

***TECNICHE DI LABORATORIO BIOMEDICO***  
***II ANNO I SEMESTRE***

**Corso integrato di Metodologie diagnostiche in anatomia patologica**

Citopatologia

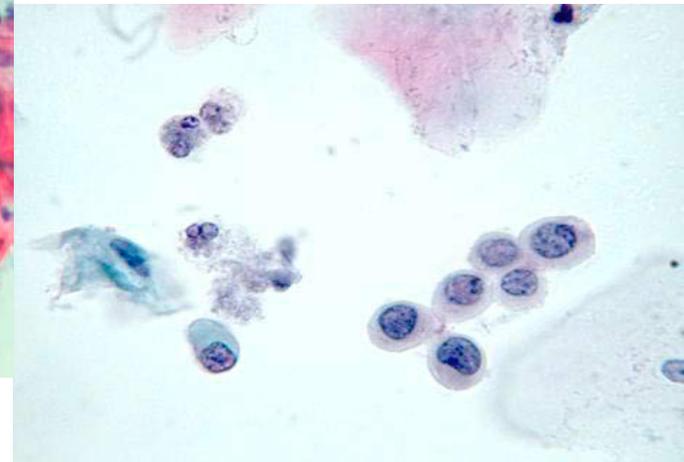
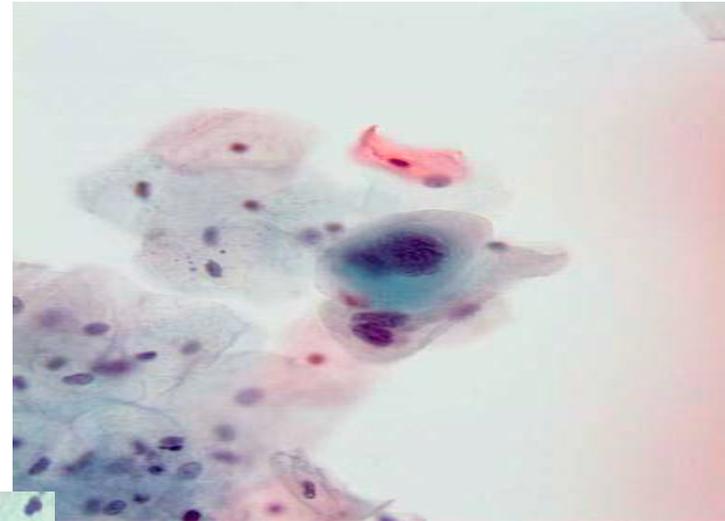
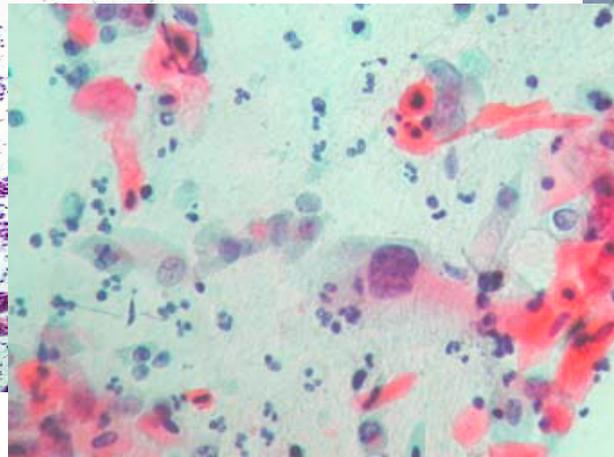
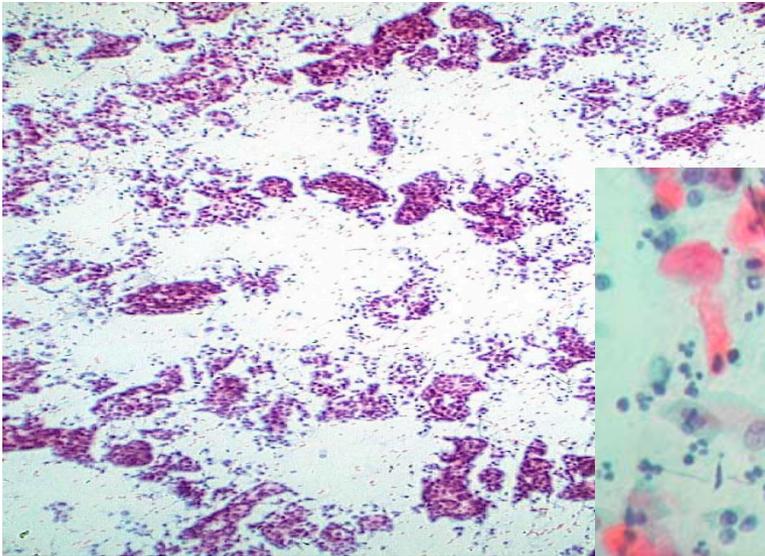
Tecniche di anatomia patologica

**LEZIONE 4 novembre 2019 – Argomenti trattati**

1. Tecniche di citologia

## Campione citologico

- Persa “la geografia spaziale” dell’organo / tessuto, i criteri diagnostici si basano quasi esclusivamente sulle caratteristiche delle cellule.
  - Caratteristiche morfologiche dei nuclei e dei citoplasmi •
    - forma
    - colore
    - dimensione
  - Pattern di aggregazione



# Citologia esfoliativa

**E' il tipo di citologia più immediata e di facile applicabilità per la semplicità di raccolta del materiale.**

- Cellule esfoliate spontaneamente

- L'esfoliazione delle cellule è un processo che avviene in continuazione correlato al rinnovamento dei tessuti del corpo.

