα. Διαπιστώνεται εκφύλιση των πυρήνων, οι οποίοι παρουσιάζουν ομοιογενή ανοικτό ρόδινο προς πορφυρό χρωματισμό, αλλά και σημεία ρήξης που εμφανίζονται ως πολυάριθμες διαυγείς περιοχές μέσα σε αυτούς (βέλη). (Ευγενική παραχώρηση από το αρχείο του Oklahoma State University.)

κοιλότητα, οι αρθρώσεις κ.λπ.), η περιοχή της παρακέντησης προετοιμάζεται με χειρουργική αντισηψία. Διαφορετικά η προετοιμασία του δέρματος είναι ανάλογη με αυτή που εφαρμόζεται για τη χορήγηση ενός εμβολίου ή τη λήψη δείγματος αίματος. Για τον καθαρισμό της περιοχής μπορεί να χρησιμοποιηθεί βαμβάκι με οινόπνευμα. Εάν τα δείγματα συλλεχθούν υπό υπερηχοτομογραφική καθοδήγηση, είναι σημαντικό να αποφεύγεται η χρήση της ειδικής γέλης και ως μέσο αύξησης της ευκρίνειας του υπερήχου να χρησιμοποιείται κάποιο αλκοολούχο διάλυμα.

Η γέλη αυτή βάφεται ροδόχρωμη με τις συνήθεις χρωστικές. Ακόμα και μια μικρή ποσότητά της, που πιθανώς να διεισδύσει στον αυλό της βελόνας, καθώς αυτή διαπερνά το δέρμα, είναι αρκετή να επισκιάσει τελείως τα κύτταρα, με αποτέλεσμα την παρασκευή μη διαγνωστικών επιχρισμάτων.

Μέθοδος χωρίς αναρρόφηση (τριχοειδική μέθοδος)

Κατά τη δειγματοληψία με ΠΛΒ, οι περισσότεροι κτηνίατροι προτιμούν να μην εφαρμόζουν παράλληλα και αρνητική πίεση. Αυτή η τεχνική οδηγεί σε δείγματα της ίδιας ή καλύτερης ποιότητας σε σύγκριση με αυτά που λαμβάνονταν παλαιότερα με τη μέθοδο της αναρρόφησης.⁴⁻⁶ Η μέθοδος χωρίς αναρρόφηση δίνει πολύ καλά αποτελέσματα στα περισσότερα είδη μαζών και ιδιαίτερα σε όσες είναι αγγειοβριθείς.¹ Η διαδικασία εκτελείται με τη χρήση βελόνας μικρού διαμετρήματος, προσαρμοσμένης πάνω σε σύριγγα των 3–12 mL. Ο κύλινδρος της σύριγγας προπληρώνεται με αέρα πριν από την προσπάθεια συλλογής του δείγματος, ώστε να είναι εφικτή η άμεση εξώθηση του υλικού που συλλέχθηκε πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Η σύριγγα συγκρατείται κοντά ή πάνω στο πλαστικό τμήμα της βελόνας με τον αντίχειρα και τον δείκτη (όπως όταν κάποιος κρατά ένα βελάκι), ώστε να είναι καλά ελεγχόμενη (Εικόνα 1.2). Η μάζα που πρόκειται να παρακεντηθεί συγκρατείται με ελεύθερο χέρι και η βελόνα εισάγεται μέσα στη μάζα. Η βελόνα μετακινείται γρήγορα

πίσω και εμπρός, όπως ένα μαχαίρι, ενώ γίνεται προσπάθεια να διατηρηθεί η ίδια κατεύθυνση, όπως για παράδειγμα κατά τη λειτουργία μιας μηχανής ραψίματος. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει τη συλλογή κυττάρων μέσω της κοπής και της άσκησης πίεσης στον ιστό. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα, ώστε το άκρο της βελόνας να παραμένει σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας μέσα στη μάζα, για να αποφευχθεί η επιμόλυνση του δείγματος από παρακείμενους ιστούς. Στη συνέχεια, η βελόνα αποσύρεται, το υλικό της εξωθείται πάνω σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα και προετοιμάζεται ένα κυτ-



Εικόνα 1.2 Η μέθοδος της παρακέντησης με λεπτή βελόνα χωρίς ταυτόχρονη άσκηση αναρρόφησης. Η σύριγγα συγκρατείται κοντά ή στο ύψος της βελόνας με τον δείκτη και τον αντίχειρα. Παρατηρήστε ότι η σύριγγα είναι ήδη προπληρωμένη με αέρα. Το ελεύθερο άκρο χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση της μάζας. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον πολύ καλό έλεγχο των κινήσεων της βελόνας. (Ευγενική παραχώρηση από Oklahoma State University.)

ταρολογικό επίχρισμα με την εφαρμογή μιας των τεχνικών που περιγράφονται παρακάτω σε αυτό το κεφάλαιο (βλ. «Παρασκευή επιχρισμάτων»).

Η προπλήρωση της σύριγγας με αέρα επιτρέπει την ταχεία εξώθηση του δείγματος πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα και αποτρέπει την ξήρανση (στέγνωμα) των κυττάρων που συλλέχθηκαν και την πήξη του δείγματος.⁶

Ορισμένοι εκτελούν τη μέθοδο χωρίς αναρρόφηση μόνο με τη χρήση βελόνας, χωρίς να έχουν προσαρμόσει σε αυτή σύριγγα. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει ακόμα καλύτερο έλεγχο του σημείου εισαγωγής και των κινήσεων της βελόνας, αν και στη συνέχεια πρέπει να προσαρμοστεί μια σύριγγα πάνω στη βελόνα, ώστε να εξωθηθεί το δείγμα που περιέχεται σε αυτή. Μια άλλη παραλλαγή που προτείνεται για τη συλλογή δειγμάτων με υπερηχοτομογραφική καθοδήγηση είναι η τοποθέτηση συσκευής ενδοφλέβιας χορήγησης υγρών ανάμεσα στη βελόνα και στη σύριγγα.⁶ Αυτό επιτρέπει την ελεύθερη κίνηση της βελόνας με το ένα χέρι κατά τη συλλογή του δείγματος. Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας, η σύριγγα μπορεί να κρεμαστεί πάνω από τον ώμο και στη συνέχεια το ελεύθερο χέρι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη γρήγορη εξώθηση του υλικού πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα.

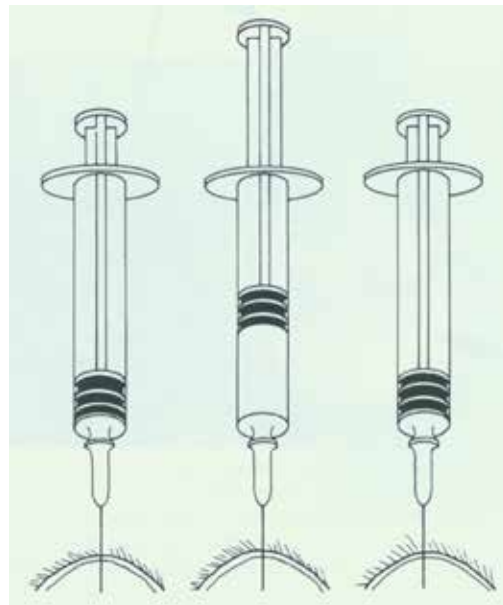
Μέθοδος με αναρρόφηση

Με την παλαιότερη μέθοδο της ΠΛΒ, όπου ταυτόχρονα γίνεται αναρρόφηση, η μάζα σταθεροποιείται με το ένα χέρι, ενώ η βελόνα, με συνδεδεμένη τη σύριγγα, εισάγεται στο κέντρο της μάζας (Εικόνα 1.3). Ασκείται ισχυρή αρνητική πίεση, τραβώντας το έμβολο της σύριγγας μέχρι τα τρία τέταρτα του όγκου της (Εικόνα 1.4). Εάν η μάζα έχει ικανοποιητικό μέγεθος και ο ασθενής συγκρατείται επαρκώς, η αρνητική πίεση μπορεί να διατηρηθεί, ενώ η βελόνα μετακινείται πίσω-μπρος επαναλαμβανόμενα, διασχίζοντας περίπου τα δυο τρίτα της μάζας. Σε μεγάλου μεγέθους αλλοιώσεις η βελόνα μπορεί να ανακατευθυνθεί προς διάφορες περιοχές μέσα στο σώμα της μάζας, ώστε να αυξηθεί η ποσότητα του δείγματος. Εναλλακτικά, μπορεί να παρακεντηθούν αρκετές διαφορετικές περιοχές της μάζας σε ξεχωριστές προσπάθειες. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα, ώστε κατά την άσκηση αρνη-



