Corso integrato di Metodologie diagnostiche in anatomia patologica

Citopatologia

LEZIONE

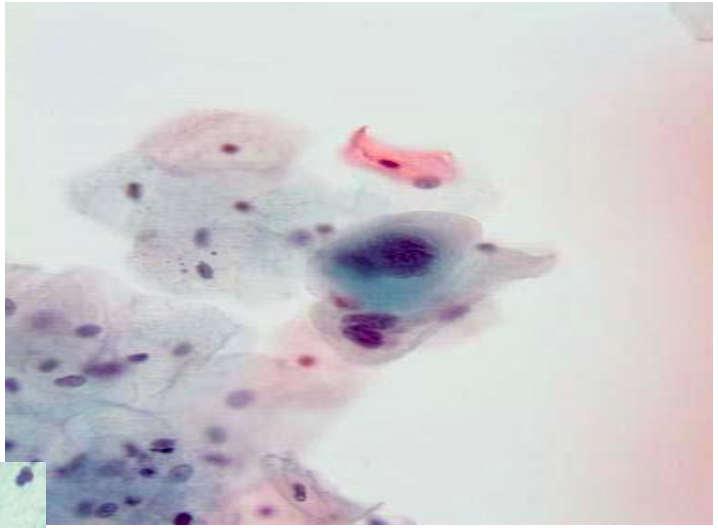
1. Tecniche di citologia

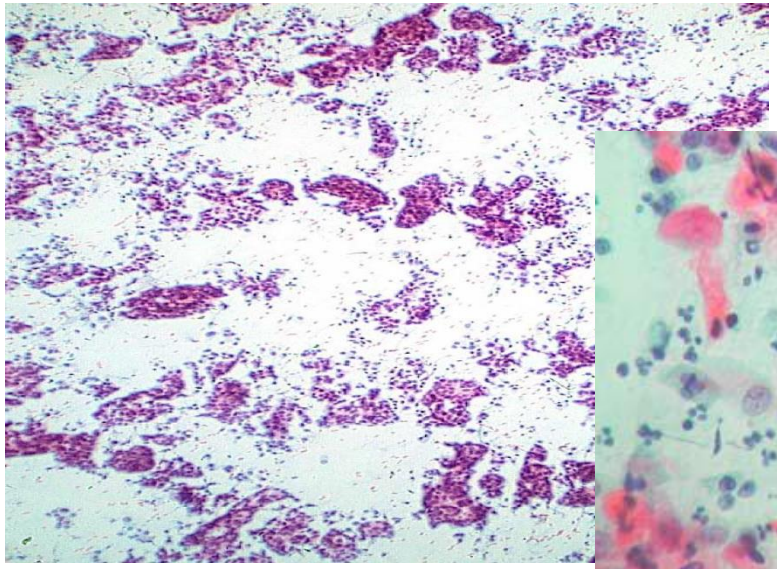
Campione citologico

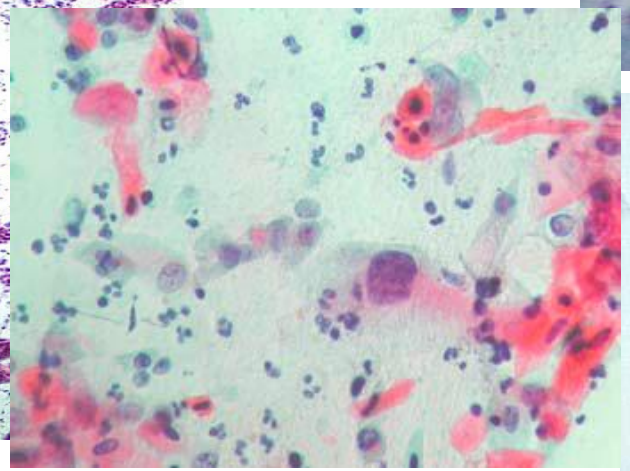
• Persa “la geografia spaziale”dell’organo / tessuto, i criteri diagnostici si basano quasi esclusivamente sulle caratteristiche delle cellule