- La percentuale di cellule esfoliate varia a secondo dei tessuti, loro funzioni e metabolismo.

- In parte esfoliano fisiologicamente, in parte in condizioni patologiche.

Molte di queste si accumulano nelle cavità naturali

# Citologia esfoliativa

Cellule esfoliate spontaneamente si ritrovano in:

- Urine
- Espettorato
- Secrezioni
- Versamenti (pleurico, cardiaco, ascitico, sinoviale)
- Liquor (liquido cerebrospinale)

## Citologia per esfoliazione provocata

- citologia spesso legata all'uso di apparecchiature endoscopiche flessibili a fibre ottiche
- a questo prelievo citologico frequentemente si associa una biopsia simultanea o un prelievo con ago sottile
- Cellule attivamente asportate dalla superficie di una mucosa o di una lesione

# Citologia per esfoliazione provocata

## Spazzolato o brushing

Metodica possibile in organi cavi o accessibili dall'esterno quali tubo digerente, trachea e bronchi, cervice uterina e vagina, utero

## Lavaggio o washing

Metodica necessaria per:

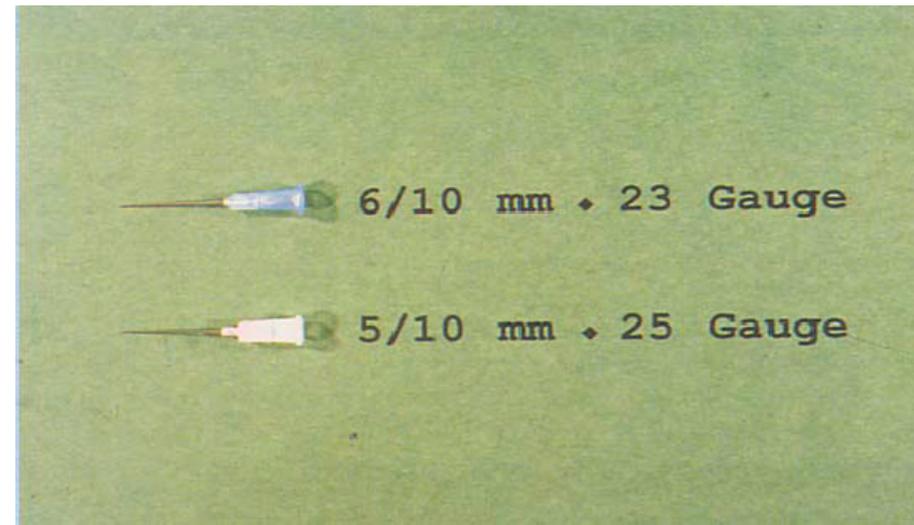
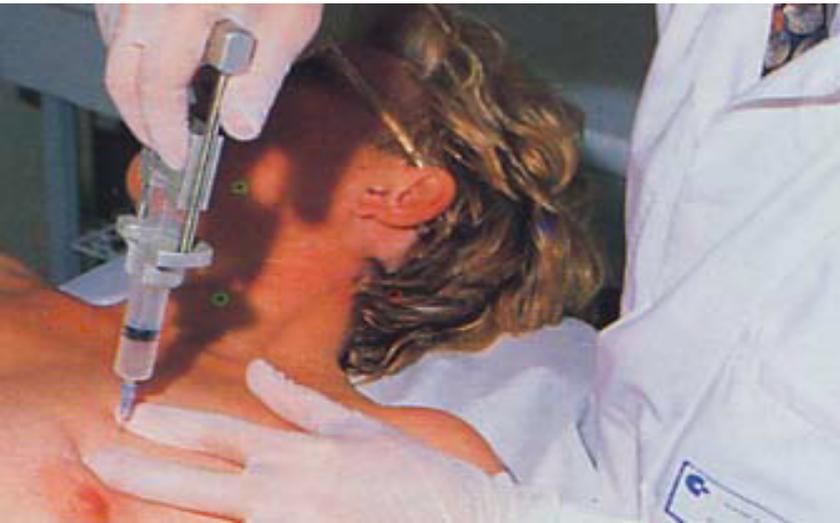
- impossibilità di brushing di lesioni periferiche distali dal punto di arresto dell'endoscopio
- campionare un'area vasta ma periferica, ramo bronchiale spazi bronchiolo-alveolari

## Scraping

lesioni cutanee

## Citologia per aspirazione con ago sottile

- Cellule asportate mediante prelievo con ago sottile
  - a differenza delle precedenti metodologie, presuppone un bersaglio
  - la diagnosi ottenuta con FNC può avere significato conclusivo anche ai fini erapeutici
- La punzione può essere effettuata su organi o lesioni superficiali e profonde
- Per le sedi profonde viene eseguita sotto monitoraggio radiologico (TAC o eco-guidata)



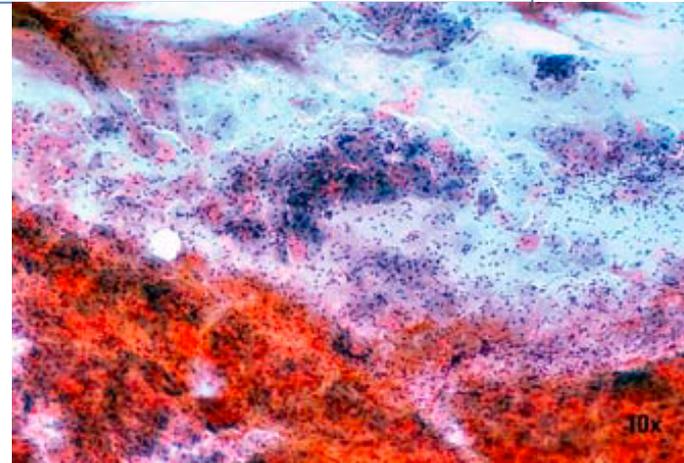
## Citologia per aspirazione con ago sottile