Εικόνα 1.3 Η μέθοδος της παρακέντησης με λεπτή βελόνα με ταυτόχρονη άσκηση αναρρόφησης. Η μάζα ακινητοποιείται με το ένα χέρι, ενώ η βελόνα εισάγεται στο κέντρο της. Το άκρο που συγκρατεί τη σύριγγα ταυτόχρονα διατηρεί το έμβολο της τραβηγμένο προς τα πίσω, δημιουργώντας αρνητική πίεση. (Ευγενική παραχώρηση από Oklahoma State University.)

διδακτικό υλικό;



Εικόνα 1.4 Παρακέντηση συμπαγούς μάζας με τη μέθοδο της λεπτής βελόνας. Μετά την εισαγωγή της βελόνας μέσα στη μάζα (Α), ασκείται αρνητική πίεση με την απότομη έλξη του εμβόλου της σύριγγας προς τα πίσω (Β), συνήθως έως το μέσο ή τα δυο τρίτα του όγκου του κυλίνδρου της σύριγγας. Η βελόνα ανακατευθύνεται αρκετές φορές, ενώ το έμβολο παραμένει τραβηγμένο προς τα πίσω, ώστε να διατηρείται η αρνητική πίεση, χωρίς το άκρο της βελόνας να βγει πλήρως από το σώμα της μάζας. Πριν η βελόνα να απομακρυνθεί από τη μάζα, το έμβολο αφήνεται ελεύθερο, οπότε εκτονώνεται η αρνητική πίεση μέσα στη σύριγγα (Γ).

τικής πίεσης η βελόνα να μην εξέρχεται πλήρως από τη μάζα, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει στη μεταφορά του δείγματος μέσα στον κύλινδρο της σύριγγας (απ' όπου ενδέχεται να μην μπορεί να ανακτηθεί) ή να οδηγήσει σε επιμόλυνση του δείγματος από τους παρακείμενους ιστούς.

Σε καμία περιοχή η αρνητική πίεση δεν πρέπει να εφαρμόζεται για περισσότερο από λίγα δευτερόλεπτα. Συχνά, το υλικό που αναρροφήθηκε δεν είναι ορατό μέσα στον αυλό της σύριγγας ή στο πλαστικό τμήμα της βελόνας, ακόμα και όταν έχει ληφθεί ικανοποιητική ποσότητα δείγματος. Όταν ασκείται υπερβολική δύναμη ή παρατεταμένη αρνητική πίεση, προκαλείται τελικά ρήξη των αγγείων του αίματος, με αποτέλεσμα το δείγμα να επιμολύνεται με περιφερικό αίμα, να αραιώνονται τα κύτταρα του ιστού-στόχου και, τελικά, να λαμβάνεται μη διαγνωστικό δείγμα.

Μετά τη δειγματοληψία από διάφορες περιοχές, η αρνητική πίεση απελευθερώνεται και η βελόνα απομακρύνεται από τη μάζα και το δέρμα. Η βελόνα αποσπάται από τη σύριγγα και αναρροφάται αέρας μέσα στην τελευταία. Η βελόνα επανατοποθετείται πάνω στη σύριγγα και μια ποσότητα του ιστού που βρίσκεται μέσα στον κύλινδρο της σύριγγας ή στο στέλεχος της βελόνας εξωθείται στο ένα άκρο μιας αντικειμενοφόρου πλάκας με την επαναφορά του εμβόλου. Όταν είναι εφικτό, δημιουργούνται αρκετά επιχρίσματα, όπως περιγράφεται παρακάτω σε αυτό το κεφάλαιο (βλ. «Παρασκευή των επιχρισμάτων»).

Εάν είναι εφικτό, το ιδανικό είναι να γίνονται πολλές προσπάθειες παρακέντησης της μάζας σε διαφορετικά σημεία, ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα να ληφθεί υλικό που

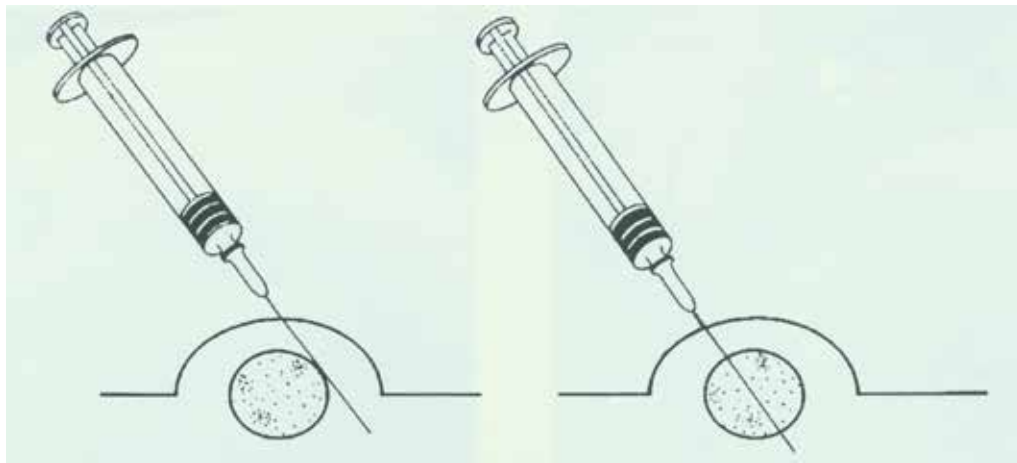
θα οδηγήσει σε διάγνωση και να διασφαλιστεί η συλλογή αντιπροσωπευτικού δείγματος από την αλλοίωση.

