

TECNICHE DI LABORATORIO BIOMEDICO
II ANNO I SEMESTRE

Corso integrato di Metodologie diagnostiche in anatomia patologica

Citopatologia

Tecniche di anatomia patologica

LEZIONE 24 ottobre 2018 – Argomenti trattati

1. Tecniche di citologia

Campione citologico

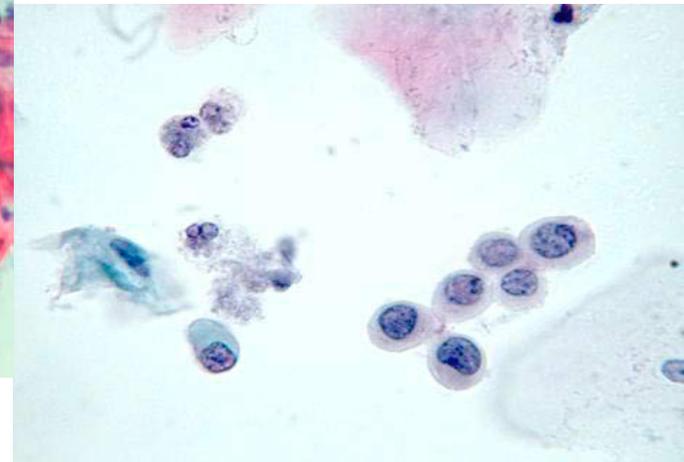
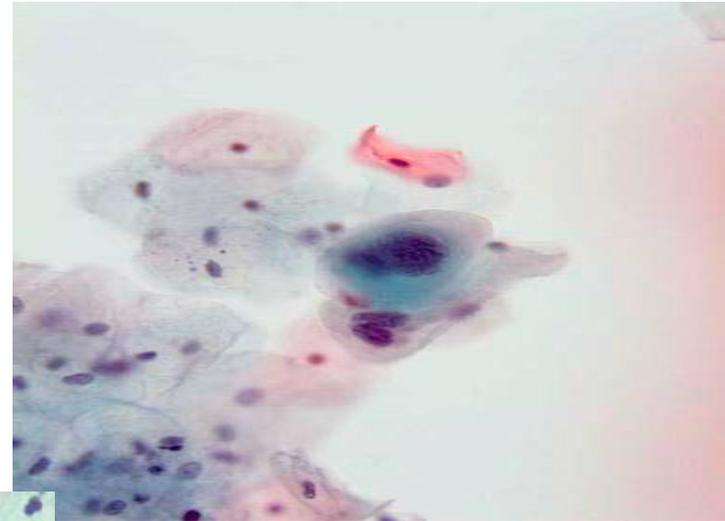
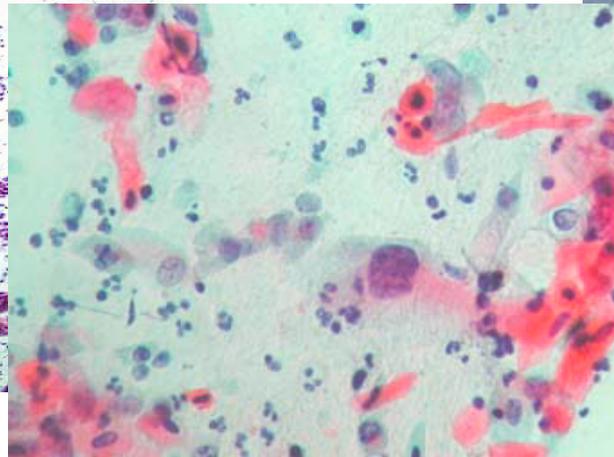
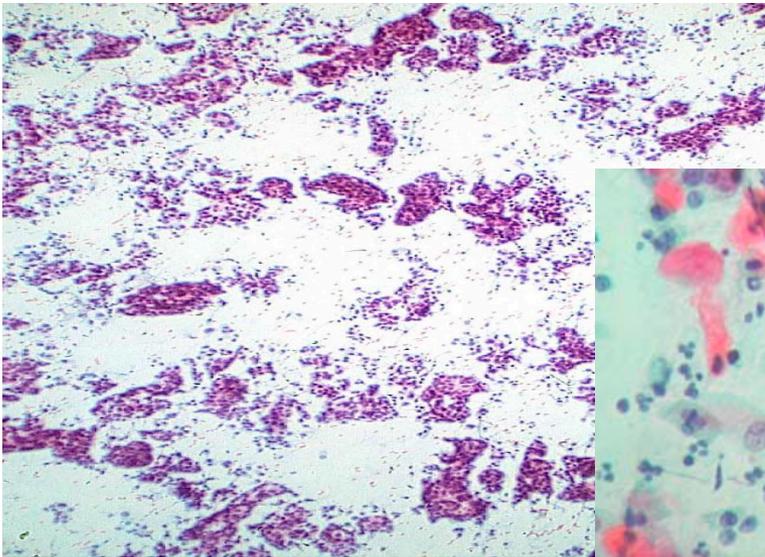
- Persa “la geografia spaziale” dell’organo / tessuto, i criteri diagnostici si basano quasi esclusivamente sulle caratteristiche delle cellule.