- Alcune sedi di prelievo più frequenti
  - Mammella
  - Tiroide
  - Linfonodi
  - Ghiandole salivari
  - Noduli sottocutanei
  - Fegato
  - Polmone
  - Pancreas
  - Reni

# Citologia esfoliativa ginecologica

## Pap Test

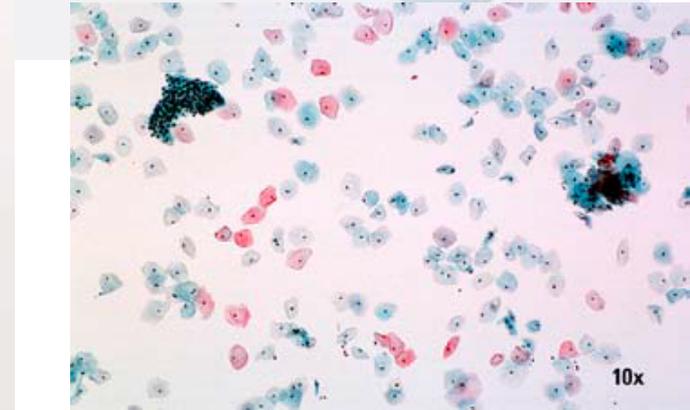
- La cervice uterina è la sede d'elezione per effettuare citologia esfoliativa per l'identificazione del carcinoma del collo dell'utero
  - a scopo diagnostico in pazienti sintomatiche
  - a scopo di screening in pazienti asintomatiche
- Il materiale ottenuto con prelievo cervico-vaginale puo' essere allestito per striscio direttamente sul vetrino portaoggetto (striscio convenzionale)



## Citologia in fase liquida

Materiale raccolto ed analizzato in fase liquida

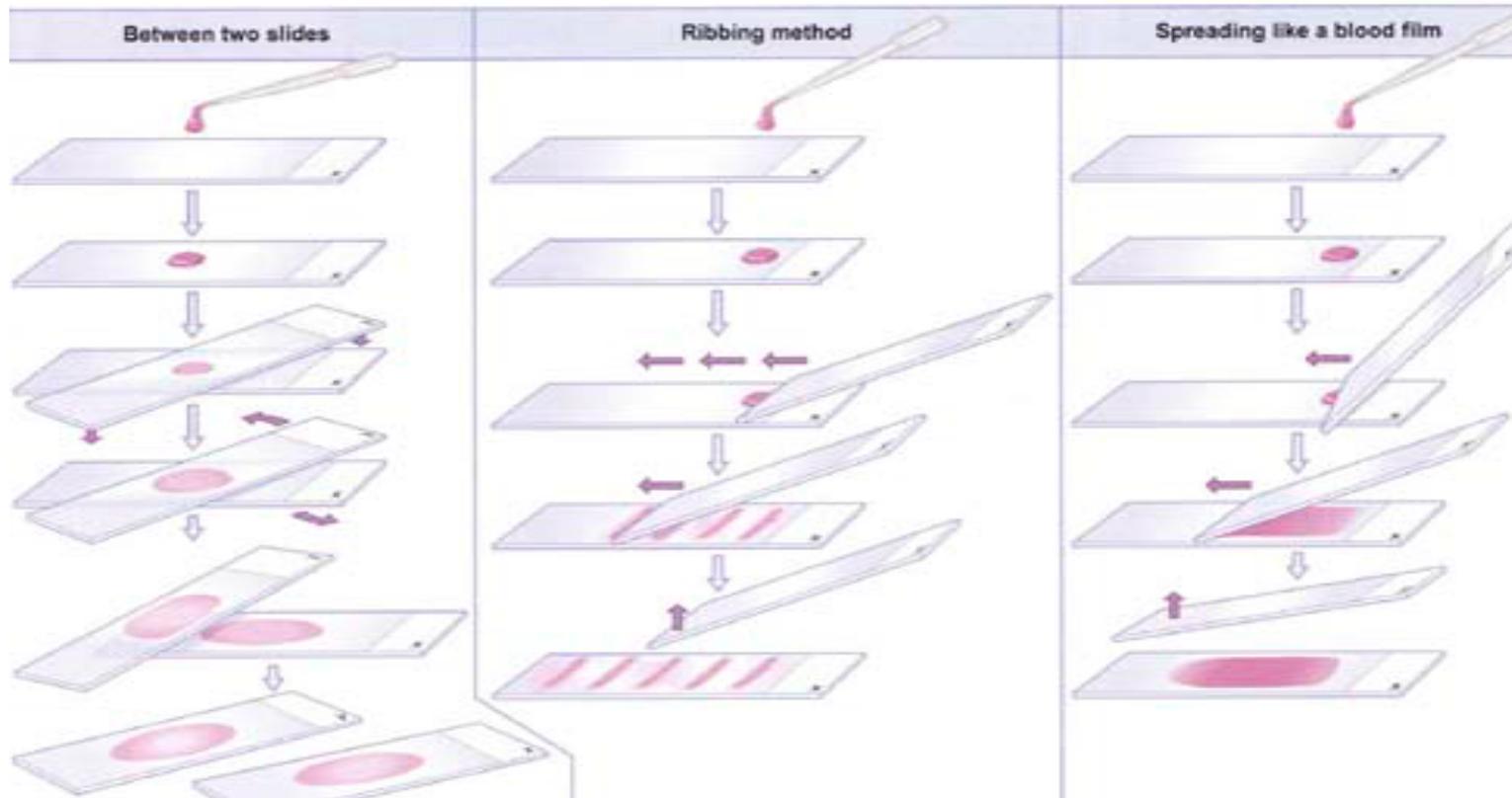
- Tecnica per aumentare la sensibilità della metodologia - pap- test
- Allestimento in strato sottile
- Residua materiale per indagini supplementari