Χρήσιμες συμβουλές κατά τη συλλογή δειγμάτων

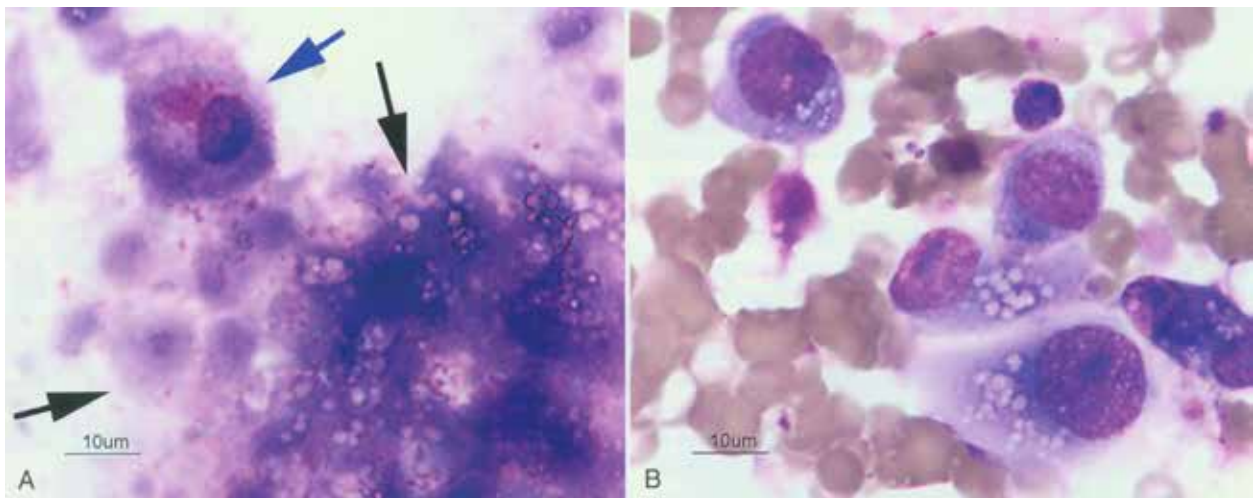
Προετοιμάστε και αποστείλετε πολλαπλά επιχρίσματα. Αυτό είναι μάλλον το μοναδικό πράγμα που μπορεί να γίνει εύκολα και αυξάνει την πιθανότητα διάγνωσης. Για τη συλλογή υλικού για κυτταρολογική εξέταση χρησιμοποιούνται βελόνες μικρού διαμετρήματος και η διαδικασία συνήθως δεν είναι επώδυνη. Είναι λιγότερο χρονοβόρο να γίνουν πολλαπλές προσπάθειες δειγματοληψίας και να προετοιμαστεί ικανοποιητικός αριθμός επιχρισμάτων κατά την πρώτη προσκόμιση του ζώου, παρά να επαναληφθεί η προσπάθεια, αφού αποδειχθεί ότι τα επιχρίσματα ήταν μη διαγνωστικά, ενώ μάλιστα συχνά το ζώο έχει ήδη πάρει εξιτήριο από την κλινική. Τα παραπάνω είναι ακόμη ση-

μαντικότερα, εάν για τη συλλογή του υλικού απαιτείται η ηρέμηση ή η γενική αναισθησία του ζώου. Το ιδανικό είναι να βάζονται και να εξετάζονται ένα ή δυο από τα επιχρίσματα, ώστε να διασφαλιστεί ότι είναι αρκετά κυτταροβριθή και ενώ το ζώο βρίσκεται ακόμα στην κλινική (ή πριν από την ανάνηψή του από τη γενική αναισθησία ή την ηρέμηση). Εάν τα επιχρίσματα που επιλέχθηκαν να βαφούν δεν είναι επαρκώς κυτταροβριθή, μπορεί να γίνουν άμεσα και άλλες προσπάθειες συλλογής υλικού.

Υπάρχουν πολύ πιθανοί λόγοι που ένα επίχρισμα δεν είναι διαγνωστικό. Το επίχρισμα μπορεί να μην περιέχει καθόλου κύτταρα που να οδηγούν σε διάγνωση, επειδή η βελόνα αστόχησε να πετύχει την αλλοίωση κατά τη δειγματοληψία (τοπογραφικό λάθος) (Εικόνα 1.5) ή μπορεί να βρέθηκε σε μη αντιπροσωπευτική περιοχή της αλλοίωσης (π.χ. σε περιοχή νεοπλάσματος που εμφανίζει φλεγμονή ή νέκρωση (Εικόνα



Εικόνα 1.5 Τοπογραφική αστοχία. Κάποιες φορές κατά τη δειγματοληψία η βελόνα δεν εισέρχεται στην περιοχή που περιέχει αντιπροσωπευτικό ιστό της αλλοίωσης. Αυτό συμβαίνει συχνά σε παχύσαρκα ζώα, οπότε η αλλοίωση περιβάλλεται από άφθονο υποδόριο λίπος. (Ευγενική παραχώρηση από Oklahoma State University.)



Εικόνα 1.6 Δείγματα που συλλέχθηκαν από καρκίνωμα του προστάτη αδένου με περιοχές νέκρωσης. (Α) Τα περισσότερα επιχρίσματα αφορούσαν σε νεκρωμένες περιοχές και περιείχαν κυρίως νεκρωτικό κυτταρικό υλικό (μαύρα βέλη). Διαπιστώνεται μόνο ένα μερικώς ακέραιο κύτταρο (κυανό βέλος). Αυτά τα επιχρίσματα δεν είναι διαγνωστικά. (Β) Μία από τις προσπάθειες οδήγησε σε δειγματοληψία από μη νεκρωτική περιοχή και τα επιχρίσματα που παρασκευάστηκαν περιείχαν άφθονα ακέραια κύτταρα, που οδήγησαν στη διάγνωση. Αυτό το παράδειγμα υπογραμμίζει τη σπουδαιότητα της δειγματοληψίας από διαφορετικές περιοχές μιας μάζας. (Ευγενική παραχώρηση από Oklahoma State University.)

1.6). Επιπρόσθετα, σε κάποιες αλλοιώσεις δεν αποβάλλονται αρκετά κύτταρα. Ακόμη και αν συλλεχθεί ικανοποιητικός αριθμός κυττάρων, κάποιες φορές τα κύτταρα δεν διασκορπίζονται καλά και το επίχρισμα καταλήγει να είναι πάρα πολύ παχύ και να μην μπορεί να εκτιμηθεί (ιδιαίτερα συχνό φαινόμενο κατά την παρακέντηση των λεμφαδένων) ή όλα τα κύτταρα υφίστανται ρήξη κατά την προετοιμασία του επιχρίσματος (Εικόνα 1.7).

Δεν είναι σπάνιο να συλλέγονται πολλαπλά επιχρίσματα από την ίδια αλλοίωση και όλα τα επιχρίσματα εκτός από ένα να είναι μη διαγνωστικά για τον ένα ή τον άλλο λόγο, ακόμα και όταν ο κτηνίατρος έχει μεγάλη εμπειρία στη συλλογή κυτταρολογικού υλικού.

Εάν είναι εφικτό, πρέπει να αποστέλλονται το ελάχιστο τέσσερα έως πέντε επιχρίσματα, προερχόμενα από ανάλογες προσπάθειες συλλογής υλικού από διαφορετικά σημεία μιας αλλοίωσης. Εάν κάποια από τα επιχρίσματα έχουν μεγάλο πάχος ή μοιάζουν να έχουν ελάχιστο ή και καθόλου υλικό, πρέπει να προετοιμάζονται καινούργια επιχρίσματα. Με την προετοιμασία πολλαπλών επιχρισμάτων, οι πιθανότερες τουλάχιστον ένα από αυτά να είναι διαγνωστικό αυξάνονται.

Εάν η δειγματοληψία αφορά σε πολλαπλές μάζες, για κάθε μία από αυτές πρέπει να χρησιμοποιείται νέα σύριγγα και βελόνα. Εάν δεν γίνει αυτό, τα επιχρίσματα που προέρχονται από τη μία μάζα μπορεί να επιμολυνθούν από κύτταρα που υπάρχουν μέσα στον αυλό της βελόνας από προηγούμενες προσπάθειες. Κάθε επίχρισμα θα πρέπει να σημαίνεται καθαρά ως προς την ανατομική περιοχή από την οποία προέρχεται.

