

La citologia diagnostica: *le buone pratiche*



Pierangela Grassi

Istituto Cantonale di Patologia

Citologia

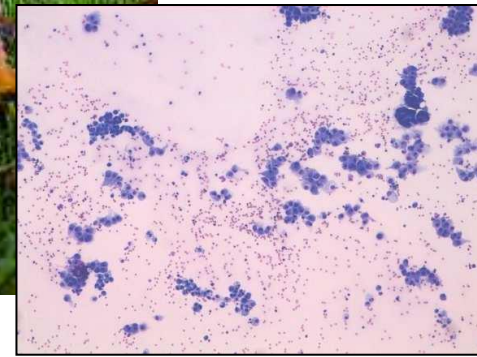
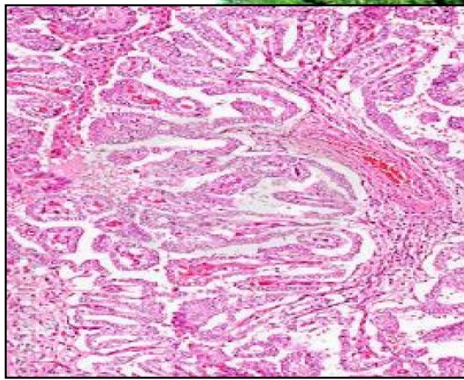
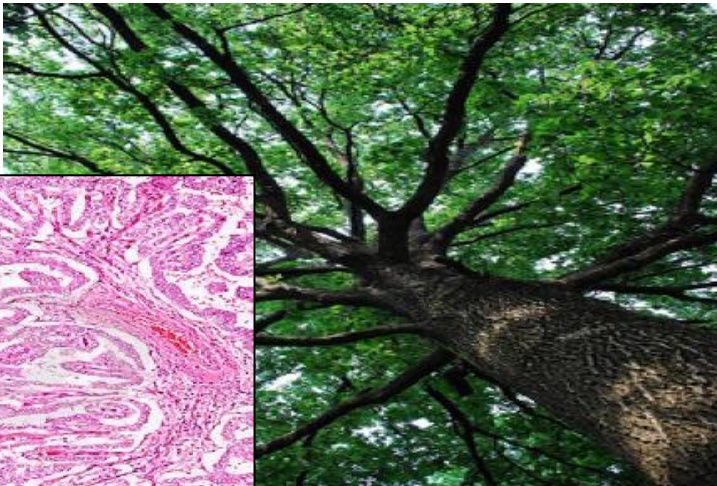
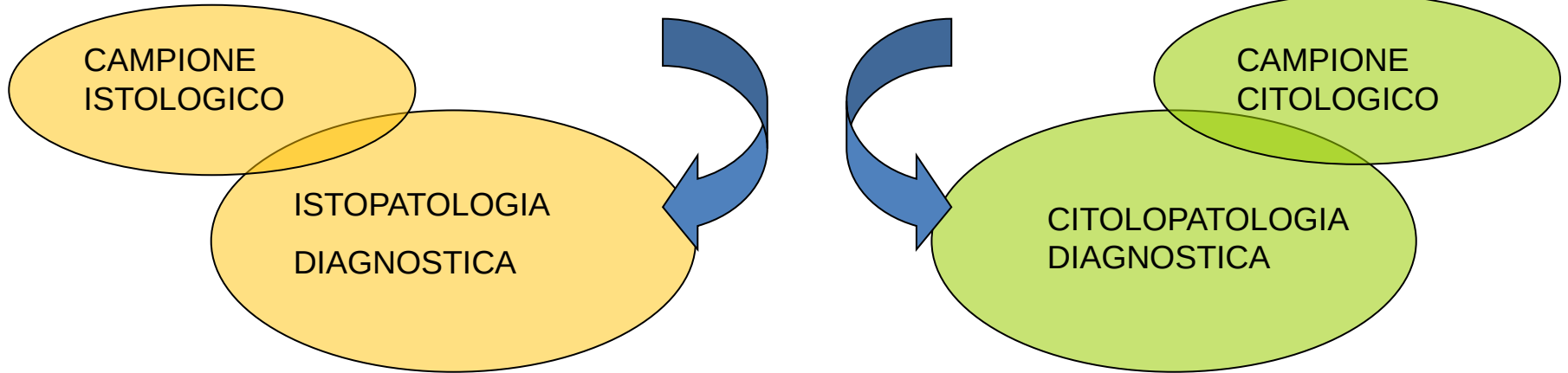
- La citologia è il ramo della biologia che si occupa dello studio della **struttura e delle funzioni delle cellule come unità individuali**
- Si occupa della forma e del **funzionamento delle varie parti della cellula**, dei meccanismi di divisione cellulare e delle disfunzioni delle cellule che ad esempio si verificano nella carcinogenesi
- È **complementare all'istologia** che studia le cellule come componenti dei tessuti

La citologia diagnostica

- Tecnica di indagine che consente di **determinare e differenziare la natura delle alterazioni** evidenziate nel corso di un esame clinico e/o radiologico
- Ha lo scopo di **identificare il processo patologico generale** e quindi di stabilire le ulteriori indagini diagnostiche per giungere ad una diagnosi definitiva o indirizzare gli interventi terapeutici da effettuare.
- Occupa un posto di notevole **rilevo nella diagnostica neoplastica**