## Allestimento dei campioni

Il materiale ottenuto con le diverse tecniche di prelievo può essere strisciato direttamente sui vetrini portaoggetto

- Agoaspirato
- Spazzolato
- Espettorato
- Pap-test



**CITOLOGIA ESFOLIATIVA**

**CITOLOGIA AGOASPIRATIVA**

**FASI**

**CAMPIONAMENTO**

**ALLESTIMENTO**

**VALUTAZIONE**

# CITOLOGIA ESFOLIATIVA

Studio delle cellule che si staccano dagli epitelii di rivestimento e si ritrovano libere nel lume o nelle cavità d'organo.

**Diretta**  
Raccolta di cellule esfoliate spontaneamente

- Espettorato
- Urine
- Liquido pleurico
- Liquido peritoneale
- Liquido cefalo-rachidiano

**Indiretta**  
Il distacco delle cellule è favorito da uno strumento

- Abrasione = scraping
- Spazzolamento = brushing
- Lavaggio = washing
- Apposizione = imprinting

# ***ESAME URINE***

***INDAGINE FISICO- CHIMICA (pH, soluti ecc)***

***STUDIO MICROBIOLOGICO***

***INDAGINE MICROSCOPICA o CITOLOGICA***

## ESAME MICROSCOPICO (es. citologico+es.del sedimento)

È essenziale che la citologia urinaria venga effettuata con urina fresca.

Non idonea quella della prima minzione mattutina poiché le cellule degenerano rapidamente (condizioni di elevata stasi notturna).

La seconda minzione è l'ideale e si raccoglie un campione al giorno per **almeno 3 giorni consecutivi.**



**1**



**2**



**3**

SI OTTIENE UN SEDIMENTO

o PELLETTA

# *citologia esfoliativa da urine e versamenti*

## SEDIMENTO



**7-10'**



**Sedimento o pellet**

A questo punto ci sono 3 possibilità:

**IL SEDIMENTO PUO ESSERE STRISCIATO SU VETRINO**

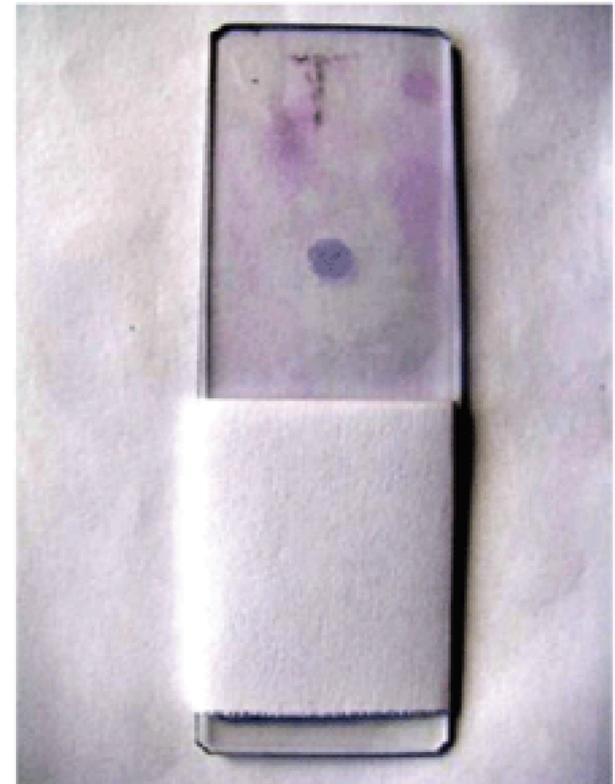
**OPPURE**

**IL SEDIMENTO PUO' ESSERE RISOSPESO IN UN BUFFER  
E SI PUO' EFFETTUARE UN CITOCENTRIFUGATO o  
CITOSPIN**

**OPPURE**

**IL SEDIMENTO PUO' ESSERE RISOSPESO IN PRESERVCYT  
PER FARE UNA PREPARAZIONE SU STRATO SOTTILE**

# CITOCENTRIFUGAZIONE O CITOSPIN



**Figure** - Slide with BAL fluid sample after cyto-centrifugation (macroscopic aspect). The purple circle corresponds to the site where the cells are fixed.

# CITOLOGIA CERVICO-VAGINALE

- Sistema messo a punto per la prima volta nel 1943 da Papanicolaou
- Si basa sul concetto che la maggioranza delle neoplasie cervicali sono precedute da alterazioni “precancerose”

## POSSIBILI QUADRI DIAGNOSTICI

- 1) Processi infiammatori
- 2) Processi metaplastici e displastici
- 3) Processi neoplastici

# La colorazione di Papanicolau

E' una colorazione **tricromica** che consente nel caso della citologia cervico-vaginale di apprezzare la fase di maturazione delle cellule