Αποφύγετε την αραιώση του υλικού με αίμα. Η επιμόλυνση με αίμα (αιμοαραίωση) είναι ένα ακόμα συχνό αίτιο μη διαγνωστικών επιχρισμάτων. Η μέθοδος της ΠΛΒ με ταυτόχρονη άσκηση αναρρόφησης οδηγεί στη συλλογή υλικού από τον ιστό με τη μικρότερη αντίσταση. Εάν προκληθεί ρήξη των αιμοφόρων αγγείων που βρίσκονται μέσα σε μια αλλοίωση, ο ιστός με τη μικρότερη αντίσταση είναι το περιφερικό αίμα. Εάν η επιμόλυνση του δείγματος με αίμα είναι σημαντική, τότε αυτό είναι δύσκολο να διασωθεί. Θα πρέπει να γίνουν νέες προσπάθειες με τη χρήση καθαρής σύριγγας και βελόνας.

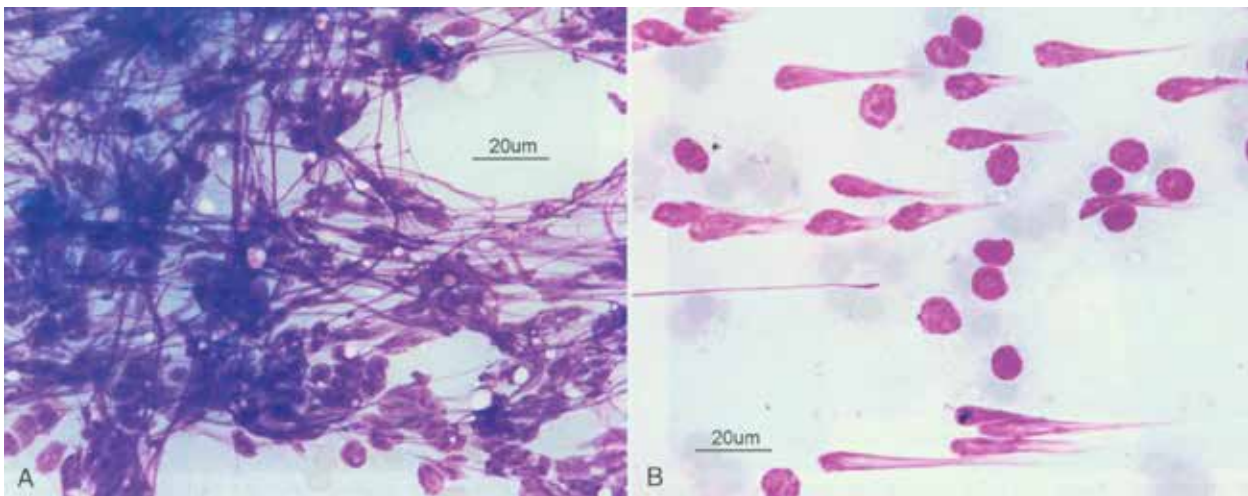
Οι δύο κύριες αιτίες της επιμόλυνσης του δείγματος με αίμα είναι η χρήση βελόνας πολύ μεγάλου διαμετρήματος (<22 gauge) και η παρατεταμένη αναρρόφηση. Οι βελόνες μεγάλου διαμετρήματος δεν συλλέγουν συνήθως περισσότερα κύτταρα, αλλά είναι πιθανότερο να οδηγήσουν σε ρήξη των αιμοφόρων αγγείων. Όπως επισημάνθηκε και πριν, το υλικό που συλλέγεται δεν είναι πάντα ορατό μέσα στον αυλό της σύριγγας, παρά το γεγονός ότι υπάρχει ικανοποιητική ποσότητα υλικού μέσα στον αυλό της βελόνας. Κάθε φορά που γίνεται αντιληπτή η παρουσία υλικού μέσα στο πλαστικό στέλεχος της βελόνας, η δειγματοληψία θα πρέπει να διακόπτεται και αμέσως να προετοιμάζονται τα επιχρίσματα.

Κάποιες αλλοιώσεις είναι ιδιαίτερα αγγειοβριθείς, καθιστώντας αδύνατη τη μη επιμόλυνση του δείγματος με αίμα, ακόμα και όταν η μέθοδος δειγματοληψίας εφαρμόζεται σωστά. Σε αυτά τα περιστατικά, η εφαρμογή της μεθόδου χωρίς αναρρόφηση μπορεί να οδηγήσει σε μικρότερη επιμόλυνση του δείγματος με αίμα και μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων προς εκτίμηση.

Μην είστε διστακτικοί. Άλλα αίτια που οδηγούν σε επιχρίσματα χαμηλής κυτταρικότητας είναι η ανεπαρκής άσκηση αρνητικής πίεσης (στην τεχνική με αναρρόφηση) και η αργή ή επιφανειακή είσοδος της βελόνας (στην τεχνική χωρίς αναρρόφηση). Όταν εφαρμόζεται η τεχνική χωρίς αναρρόφηση, ο κτηνίατρος βασίζεται στην κοπτική ικανότητα της βελόνας που διαπερνά τον ιστό για τη συλλογή ενός μείγματος κυττάρων και υγρών από τον ιστό, το οποίο θα εισέλθει στον αυλό της βελόνας ως αποτέλεσμα του τριχοειδούς φαινομένου. Η διέλευση της βελόνας πρέπει να είναι ταχεία και σε επαρκές βάθος (αν και το μέγεθος της μάζας περιορίζει το βάθος εισαγωγής της βελόνας).

Επιχρίσματα με τη μέθοδο του αποτυπώματος

Τα επιχρίσματα αποτύπωσης μπορούν να ληφθούν από αλλοιώσεις με εξέλκωση ή επιφανειακή εξιδρωση (Εικόνα 1.8) ή από βιοψίες ιστών που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης ή στη νεκροτομή (Εικόνα 1.9). Στα επιχρίσματα αποτύπωσης από επιφανειακές αλλοιώσεις συνήθως παρατηρούνται μόνο φλεγμονικά κύτταρα, ακόμα και



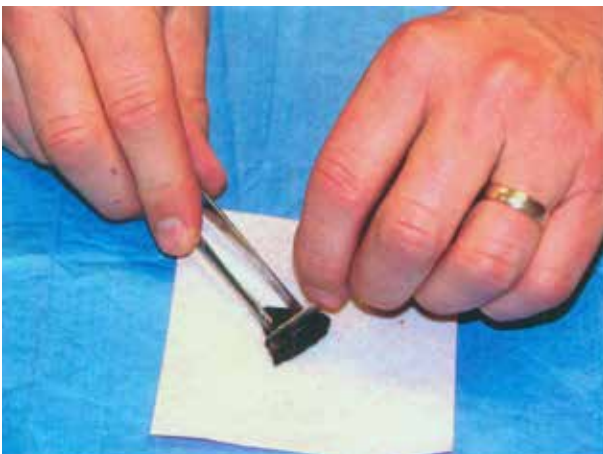
Εικόνα 1.7 Εικόνες από επιχρίσματα μετά από παρακέντηση υπερπλαστικού λεμφαδένα. Το δείγμα ήταν μη διαγνωστικό, καθώς όλα τα κύτταρα εμφάνιζαν ρήξη λόγω της υπερβολικής πίεσης που ασκήθηκε κατά την παρασκευή του επιχρίσματος. (Α) Το γραμμοειδές υλικό που εμφανίζεται αντιπροσωπεύει τη χρωματίνη του πυρήνα των κυττάρων σε ρήξη. (Β) Τα κύτταρα που έχουν ρηχθεί συχνά παρουσιάζουν ουρές σαν κομήτης, όλες προς την ίδια κατεύθυνση. (Ευγενική παραχώρηση από Oklahoma State University.)