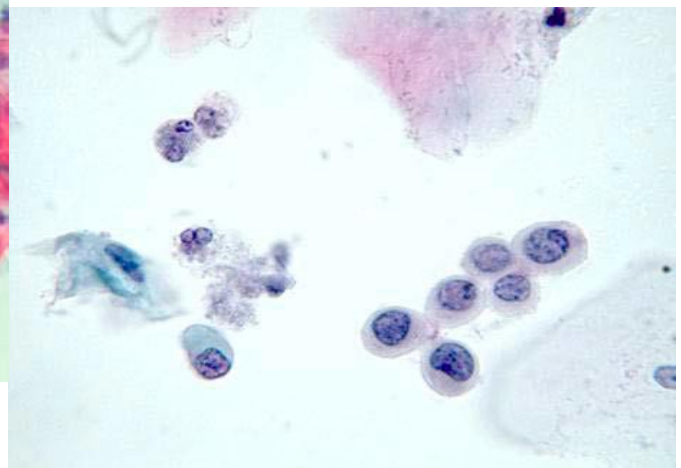
– **Caratteristiche morfologiche dei nuclei e dei citoplasmi**
• forma
• colore
• dimensione

– **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 spontanea

Cellule esfoliate spontaneamente si ritrovano in:

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

Citologia per esfoliazione provocata

Cellule attivamente asportate dalla superficie di una mucosa o di una lesione

– citologia spesso legata all'uso di apparecchiature endoscopiche flessibili a fibre ottiche

– a questo prelievo citologico frequentemente si associa un prelievo con ago sottile

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

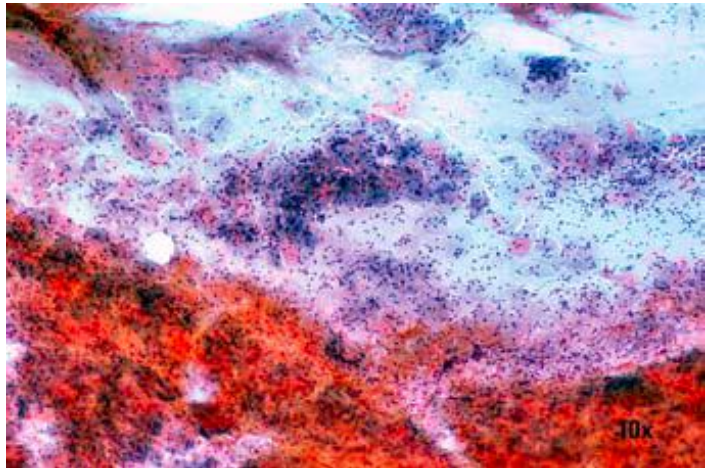
Citologia esfoliativa ginecologica

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 può essere allestito per striscio direttamente sul vetrino porta oggetto (striscio convenzionale)





Citologia per aspirazione con ago sottile

Alcune sedi di prelievo più frequenti

– Mammella
– Tiroide
– Linfonodi*
– Ghiandole salivari
– Noduli sottocutanei
– Fegato
– Polmone
– Pancreas
– Reni

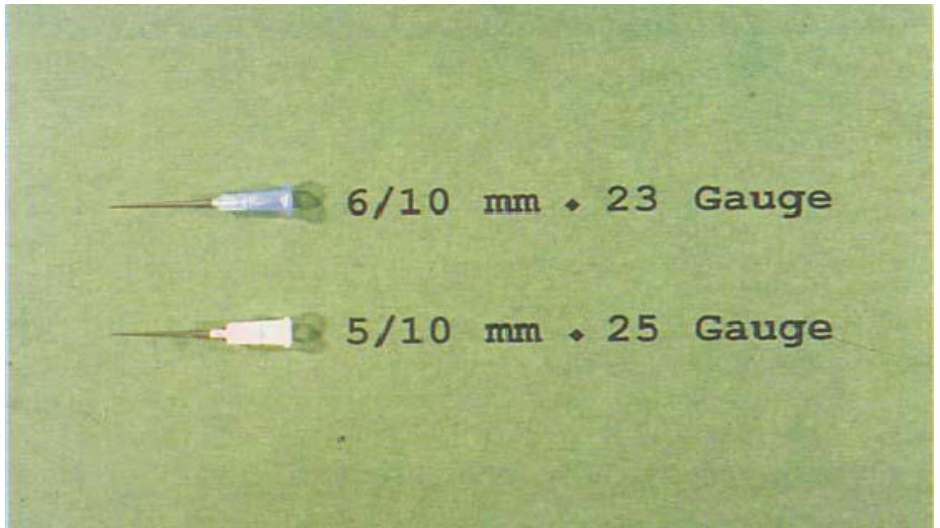
Citologia per aspirazione con ago sottile