Il colorante **nucleare** è l'ematossilina

I due coloranti **citoplasmatici** sono l'Orange G e l'EA

L'Orange G colora la cheratina dall'arancio brillante al giallo

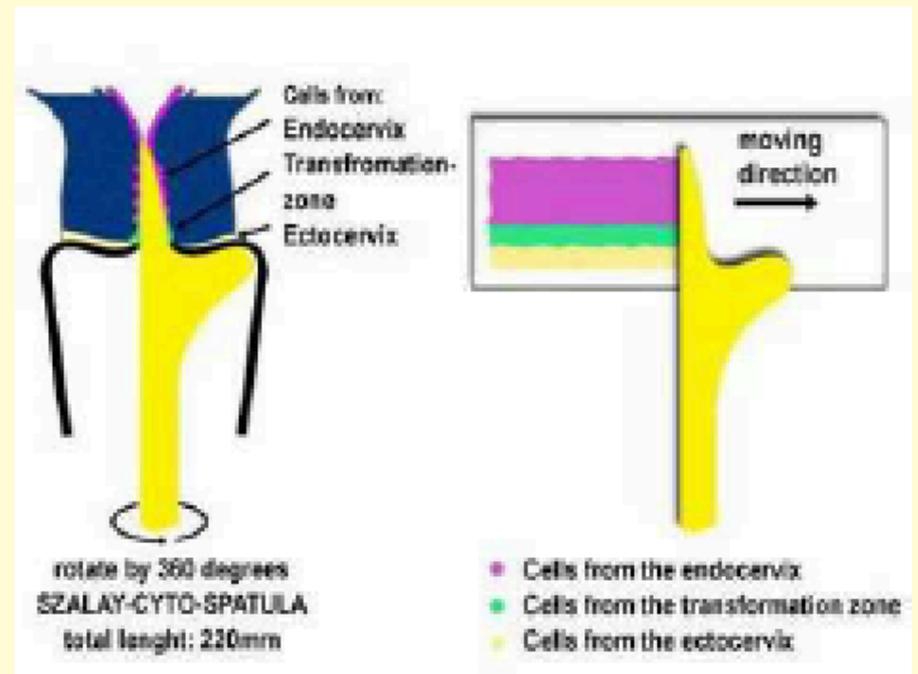
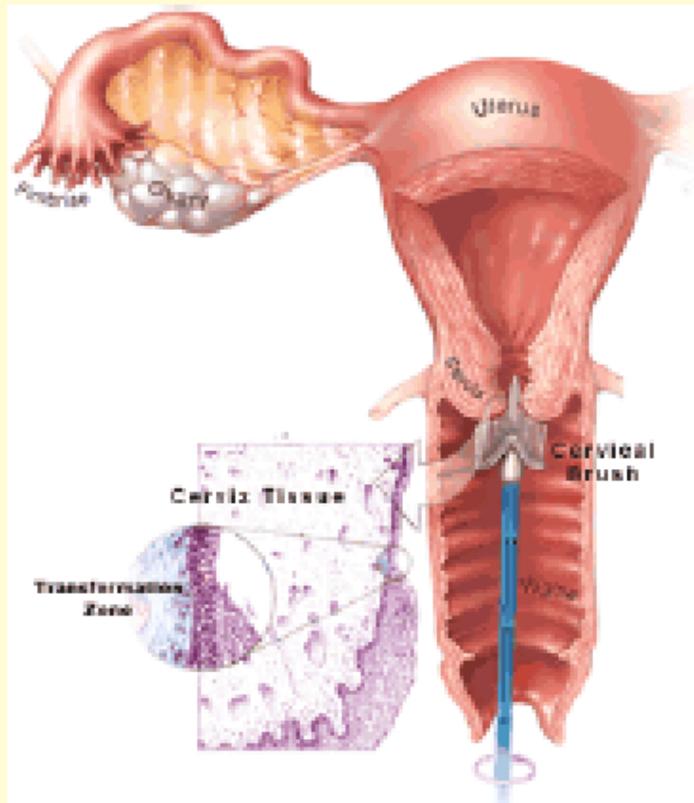
L'EA è una miscela policroma di Eosina e Verde Luce, nella **cervice uterina** l'Eosina colora il citoplasma delle cellule pavimentose mature superficiali di rosa che vengono dette eosinofile, il Verde Luce colora il citoplasma delle cellule più immature quali le intermedie parabasali o basali di verde-celeste, che perciò vengono dette "cianofile"

**DOPO IL PRELIEVO DELLE CELLULE; IN GENERE CON LA SPATOLA DI EY**

**ABBIAMO 2 POSSIBILITA'**

**STRISCIO**

**PREPARAZIONE IN STRATO SOTTILE  
(THIN PREP)**



**Si adopera un strumento, in genere la spatola di Eyre che consente di ottenere le cellule endocervicali**

**E' necessario ottenere le cellule endocervicali**

**Se queste sono assenti è corretto segnalarlo nel referto perché il ginecologo possa decidere sulla base dei dati del paziente già in suo possesso se ripetere il prelievo o accettare quel referto fino al prossimo esame citologico**

# Allestimento dei campioni

- Citocentrifugato per essere arricchito e successivamente strisciato
  - è il metodo più semplice per arricchire i campioni liquidi
- 
- • urine
  - • liquidi di lavaggio
  - • versamenti
- 
- – La cellularità presente consente di ottenere, dopo centrifugazione, un sedimento visibile nella provetta.