Εικόνα 1.8 Εξελκωμένη αλλοίωση με επιφανειακή εξίδρωση στο πρόσωπο γάτας. Η θέση της αλλοίωσης επιτρέπει τη λήψη υλικού με τη μέθοδο της αποτύπωσης. Τα επιχρίσματα αποκάλυψαν φλεγμονώδη κύτταρα και τον μικροοργανισμό *Sporothrix*. (Ευγενική παραχώρηση από Oklahoma State University.)

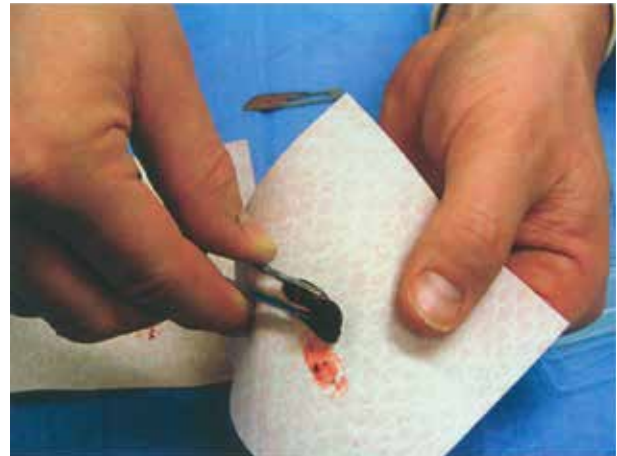
αν η φλεγμονή είναι δευτερογενής, επειδή τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί να μην αποπίπτουν μέσα στο εξίδρωμα ή στα αποτυπώματα από εξελκωμένες μάζες. Εάν είναι δυνατόν, πρέπει να συλλέγεται παράλληλα και με την τεχνική της ΠΛΒ υλικό από τους ιστούς κάτω από την εξελκωμένη ή την εξιδρωματική αλλοίωση. Η είσοδος της βελόνας μέσω μιας μη εξελκωμένης περιοχής βοηθά στον περιορισμό της επιμόλυνσης του υλικού. Τα αποτυπώματα από εξιδρώματα ή έλκη είναι πιο αξιόπιστα, για να εκτιμηθεί η παρουσία βακτηρίων ή μυκήτων. Να θυμάστε ότι η παρουσία βακτηρίων μπορεί να οφείλεται μόνο σε δευτερογενή λοίμωξη.

Τα αποτυπώματα από εξελκωμένες περιοχές πρέπει να λαμβάνονται πριν από τον καθαρισμό τους. Η αλλοίωση πρέπει στη συνέχεια να καθαρίζεται με έναν χειρουργικό σπόγγο εμποτισμένο με φυσιολογικό ορό και να λαμβάνονται εκ νέου αποτυπώματα ή ξέσματα.

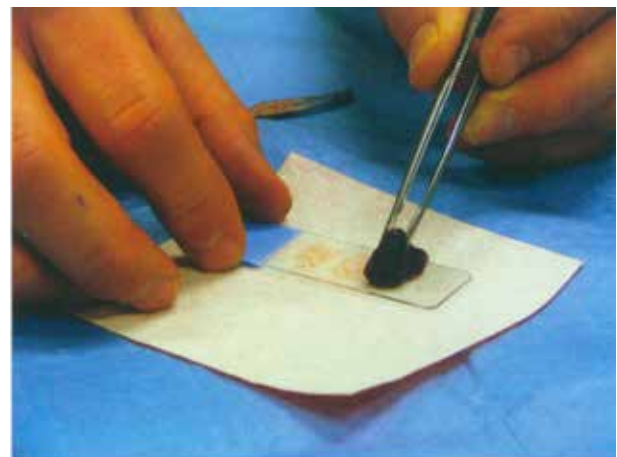


Εικόνα 1.9 Επιχρίσματα με τη μέθοδο του αποτυπώματος από ιστό που ελήφθη κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης. Ο ιστός κόβεται, ώστε να δημιουργηθεί μια νωπή επιφάνεια, από την οποία θα γίνει το αποτύπωμα. Εάν μαζί με τη μάζα έχει εκταμεί και φυσιολογικός ιστός που την περιβάλλει, είναι σημαντικό η τομή να γίνει στην περιοχή ενδιαφέροντος. (Ευγενική παραχώρηση από Oklahoma State University.)

Για την παρασκευή επιχρισμάτων από ιστούς που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης ή νεκροψίας, το ιστοτεμάχιο πρέπει πρώτα να κοπεί, έτσι ώστε να δημιουργηθεί μια νέα επιφάνεια, από την οποία θα ληφθούν αποτυπώματα (βλ. Εικόνα 1.9). Στη συνέχεια, η περίσσεια αίματος και υγρών του ιστού πρέπει να αφαιρούνται από την επιφάνεια της αλλοίωσης, από την οποία πρόκειται να ληφθεί το αποτύπωμα, με την απόμαξη της από ένα καθαρό απορροφητικό υλικό (Εικόνα 1.10). Η περίσσεια αίματος και υγρών εμποδίζουν τα κύτταρα του ιστού να προσκολληθούν στην αντικειμενοφόρο πλάκα, οδηγώντας στην παρασκευή επιχρισμάτων χαμηλής κυτταρικότητας. Επίσης, η υπερβολικό υγρό αποτρέπει την καλή διασπορά των κυττάρων, ώστε να παρουσιάζουν το μέγεθος και το σχήμα που συνήθως έχουν σε επιχρίσματα που έχουν στεγνώσει στον αέρα. Μετά την απόμαξη της περίσσειας του αίματος και των υγρών από τους ιστούς, η επιφάνεια της αλλοίωσης έρχεται σε επαφή (πιέζεται) στο μέσο μιας καθαρής αντικειμενοφόρου πλάκας



Εικόνα 1.10 Η επιφάνεια του ιστού απομάσσεται αρκετές φορές πάνω σε απορροφητικό υλικό, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια αίματος και υγρών. Αυτό είναι πολύ σημαντικό, καθώς έτσι αποφεύγεται η παρασκευή επιχρισμάτων που περιέχουν μόνο περιφερικό αίμα. (Ευγενική παραχώρηση από Oklahoma State University.)



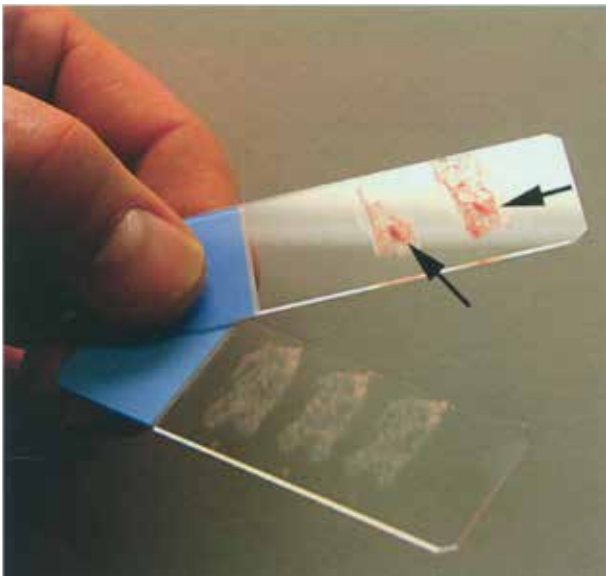
Εικόνα 1.11 Ο ιστός πιέζεται απαλά (δεν απλώνεται) αρκετές φορές πάνω στην επιφάνεια μιας καθαρής αντικειμενοφόρου πλάκας. (Ευγενική παραχώρηση από Oklahoma State University.)