- 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:

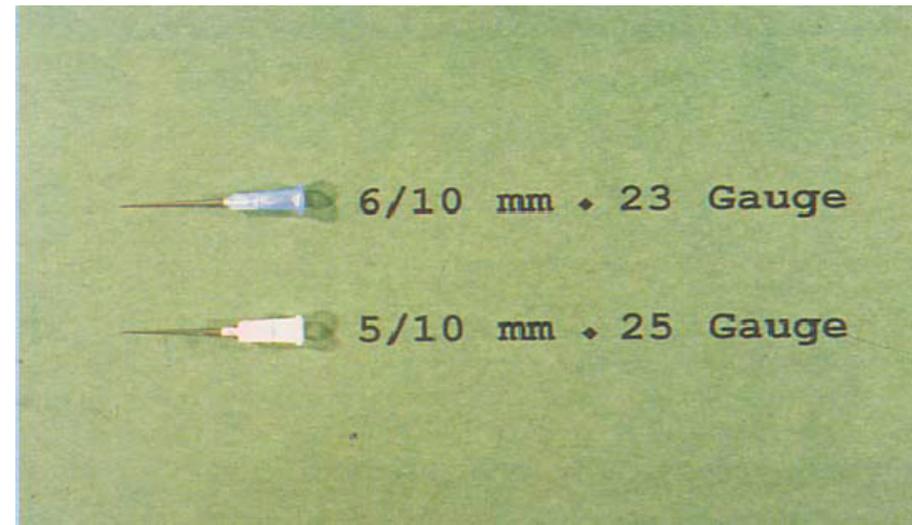
- impossibilità di brushing di lesioni periferiche distali dal punto di arresto dell'endoscopio
- campionare un'area vasta ma periferica, ramo bronchiale spazi bronchiolo-alveolari

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)