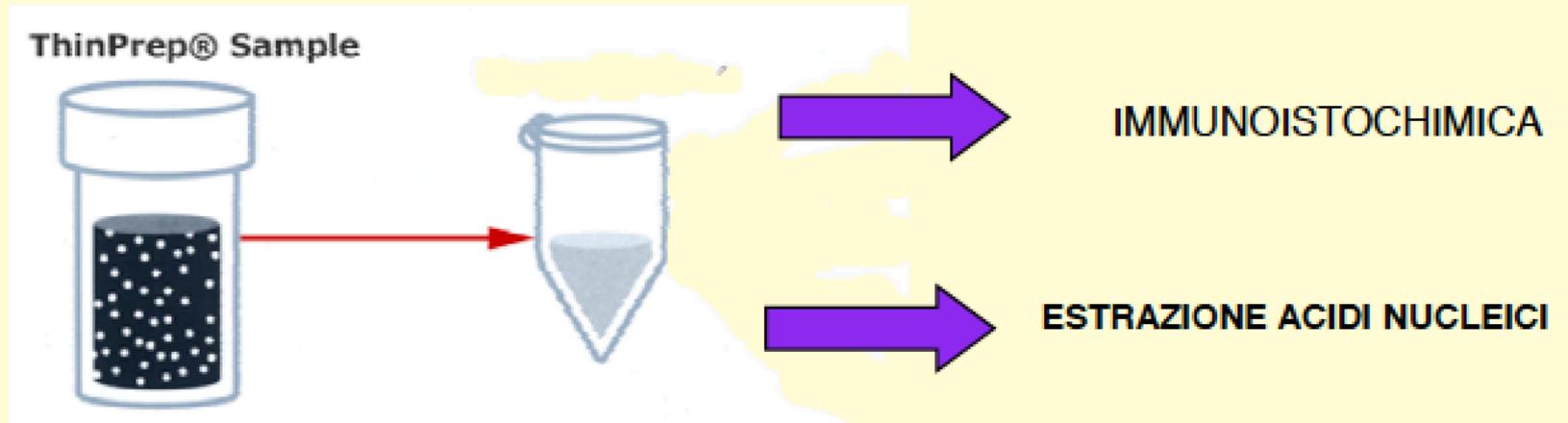
STRATO SOTTILE: le cellule si fissano in Preservcyt

**2003**



**Il Preservcyt è un fissativo a base di metanolo che consente di conservare le cellule a temperatura ambiente per anni e con le cellule dello stesso campione si possono effettuare diversi test in aggiunta alla preparazione del vetrino citologico**

# ONE SAMPLE – MULTIPLE ASSAYS



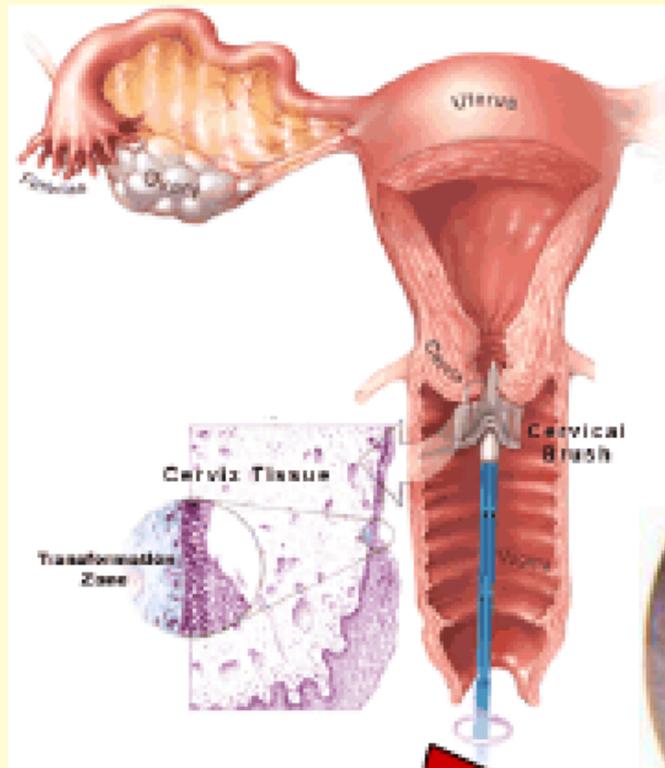
**La preparazione di vetrini con cellule “in strato sottile ”**