και στη συνέχεια ανασηκώνεται κάθετα προς τα πάνω (Εικόνα 1.11). Αυτή η διαδικασία πρέπει να επαναληφθεί αρκετές φορές, έτσι ώστε να υπάρχουν αρκετά αποτυπώματα του ιστού πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Εάν η περισσεια του αίματος έχει απομαχθεί επαρκώς, τότε ο ιστός κολλά κατά κάποιον τρόπο πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα και φαίνεται σαν να αποκολλάται, εάν ανασηκωθεί αργά στη συνέχεια. Τα σωστά παρασκευασμένα επιχρίσματα εμφανίζουν ελαφρώς αδιαφανείς περιοχές στα σημεία των αποτυπώματων, που όμως δεν πρέπει να έχουν μεγάλη ποσότητα αίματος (Εικόνα 1.12).

Περαιτέρω επίστρωση του υλικού δεν απαιτείται. Ο ιστός δεν πρέπει να αφήνεται να γλιστρά στην επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας, καθώς αυτό προκαλεί τη ρήξη των κυττάρων. Όταν είναι δυνατόν, πρέπει να παρασκευάζονται αποτυπώματα σε πολλές αντικειμενοφόρες πλάκες, έτσι ώστε μερικές να μπορούν να αποθηκευτούν σε περίπτωση που απαιτείται να γίνουν ειδικές χρώσεις. Μετά την παραγωγή επαρκών επιχρισμάτων αποτύπωσης, ο ιστός που χρησιμοποιήθηκε θα πρέπει να τοποθετείται σε κατάλληλη ποσότητα φορμόλης, ώστε, εάν είναι απαραίτητο, να μπορεί να αποσταλεί και για ιστολογική εξέταση.

Ξέσματα

Τα ξέσματα μπορούν να γίνουν από εξωτερικές αλλοιώσεις ή ιστούς που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης ή νεκροψίας. Γενικά, τα ξέσματα οδηγούν σε πιο κυτταροβριθή επιχρίσματα απ' ό,τι τα αποτυπώματα.



Εικόνα 1.12 Επιχρίσματα που προέκυψαν από αποτυπώματα. Το επιχρίσμα στο κάτω μέρος της εικόνας έχει παρασκευαστεί σωστά και εμφανίζει αρκετές, ελαφρώς αδιαφανείς περιοχές, που αντιστοιχούν στα σημεία της αντικειμενοφόρου πλάκας με τα οποία ήρθε σε επαφή ο ιστός και υποδεικνύουν ότι πιθανώς κύτταρα από τον ιστό να έχουν μεταφερθεί πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Το επιχρίσμα στο επάνω μέρος της εικόνας έχει μεγάλη ποσότητα περιφερικού αίματος (βέλη), υποδεικνύοντας ότι ο ιστός πριν από την παρασκευή των αποτυπώματων δεν απομάχθηκε επαρκώς πάνω σε απορροφητικό υλικό. Το πιθανότερο είναι πως αυτό το επιχρίσμα περιέχει μόνο περιφερικό αίμα ή, εάν υπάρχουν κύτταρα, αυτά δεν έχουν απλωθεί επαρκώς. (Ευγενική παραχώρηση από Oklahoma State University).

Ωστόσο, όπως και για τα επιχρίσματα που παρασκευάζονται με αποτύπωση, εάν τα ξέσματα δημιουργηθούν από την επιφάνεια των εξελκωμένων δερματικών αλλοιώσεων, μπορεί να περιέχουν κυρίως στοιχεία από την επιφανειακή μόλυνση ή τη φλεγμονή. Γενικά, τα ξέσματα δεν είναι τόσο χρήσιμα για τη διάγνωση μιας νεοπλασίας όσο τα επιχρίσματα που παρασκευάζονται με τη μέθοδο της ΠΛΒ. Τα ξέσματα είναι χρήσιμα για τη συλλογή δειγμάτων από δερματικές αλλοιώσεις που είναι επίπεδες και στεγνές και, επομένως, δεν είναι κατάλληλες για ΠΛΒ ή αποτυπώματα και για δείγματα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης ή νεκροψίας (Εικόνα 1.13).¹ Δύο παραδείγματα αλλοιώσεων, στα οποία τα ξέσματα είναι χρήσιμα για τη διάγνωση, είναι το σύνδρομο των εωσινοφιλικών κοκκιωμάτων της γάτας και η δερματοφυτίαση.⁷ Τα ξέσματα λαμβάνονται, κρατώντας μια λεπίδα νυστεριού κάθετα προς την επιφάνεια της βλάβης και τραβώντας τη προς την ίδια κατεύθυνση αρκετές φορές. Κατά την απόξεση ξηρών, μη εξελκωμένων αλλοιώσεων, όπως οι αλλοιώσεις από δερματοφύτα, τα ξέσματα πρέπει να είναι αρκετά βαθιά, για να προκληθεί εξίδρωση ορού ή αίματος. Αυτό το πρωτεϊνούχο και πλούσιο σε ινική υγρό θα βοηθήσει τα συλλεχθέντα κύτταρα (και τις τρίχες, όταν αναζητούνται δερματοφύτα) να προσκολληθούν πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα και θα αποτρέψουν την έκπυσή τους κατά τη χρώση. Το υλικό που συλλέγεται στη λεπίδα μεταφέρεται στο μέσο της αντικειμενοφόρου πλάκας και απλώνεται είτε σε επίχρισμα απαλά με τη λεπίδα του νυστεριού είτε με μια από τις τεχνικές που περιγράφονται παρακάτω για την παρασκευή επιχρισμάτων μετά από αναρόφηση συμπαγών μαζών.

Στειλιοί

Γενικά, οι στειλιοί χρησιμοποιούνται, μόνο όταν δεν μπορούν να εφαρμοστούν οι άλλες μέθοδοι δειγματοληψίας, όπως όταν λαμβάνεται υλικό από τον κόλπο, τον έξω ακουστικό



Εικόνα 1.13 Πολλαπλές αλλοιώσεις σαν προεξέχουσες πλάκες στην κάτω κοιλιακή χώρα γάτας, με εωσινοφιλικά κοκκιώματα. Οι αλλοιώσεις δεν είχαν αρκετό πάχος, ώστε να ληφθεί υλικό με παρακέντηση, αλλά απέδωσαν αρκετά κύτταρα με την τεχνική του ξέσματος. Οι εξελκωμένες αλλοιώσεις είναι αυτές από τις οποίες έχει ήδη πραγματοποιηθεί η δειγματοληψία (βέλη). Τα ξέσματα μέχρι του σημείου της τριχοειδικής αιμορραγίας ή της εξίδρωσης βοηθούν στην προσκόλληση των κυττάρων πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Έτσι, αποφεύγεται η επιφανειακή επιμόλυνση και συλλέγονται κύτταρα αντιπροσωπευτικά

πόρο ή μέσα από τον αυλό συριγγίου. Η δειγματοληψία με στείλειό μέσα από τον έξω ακουστικό πόρο ή από τον αυλό συριγγίων είναι χρήσιμη κυρίως για την ανίχνευση μικρο-οργανισμών. Το υλικό λαμβάνεται από την περιουχία με τη βοήθεια αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στείλειού. Εάν η αλλοίωση είναι υγρή πριν από τη δειγματοληψία, δεν απαιτείται η εφύγρανση του στείλειού. Παρ' όλα αυτά, εάν η αλλοίωση δεν είναι πολύ υγρή, συνιστάται η εφύγρανση του στείλειού με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, καθώς αυτό βοηθά να διατηρηθούν ακέραια τα κύτταρα που μπορεί να ρηχθούν κατά τη συλλογή του δείγματος και την προετοιμασία των επιχρισμάτων. Η χρήση γλισχραντικών ουσιών (π.χ. γέλη K-Y) θα πρέπει να αποφεύγεται, καθώς μπορεί να καλύψουν το δείγμα και να παρεμποδίσουν τη χρώση των κυττάρων, καθιστώντας τελικά το επίχρισμα μη διαγνωστικό. Από τη στιγμή που το δείγμα έχει συλλεχθεί, ο στείλειός περιστρέφεται ήπια πάνω στην καθαρή επιφάνεια μιας αντικειμενοφόρου πλάκας. Είναι σημαντικό να μη σύρεται ο στείλειός κατά μήκος της πλάκας, επειδή έτσι προκαλείται συχνά ρήξη των κυττάρων (Εικόνα 1.14).