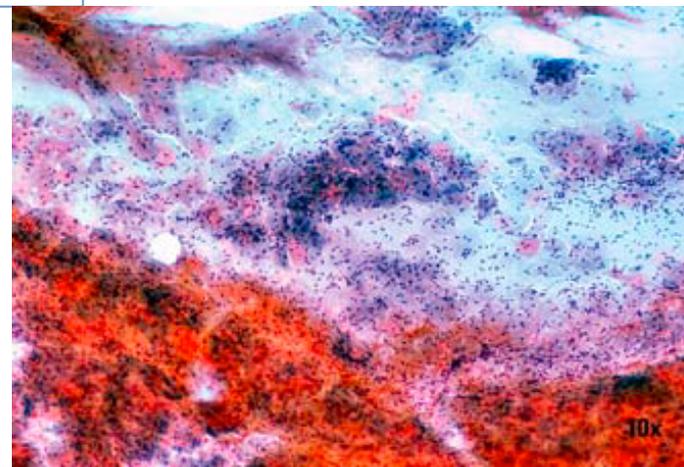


Citologia per aspirazione con ago sottile

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

Citologia esfoliativa ginecologica Pap Test

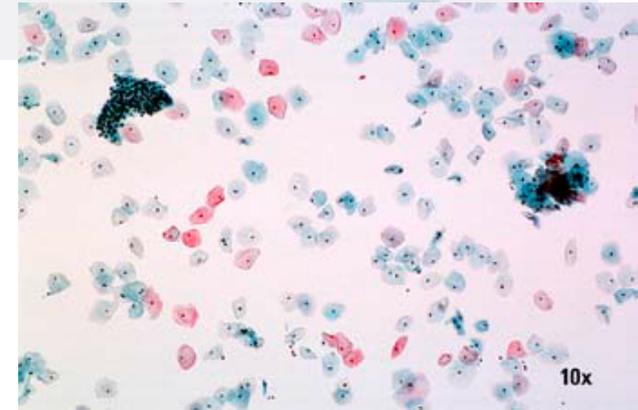
- La cervice uterina è la sede d'elezione per effettuare citologia esfoliativa per l'identificazione del carcinoma del collo dell'utero
 - a scopo diagnostico in pazienti sintomatiche
 - a scopo di screening in pazienti asintomatiche
- Il materiale ottenuto con prelievo cervico-vaginale può essere allestito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