**ha anche il grande vantaggio che le cellule si vedono bene**

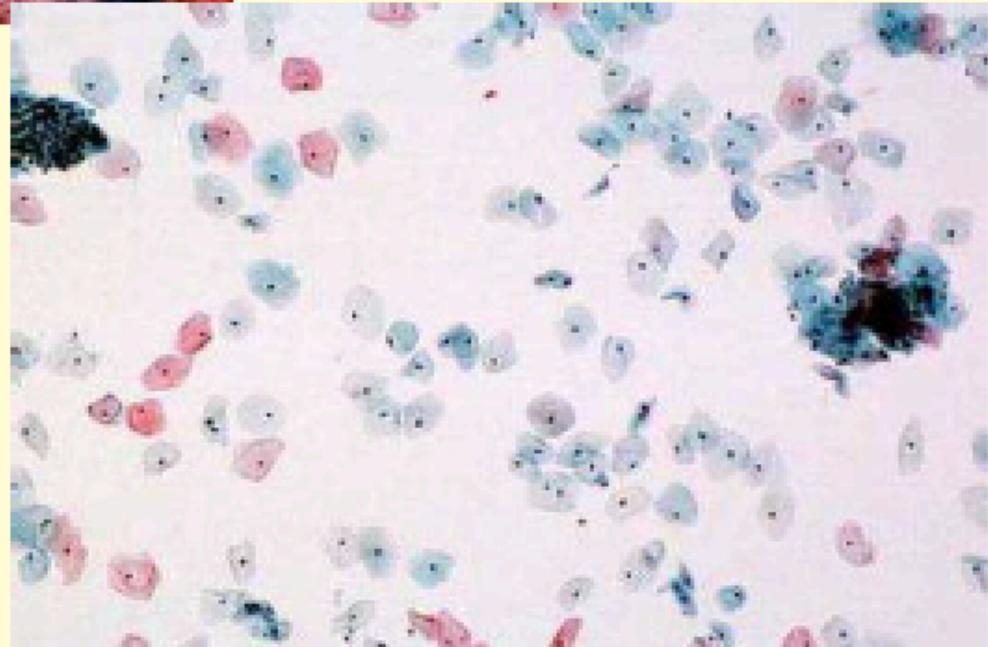
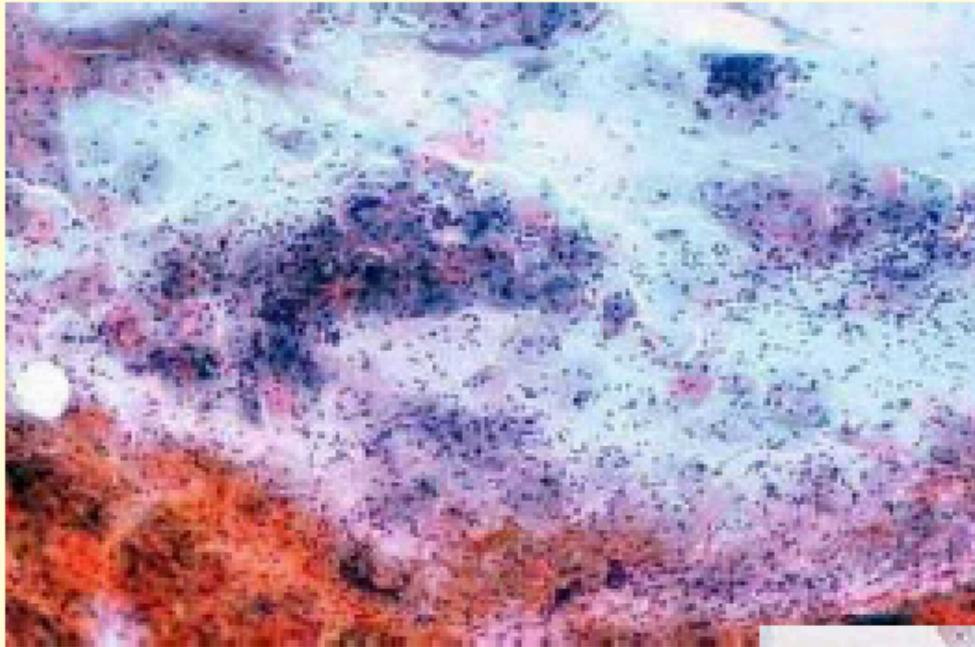
**singolarmente, cioè senza sovrapposizioni**

**e vi è poco sangue e muco**

# ***STRATO SOTTILE***







## Allestimento dei campioni

### Materiale in fase liquida: allestimento in strato sottile

E' un metodo di allestimento automatico dei preparati

Le cellule sospese nel fissativo vengono depositate automaticamente dallo strumento in un singolo strato di spessore uniforme, su un'area limitata del vetrino.

1. Dispersione omogenea delle cellule
2. Raccolta delle cellule
3. Trasferimento delle cellule sul vetrino

## Allestimento dei campioni

- Citoincluso - cell block
  - Sedimento
  - Microfrustoli di materiale prelevato mediante agoaspirazione

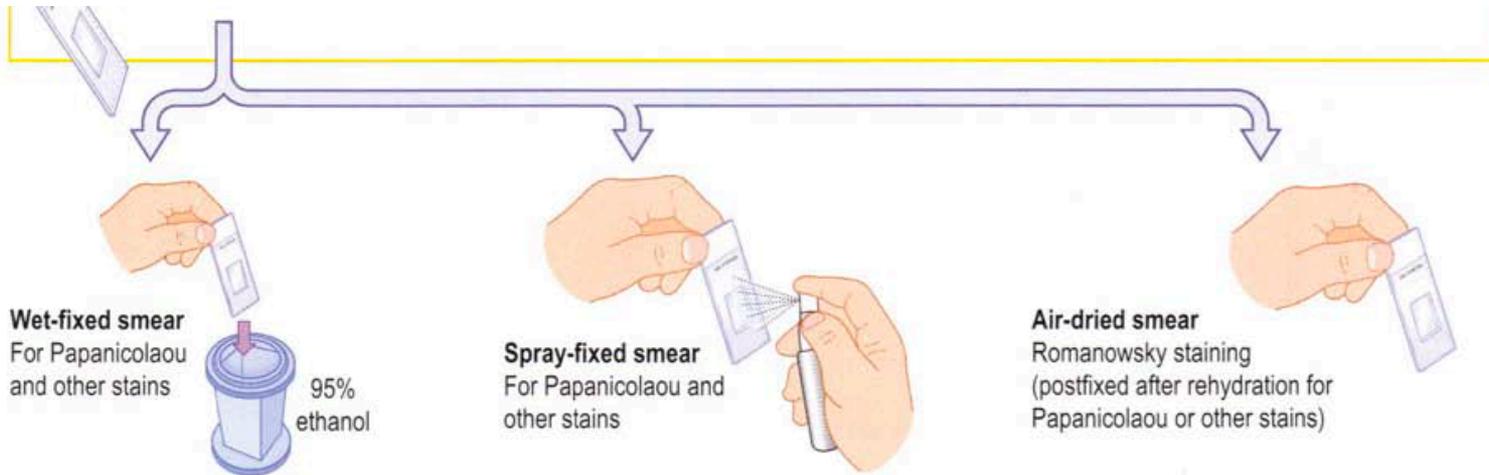
Il materiale fissato con formalina e alloggiato in biocassette viene processato e allestito con tecniche istologiche

## Fissazione

- Tappa fondamentale per avere dei campioni citologici ottimali è l'immediata fissazione dei campioni stessi ancora umidi.