• 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 terapeutici

• La punzione può essere effettuata su organi o lesioni superficiali e profonde

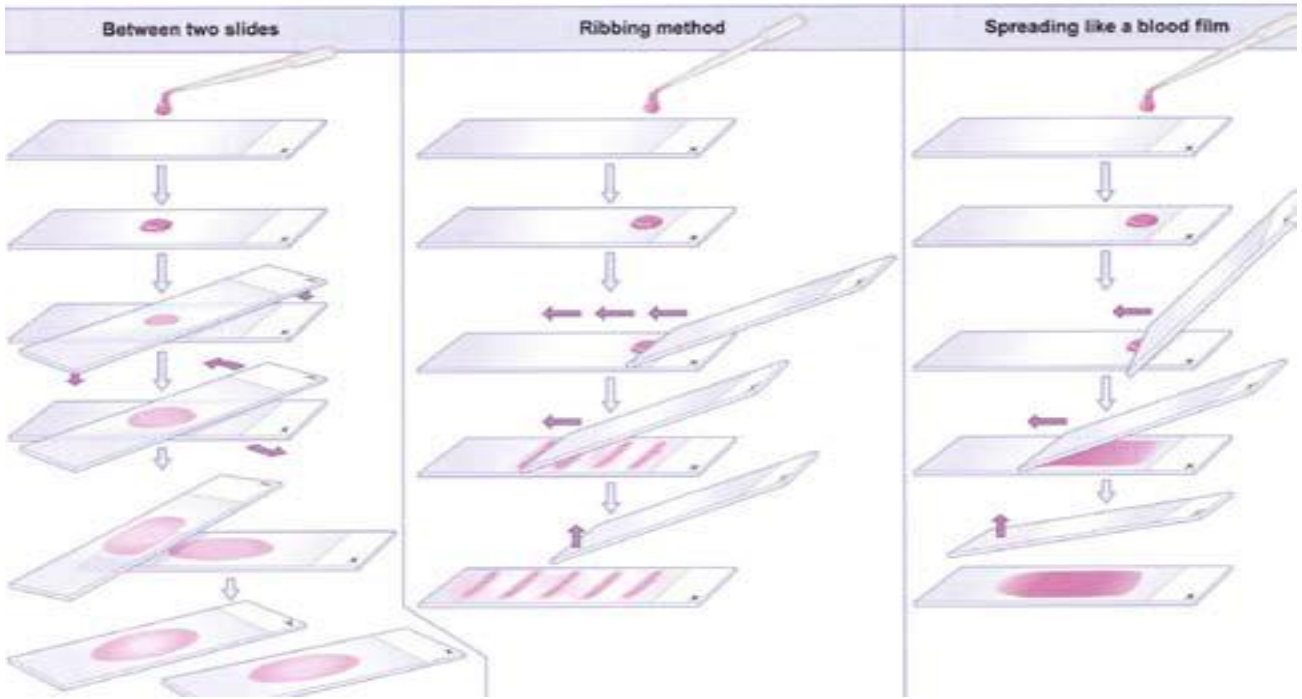
• Per le sedi profonde viene eseguita sotto monitoraggio radiologico (TAC o eco-guidata)





1_Allestimento dei campioni

Il materiale ottenuto con le diverse tecniche di prelievo
– Agoaspirato
– Spazzolato
– Espettorato
– Pap-test
può essere strisciato direttamente sui vetrini porta oggetto



Fissazione

Fissazione

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



• 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.