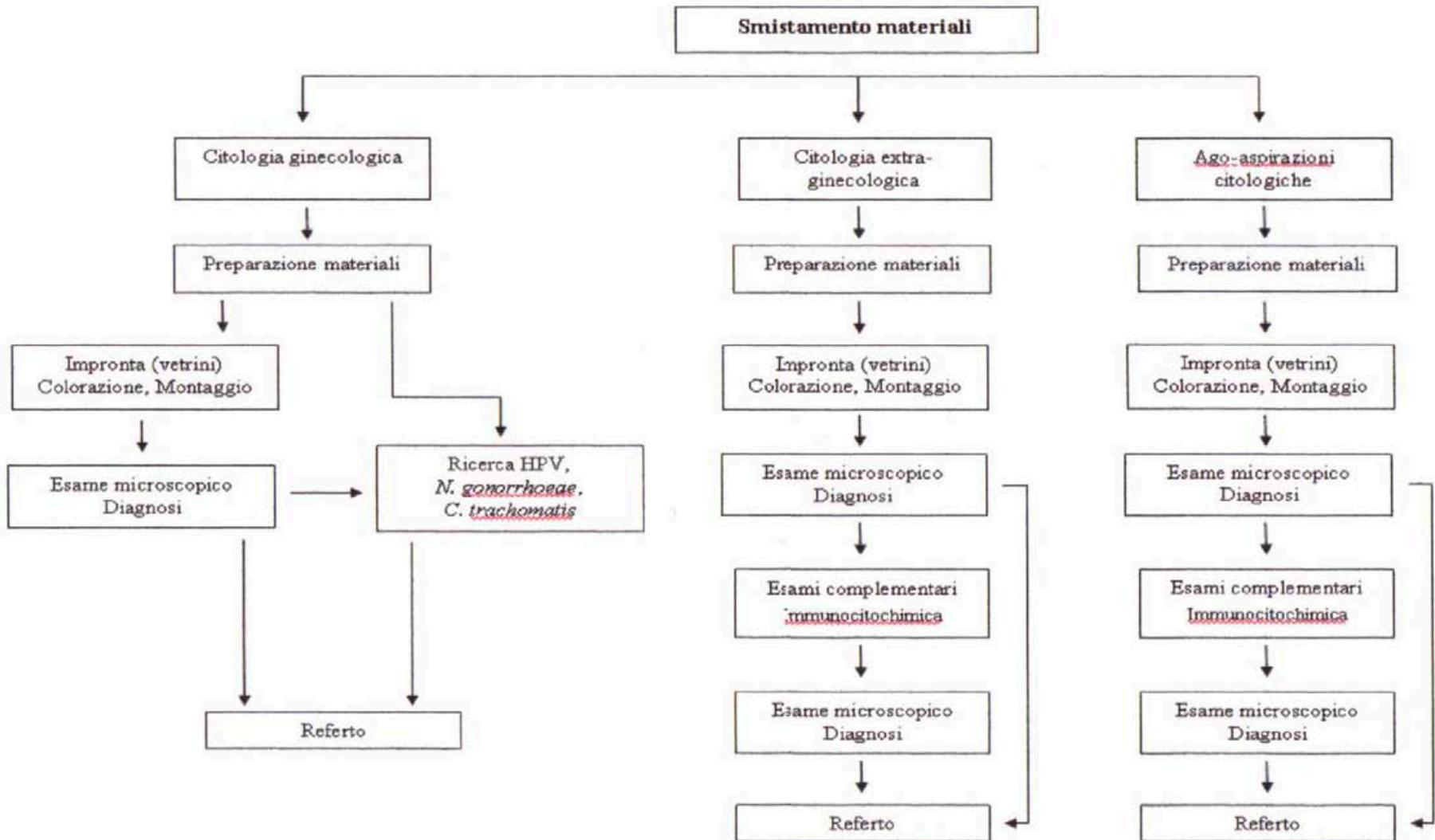
Citologia in fase liquida

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



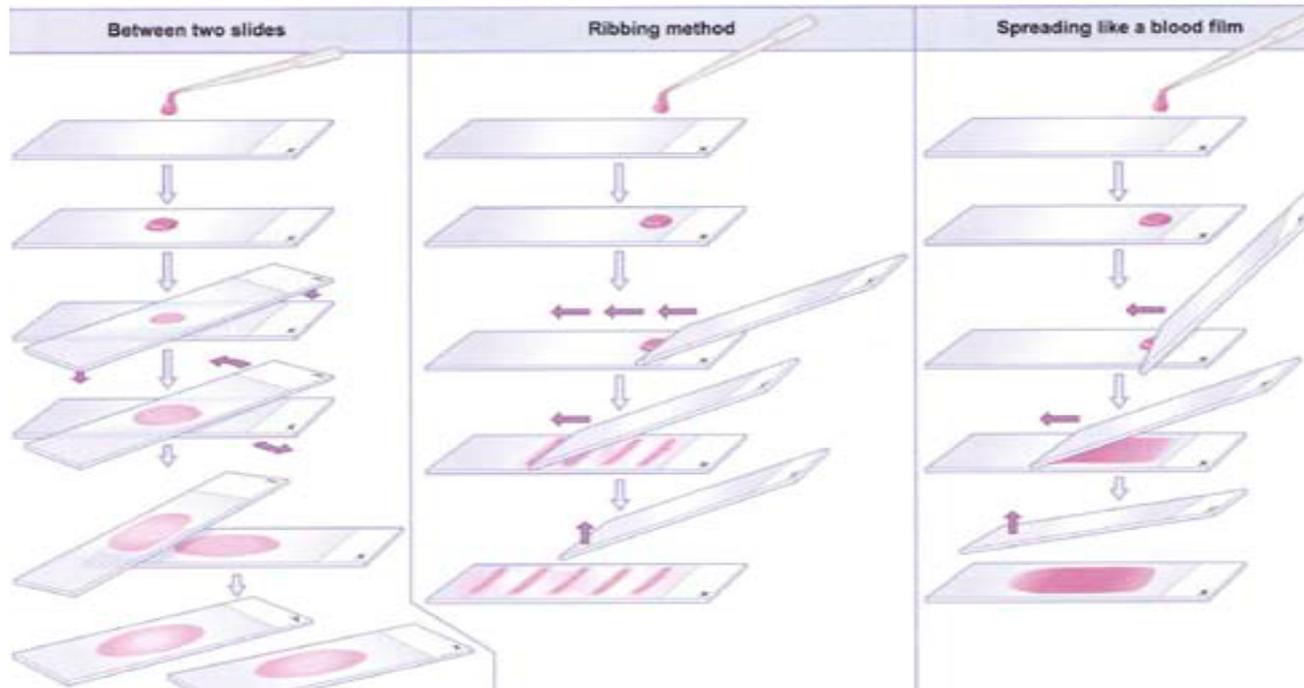
FLUSSO DI LAVORO



Allestimento dei campioni

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

- Agoaspirato
- Spazzolato
- Espettorato
- Pap-test



Allestimento dei campioni

Centrifugato 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.

Allestimento dei campioni

Citocentrifugato

- Nuova sospensione del sedimento