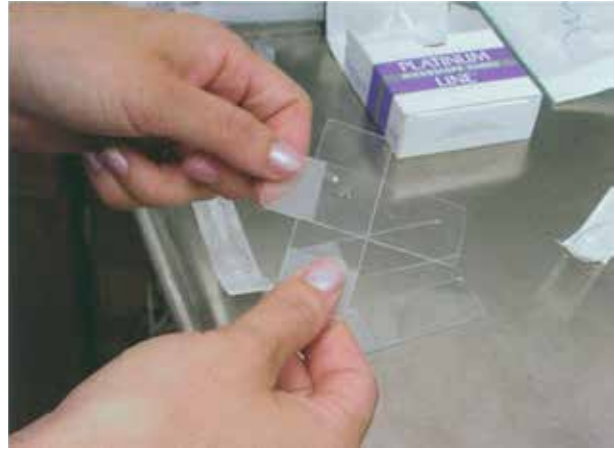
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΩΝ: ΥΛΙΚΟ ΑΠΟ ΠΑΡΑΚΕΝΤΗΣΗ ΣΥΜΠΑΓΟΥΣ ΜΑΖΑΣ

Επιχρίσματα με τοποθέτηση του υλικού μεταξύ δυο αντικειμενοφόρων πλακών (επίχρισμα σύνθλιψης)

Όταν εκτελείται σωστά, αυτή είναι η καλύτερη μέθοδος για την παρασκευή επιχρισμάτων από υλικό που συλλέχθηκε με τη μέθοδο της ΠΛΒ ή με τη μέθοδο του ξέσματος από συμπαγή μάζα. Στόχος είναι να επιστρωθεί ένα λεπτό στρώμα από το υλικό του οποίου τα κύτταρα θα έχουν απλωθεί μόνο σε ένα επίπεδο, χωρίς να έχουν ρηχθεί. Το υλικό που συλλέχθηκε με τη μέθοδο της ΠΛΒ εξωθείται κοντά στο ένα άκρο της αντικειμενοφόρου πλάκας (περίπου σε απόσταση μισής ίντσας). Μια δεύτερη αντικειμενοφόρος πλάκα (η πλάκα επίστρωσης) τοποθετείται επάνω και κάθετα από την αρχική πλάκα που περιέχει το δείγμα στην περιοχή που βρίσκεται το υλικό (Εικόνα 1.15). Το υλικό συνήθως απλώνεται ανάμεσα



Εικόνα 1.14 Παρασκευή επιχρίσματος με στείλειό από τον κόλπο σκύλου. Ο στείλειός που περιέχει το υλικό περιστρέφεται απαλά κατά μήκος της αντικειμενοφόρου πλάκας. Η ολίσθηση ή η επάλειψη του στείλειού κατά μήκος της αντικειμενοφόρου πλάκας οδηγεί σε εκτεταμένη ρήξη των κυττάρων. (Ευγενική παραχώρηση από Oklahoma State University.)

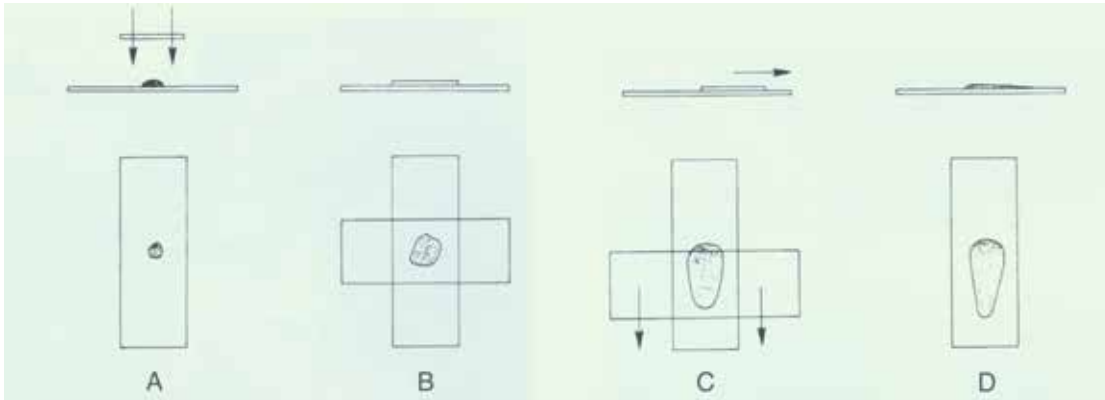


Εικόνα 1.15 Επίχρισμα σύνθλιψης. Αμέσως μόλις το υλικό τοποθετηθεί πάνω στην καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα, τοποθετείται επάνω του μια δεύτερη πλάκα και χρησιμοποιείται για την εξάπλωσή του. Είναι σημαντικό κατά την παρασκευή του επιχρίσματος να μην ασκείται πίεση προς τα κάτω στην αντικειμενοφόρο πλάκα που τοποθετήθηκε πάνω από το υλικό. (Ευγενική παραχώρηση από Oklahoma State University.)

στις δύο αντικειμενοφόρες πλάκες υπό την πίεση και μόνο του βάρους της πλάκας επίστρωσης. Εάν το δείγμα είναι παχύ ή έχει κοκκιώδη υφή και δεν απλώνεται καλά, μπορεί να ασκηθεί στιγμιαία ήπια πίεση στην πλάκα επίστρωσης και στη συνέχεια αυτή να απελευθερωθεί. Η πλάκα επίστρωσης σύρεται απαλά κατά μήκος της πρώτης αντικειμενοφόρου μέγρου της, ώστε να απλωθεί το δείγμα (Εικόνα 1.16). Παρά το ότι ονομάζεται επίχρισμα σύνθλιψης, είναι σημαντικό κατά τη διαδικασία της επίστρωσης να μην ασκείται πίεση προς τα κάτω στην πλάκα επίστρωσης, καθώς αυτό συνήθως προκαλεί τη ρήξη των κυττάρων.