2_Allestimento dei campioni

- Citoincluso - cell block
- Sedimento

Materiale fissato con formalina e messo in biocassette viene processato e allestito con tecniche istologiche

CITOLOGIA ESFOLIATIVA

CITOLOGIA AGOASPIRATIVA

SI OTTIENE UN 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

(THIN PREP)

citologia esfoliativa da urine e versamenti

SEDIMENTO



1500-2000 rpm



7-10’



Sedimento o pellet

CITOCENTRIFUGAZIONE O CITOSPIN





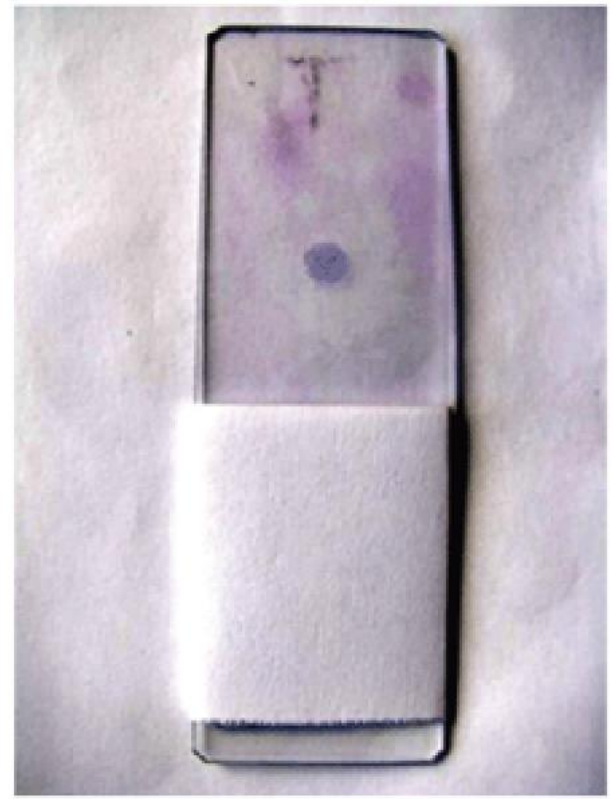


Figure – Slide with BAL fluid sample after cytocentrifugation (macroscopic aspect). The purple circle corresponds to the site where the cells are fixed.

CITOSPIN

https://www.youtube.com/watch?v=5f78t0AH5js

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

(THIN PREP)

Citologia in fase liquida THINPREP

Allestimento dei campioni

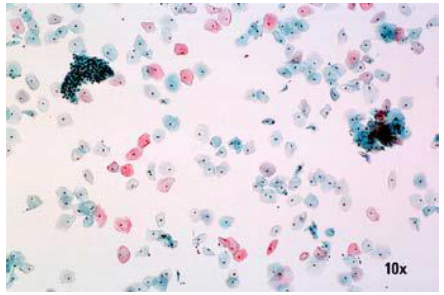
<u>Materiale in fase liquida: allestimento in strato sottile</u>
E' un metodo di allestimento automatico dei preparati
Le cellule sospese nel fissativo vengono depositate automaticamente dallo strumento in un singolo strato di spessore uniforme, su un'area limitata del vetrino.