- Si procede con una particolare centrifuga con una testa rotante con 12 alloggiamenti per cuvettes porta campione, in grado di garantire l'adesione delle cellule presenti sul vetrino portaoggetto.

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

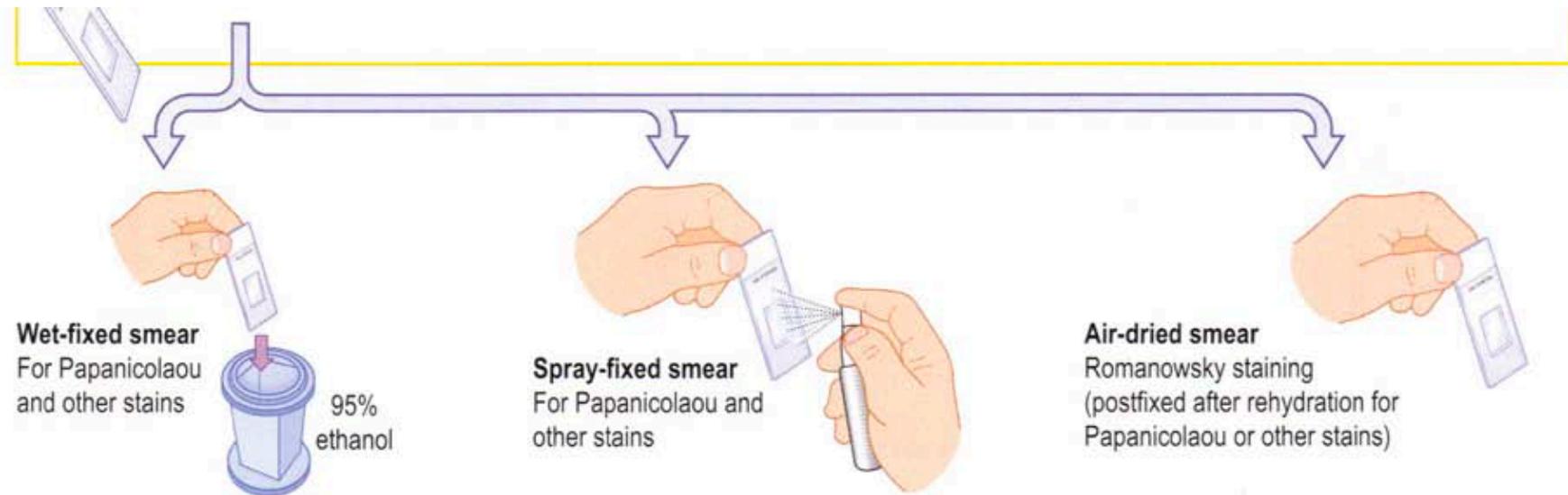
Il materiale fissato con formalina e alloggiato in biocassette viene processato e allestito con tecniche istologiche

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