# Fissazione

- Tappa fondamentale per avere dei campioni citologici ottimali è l'immediata fissazione dei campioni stessi ancora umidi.



# Fissazione

- I fissativi di più largo uso sono a base di alcool etilico
  - sono disponibili sotto forma di aerosol, spray o liquida
  
- per fissare strisci e citocentrifugati
  - alcool etilico 95°
  - fissativi spray in commercio
  
- per la conservazione dei liquidi biologici
  - alcool etilico 70°
  - alcool etilico 50°

## Fissazione

- Una cattiva fissazione induce delle trasformazioni cellulari, quali rigonfiamento nucleare e degenerazione citoplasmatica, che influenzano l'interpretazione del preparato e la valutazione diagnostica.

## Colorazione

A parte l'evenienza rara dell'esame a fresco, la visualizzazione delle cellule avviene solitamente mediante colorazioni panottiche tra le quali sono di largo impiego:

- Il metodo di Papanicolaou, d'elezione per il pap test
  - colorazione nucleare
- ematossilina
  - colorazione citoplasmatica

# COLORAZIONE

- Il metodo secondo **MayGrünwald-Giemsa** impiega eosina e il blu di metilene per il MayGrünwald  
l'azzurro II di metilene e l'eosina per il Giemsa

Richiede vetrini essiccati all'aria (fissazione a secco)

Mette in evidenza il dettaglio nucleare e il materiale extracellulare

- La colorazione E/E è il metodo d'elezione per il materiale citoincluso

Visualizza tutti i principali componenti di un tessuto biologico

colorazione nucleare

- ematossilina

colorazione citoplasmatica

- eosina

# COLORAZIONI COMPLEMENTARI

- L'immunocitochimica è una particolare colorazione che consente di evidenziare morfologicamente la localizzazione di uno o più antigeni mediante l'uso di appropriati anticorpi
    - discriminare l'istotipo cellulare
    - cellule epiteliali/mesoteliali nei versamenti
    - tipizzare le neoplasie
    - identificare agenti patogeni
- CMV  
aspergillo

- Colorazione di Ziehl Neelsen per la ricerca di micobatteri
- Colorazione di Gram per la ricerca dei batteri gram +
- Colorazione di Grocott per la ricerca di funghi

# INDAGINI SUPPLEMENTARI

Test in uso sui campioni di citologia ginecologica in fase liquida

- **Hybrid CaptureII** per la ricerca del virus HPV

Ibridazione in fase liquida con pool di sonde a RNA per la rilevazione di HPV a basso e alto rischio

- cattura su pozzetto
- rivelazione chemiluminescente con amplificazione del segnale

Test in uso sui campioni di citologia ginecologica in fase liquida

- **Cobas Amplicor** per la ricerca di Chlamydia T. e Neisseria G.

Test qualitativo in vitro per la rilevazione del DNA, utilizza la tecnica di amplificazione PCR (reazione polimerasica a catena)

# Applicazioni della citodiagnostica

- Negli screening di popolazioni

Utilizzata come test per l'identificazione di lesioni pre-neoplastiche o neoplastiche in una popolazione apparentemente non affetta ma a rischio per una determinata malattia

Esempi:

- Screening del carcinoma della cervice uterina Pap-test
- Screening del carcinoma polmonare Esame citologico dell'espettorato
- Screening del carcinoma delle vie urinarie Esame citologico delle urine

## Applicazioni della citodiagnostica

- Nel primo inquadramento di condizioni patologiche accertate ma di natura ancora da determinare

Utilizzata come test per la discriminazione tra “patologie neoplastiche /patologie non neoplastiche” in pazienti con manifestazioni patologiche aspecifiche ( versamenti nelle cavità sierose o comparsa di sintomatologie neurologiche in assenza di patologie preesistenti note in grado di motivarli ).

Esempi:

- Esame citologico dei liquidi di versamento delle cavità sierose
- Esame citologico del liquido cefalo-rachidiano (liquor)

# Applicazioni della citodiagnostica

- Nel primo inquadramento di condizioni patologiche accertate ma di natura ancora da determinare

Versamento pleurico

Strutture papillari in pazienti senza storia  
anamnestica significativa

# Applicazioni della citodiagnostica

- Nella diagnostica di secondo livello

Utilizzata come test per la definizione diagnostica di lesioni già riconosciute clinicamente o a mezzo di “diagnostica per immagini”

(RMN –TAC –RX –Ecografia).

Molto spesso dal suo esito dipende il tipo di trattamento medico o chirurgico che sarà applicato al paziente.

Esempi:

- Citologia da agoaspirazione con ago sottile ( FNA )
- Esame citologico del lavaggio bronchiolo-alveolare (BAL)

## Applicazioni della citodiagnostica

- Nel follow-up di malattia

Utilizzata come indagine per il monitoraggio di pazienti affetti da una specifica patologia (analisi dell'evoluzione, post-trattamento o spontanea, della malattia)

Esempi:

- Esame citologico di brushing di organi cavi (pap-test, bronchi, intestino)
- Esame citologico di versamenti sierosi
- Citologia da agoaspirazione con ago sottile ( FNA )

## Citodiagnostica: vantaggi

- Rapida esecuzione
- Impegno limitato di personale e strutture

## COSTI CONTENUTI

- Prelievi senza anestesia
- Prelievi facilmente ripetibili in caso di insuccesso
- Metodica poco “fastidiosa” per il paziente

## ALTO LIVELLO DI GRADIMENTO DEL PAZIENTE

- Elevata sensibilità e specificità in mani esperte
- Minime complicanze

## ALTO LIVELLO DI GRADIMENTO DEGLI OPERATORI