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







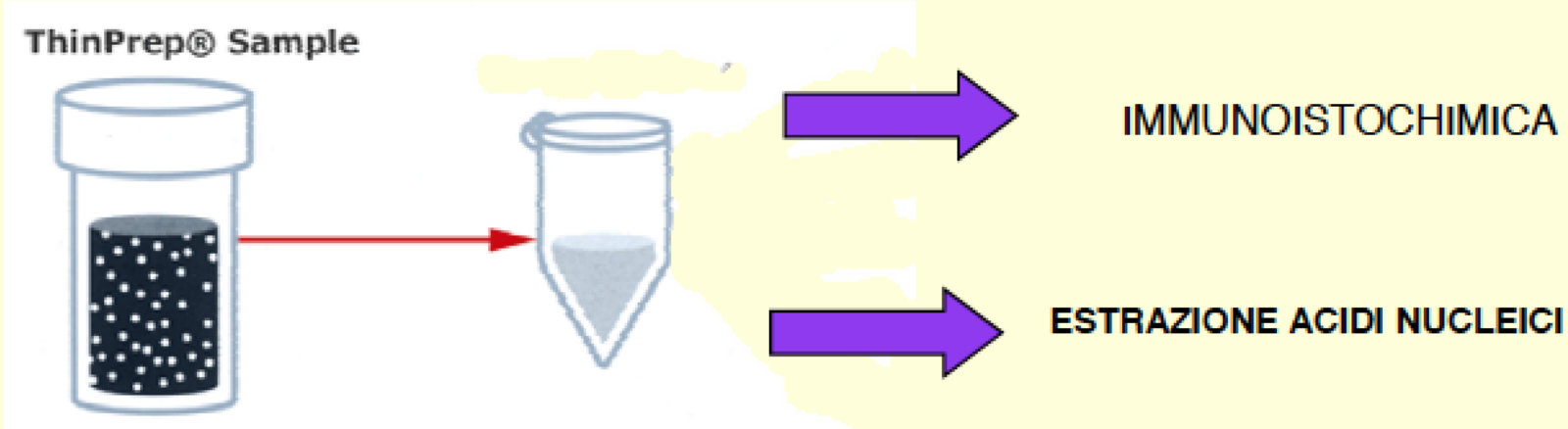


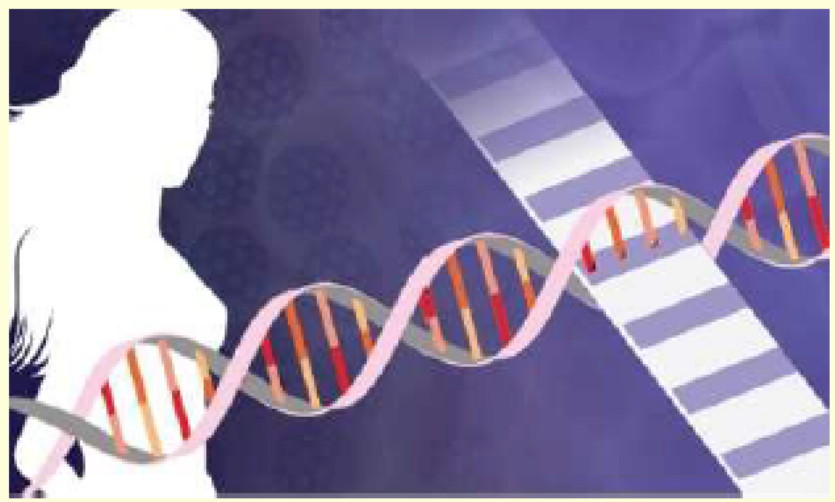
STRATO SOTTILE: le cellule si fissano in Preservcyt



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





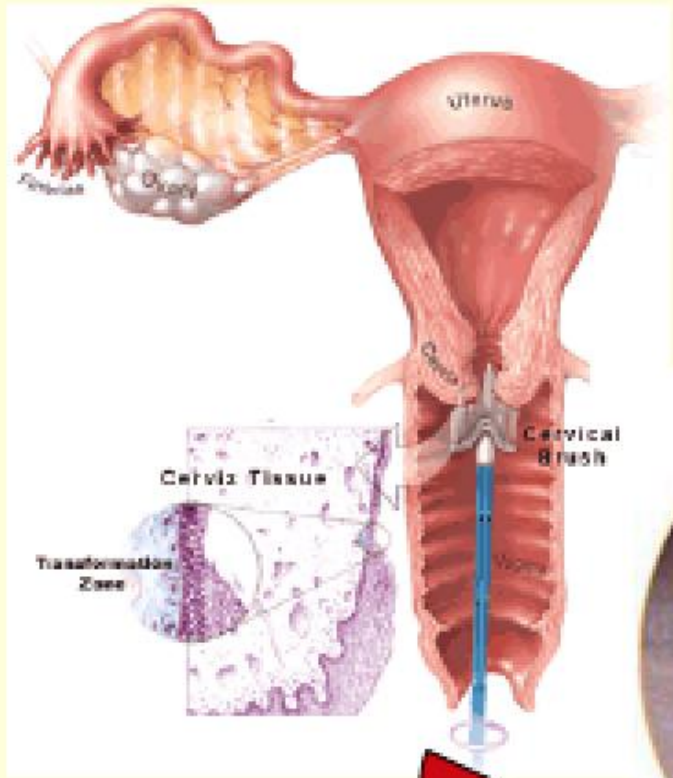
La preparazione di vetrini con cellule “in strato sottile ”