Εάν η τεχνική έχει εκτελεστεί σωστά, το επίχρισμα θα πρέπει να έχει σχήμα φλόγας, που όμως δεν εκτείνεται μέχρι το άκρο της αντικειμενοφόρου πλάκας. Αυτό είναι σημαντικό, επειδή, όπως και στο επίχρισμα αίματος, συχνά μόνο στο άκρο του επιχρίσματος τα κύτταρα έχουν διασκορπιστεί αρκετά αραιά, ώστε να μπορούν να εκτιμηθούν. Τα επιχρίσματα που εκτείνονται μέχρι το άκρο της αντικειμενοφόρου πλάκας έχουν συνήθως αρκετό πάχος, ώστε να μπορούν να εκτιμηθούν. Επίσης, αρκετές συσκευές αυτόματης βαφής επιχρισμάτων δεν βάφουν όλη την επιφάνεια μιας αντικειμενοφόρου πλάκας, αλλά αφήνουν άβαφες περιοχές μήκους ενός τετάρτου με μισή ίντσα σε κάθε μία από τις στενές πλευρές της. Έτσι, τα κύτταρα που βρίσκονται σε αυτές τις περιοχές δεν βάφονται και δεν μπορούν να εκτιμηθούν. Ακόμα και όταν χρησιμοποιούνται μέθοδοι χρώσης με εμφύσηση, που οδηγούν στη χρώση ολόκληρου του επιχρίσματος, το υλικό που βρίσκεται στα άκρα του επιχρίσματος μπορεί να είναι αδύνατο να εξεταστεί σε κάποια μικροσκόπια.

Όταν, λοιπόν, εκτελείται σωστά αυτή η τεχνική, οδηγεί σε καλή εξάπλωση των κυττάρων, ακόμα και αυτών που βρίσκονται σε ομάδες, ώστε να μπορούν να εκτιμηθούν σε ικανοποιητικό βαθμό τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου, ιδίως στα χέρια μη έμπειρων παρασκευαστών, είναι η πρόκληση εκτεταμένης ρήξης των κυττάρων. Τα κύτταρα του λεμφοειδούς ιστού είναι ιδιαίτερα εύθραυστα και συχνά ρήγνυνται, ακόμα και



Εικόνα 1.16 Επίχρισμα σύνθλιψης. (Α) Ένα μέρος του υλικού εξωθείται πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα και μια δεύτερη πλάκα τοποθετείται πάνω από το υλικό. (Β) Αυτό οδηγεί στην εξάπλωση του υλικού. Εάν το υλικό δεν εξαπλωθεί επαρκώς, μπορεί να ασκηθεί με τα δάκτυλα ελαφρά πίεση στην αντικειμενοφόρο πλάκα, που χρησιμοποιείται για την επίστρωση. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα, ώστε να μην ασκείται υπερβολική πίεση στην αντικειμενοφόρο πλάκα, καθώς αυτό ενδέχεται να οδηγήσει σε ρήξη των κυττάρων. (Γ) Οι αντικειμενοφόροι πλάκες εξωθούνται να γλιστρήσουν η μία πάνω στην άλλη απαλά. (Δ) Αυτή η τεχνική οδηγεί συνήθως σε καλά επιχρίσματα, αλλά μπορεί να προκαλέσει τη ρήξη πολλών κυττάρων.

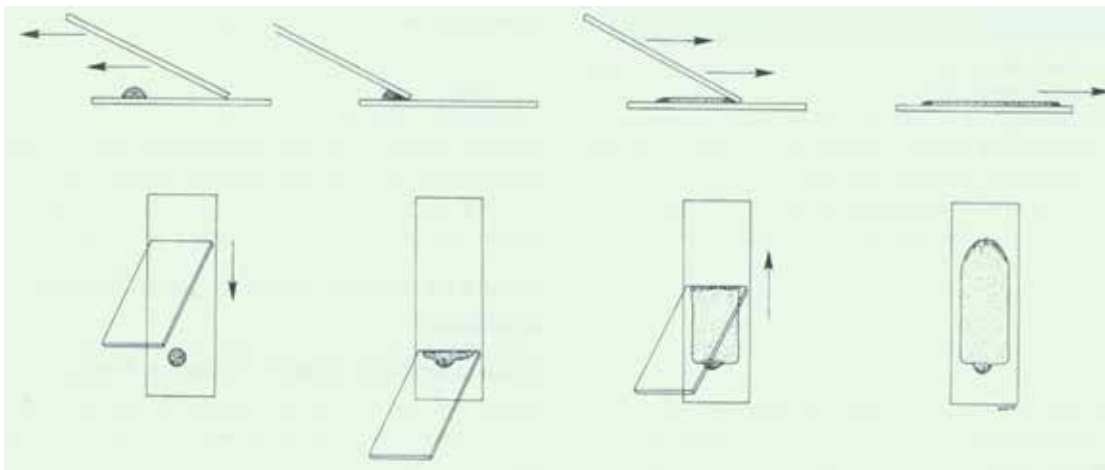
αν η πίεση που ασκείται στο υλικό κατά την παρασκευή των επιχρισμάτων με αυτήν τη μέθοδο είναι ελάχιστη.

Η τεχνική της παρασκευής επιχρίσματος αίματος

Σε πολλά δείγματα και κυρίως σε αυτά που προέρχονται από παρακέντηση λεμφαδένων, το υλικό που εξωθείται από τη σύριγγα πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα περιέχει αρκετό υγρό από τον ιστό, αίμα ή και τα δύο, ώστε το δείγμα να μπορεί να επιστρωθεί, σαν να πρόκειται για επίχρισμα αίματος (Εικόνα 1.17).¹ Με αυτήν την τεχνική, η ρήξη κυττάρων, ιδιαίτερα εκείνων που είναι εύθραυστα, είναι περιορισμένη και γενικά οδηγεί στην παρασκευή λεπτών επιχρισμάτων με ακέραια κύτταρα, που έχουν απλωθεί καλά.

Όπως και στην τεχνική της σύνθλιψης, το δείγμα εξωθείται από τη σύριγγα κοντά στο ένα άκρο της αντικειμε-

νοφόρου πλάκας. Η στενή πλευρά της πλάκας επίστρωσης τοποθετείται πάνω στην επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας, στην οποία θα δημιουργηθεί το επίχρισμα, στο ύψος ακριβώς μπροστά από το υλικό. Στην αντικειμενοφόρο που χρησιμοποιείται για την επίστρωση δίνεται κλίση 45 μοιρών σε σχέση με εκείνη όπου βρίσκεται το υλικό και στη συνέχεια η πρώτη έλκεται προς τα πίσω μέχρι το ένα τρίτο του υλικού. Στη συνέχεια, η πλάκα επίστρωσης προωθείται απαλά και γρήγορα προς τα εμπρός, όπως κατά την παρασκευή ενός επιχρίσματος αίματος. Το επίχρισμα θα πρέπει να πάρει σχήμα φτερού που το άκρο του να σταματά τουλάχιστον μισή ίντσα πριν από το άκρο της αντικειμενοφόρου πλάκας. Εάν το επίχρισμα εκτείνεται μέχρι το άκρο της πλάκας θα πρέπει να παρασκευαστούν και άλλα επιχρίσματα, αφού πρώτα τοποθετηθεί μικρότερη ποσότητα υλικού στην αντικειμενοφόρο πλάκα.



Εικόνα 1.17 Η τεχνική του επιχρίσματος αίματος. (Α) Μια σταγόνα υγρού τοποθετείται πάνω σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα κοντά στο ένα άκρο της, στη συνέχεια μια δεύτερη αντικειμενοφόρος πλάκα ολισθαίνει προς τα πίσω, μέχρι να συναντήσει τη σταγόνα του υγρού. (Β) Όταν η σταγόνα έρθει σε επαφή με την ακμή της αντικειμενοφόρου πλάκας, εξαπλώνεται σε όλη την έκτασή της. (Γ και Δ) Στη συνέχεια η αντικειμενοφόρος πλάκα επίστρωσης σύρεται απαλά με μια συνεχόμενη κίνηση προς το αντίθετο άκρο της κάτω αντικειμενοφόρου πλάκας, οδηγώντας στον σχηματισμό ενός επιχρίσματος σε σχήμα φτερού.