ha anche il grande vantaggio che le cellule si vedono bene

singolarmente, cioè senza sovrapposizioni

e vi è poco sangue e muco

STRATO SOTTILE

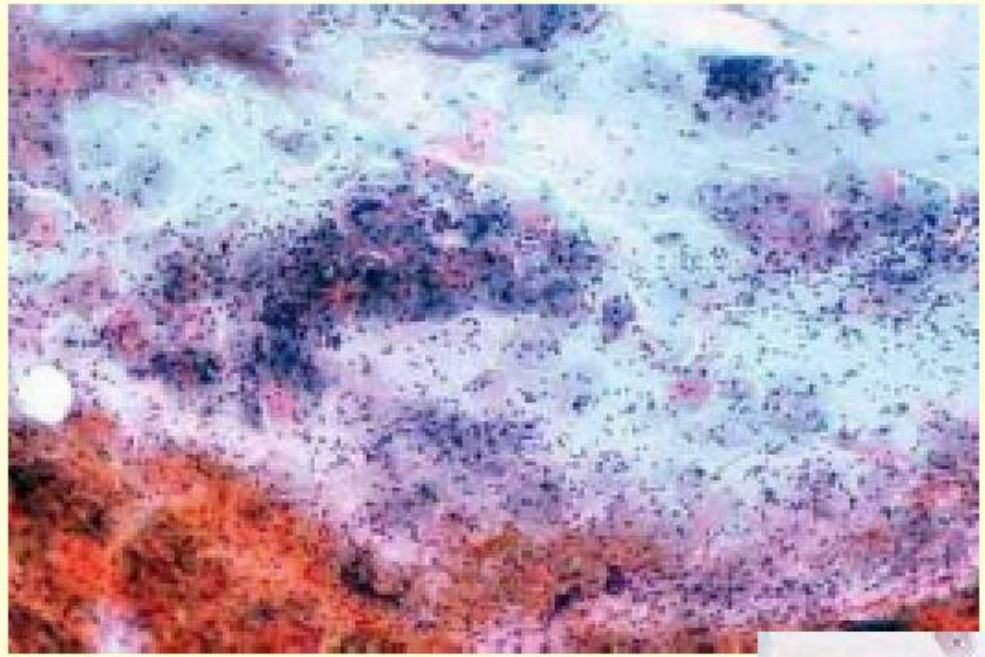




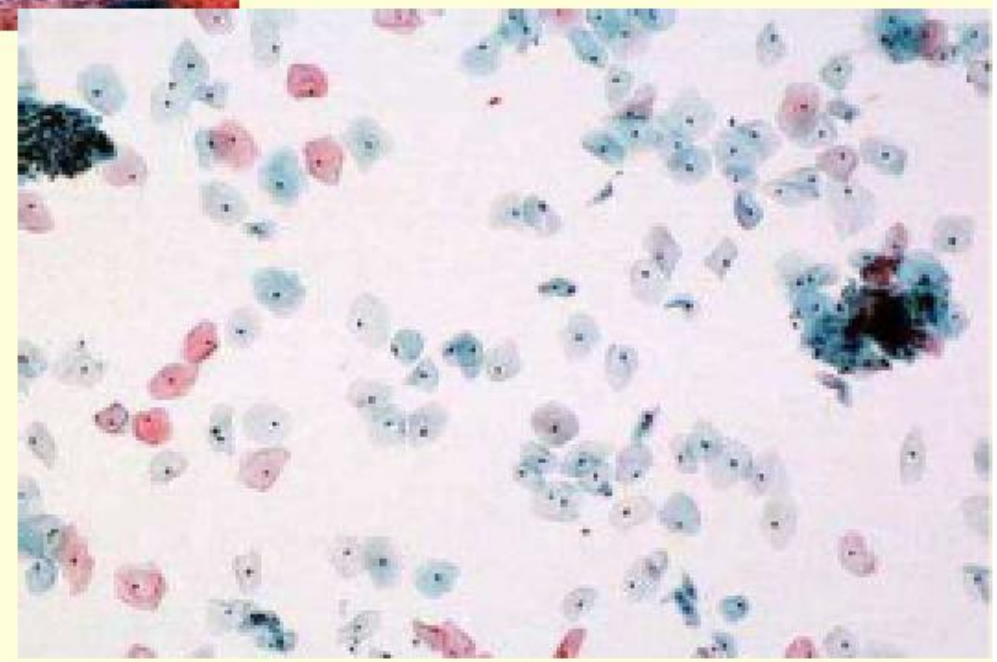





1. DISPERSION
2. CELL COLLECTION
3. CELL TRANSFER




ThinPrep
Conventional
smear



La citologia in fase liquida attraverso **Thin-Prep** consente di avere **numerosi vantaggi rispetto al metodo pap-test in fase liquida**:

- un trasferimento maggiore delle cellule epiteliali prelevate dal brush al liquido del Thin-prep;
- un incremento statisticamente significativo nell'individuazione delle lesioni squamose intraepiteliali di alto grado (+ 59,7% per HSIL);
- una riduzione del numero di campioni citologici inadeguati (inferiore a 0,3%);
- Individuazione delle lesioni ghiandolari;
- Riduzione fino al 93%, grazie alla soluzione (PreservCyt Solution), dei prelievi giudicati non soddisfacenti o limitati da tracce di sangue, muco o frammenti cellulari;
- Processo analitico totalmente automatico e riproducibilità del risultato;
- L'intero volume del contenitore Thin-Prep viene impiegato per l'analisi di laboratorio e pertanto il risultato è più affidabile, sensibile, accurato e riproducibile;
- la possibilità di utilizzare il materiale cellulare residuo per altri test molecolari aggiuntivi come la ricerca di DNA o RNA di HPV; Thin-Prep assicura una stabilità fino a 30 giorni del campione con inalterata concentrazione cellulare e di eventuali patogeni come HPV.

THIN PREP

https://www.youtube.com/watch?v=hDzyhb_4Hu4

https://www.youtube.com/watch?v=qfGOeLxpybk

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

COLORAZIONE DEL CAMPIONE

COLORAZIONE

- **Il metodo di Papanicolaou**, d'elezione per il pap test

- **Il metodo secondo <u>MayGrünwald-Giemsa:</u>**

Principio: Sfrutta l'azione combinata di coloranti acidi (eosina) e coloranti basici (blu di metilene e azur) disciolti in alcool metilico

- Impiega eosina e il blu di metilene per il MayGrünwald
- Impiega l'azzurro II di metilene e l'eosina per il Giemsa

Richiede vetrini essicati all'aria (fissazione a secco)

Mette in evidenza il dettaglio nucleare e il materiale extracellulare

Reagenti principali

- **Soluzione di May-Grünwald:** Miscela di eosina e blu di metilene in alcool metilico; agisce sia come fissativo delle cellule sia come prima colorazione.

- **Soluzione di Giemsa:** Soluzione di eosina e Azur II (o blu di metilene) diluita solitamente in acqua tamponata o distillata, che completa la differenziazione dei nuclei e delle strutture azzurrofile

•La <u>colorazione E/E</u> 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, Herpes, EBV)

•Colorazione di Zihel 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

https://www.youtube.com/watch?v=XtETvm4GVC0

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 PCR