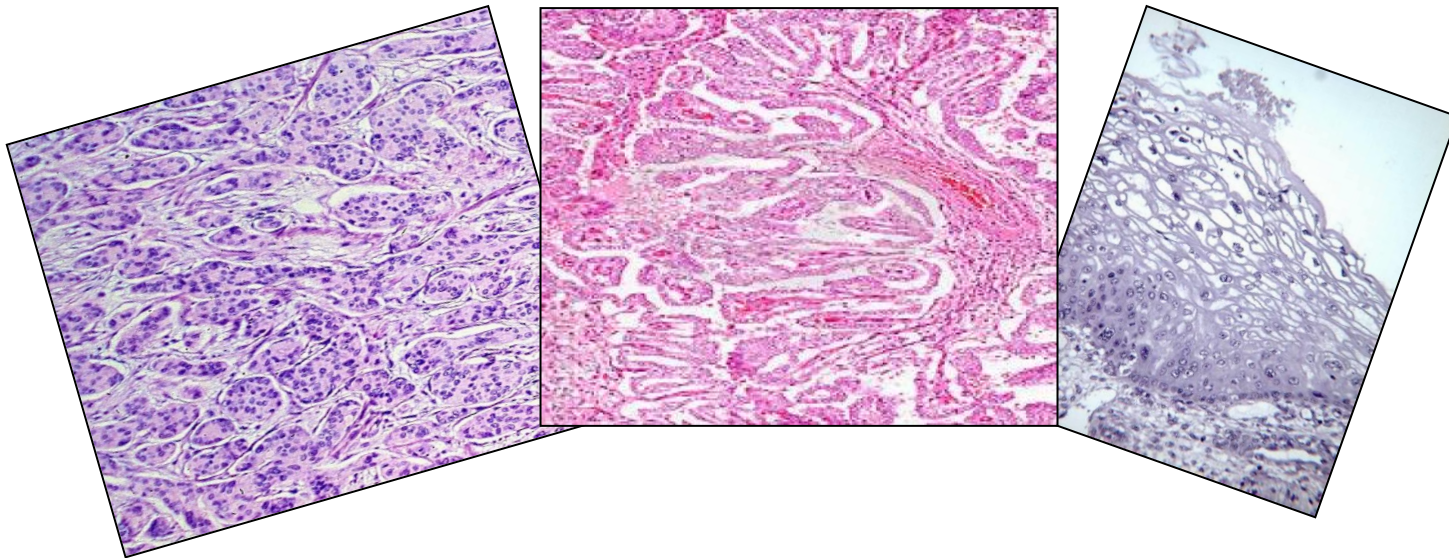
Diagnostica anatomopatologica

DUE APPROCCI



Campione istologico

- Mantenuti “siti, orientamento e rapporti” delle componenti tessutali prelevate
- Mantenuta “la geografia spaziale” tra epitelio, stroma, vasi



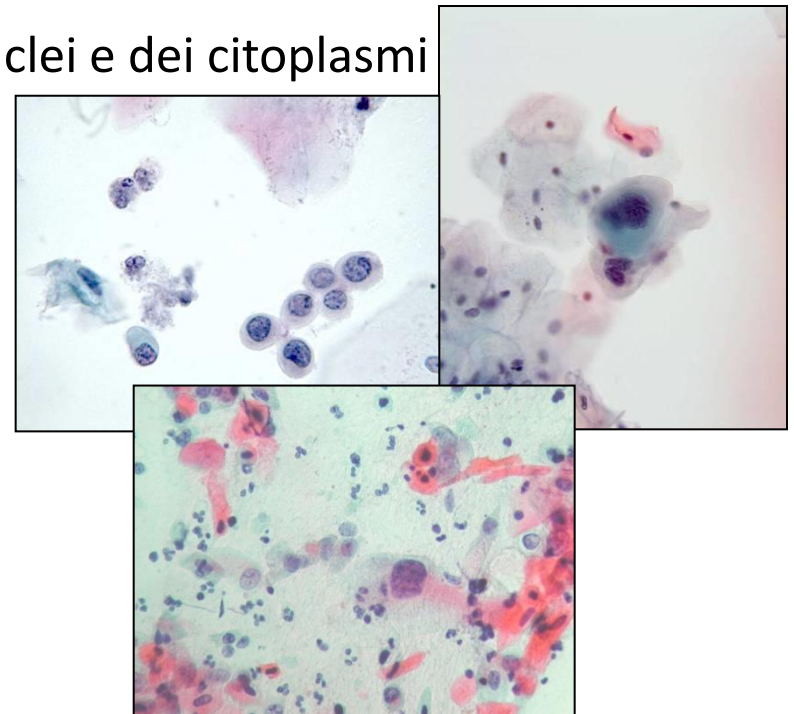
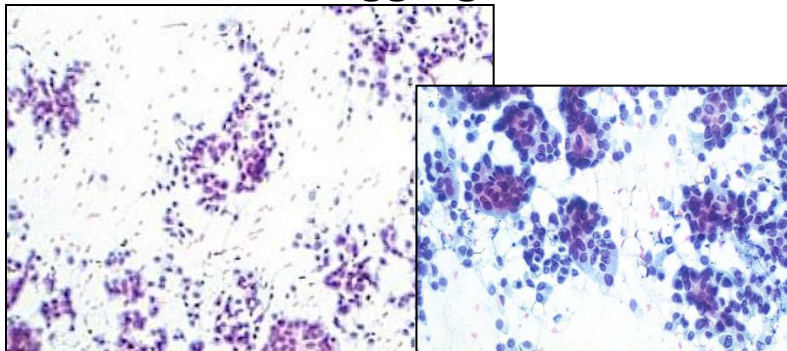
Campione citologico

- 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



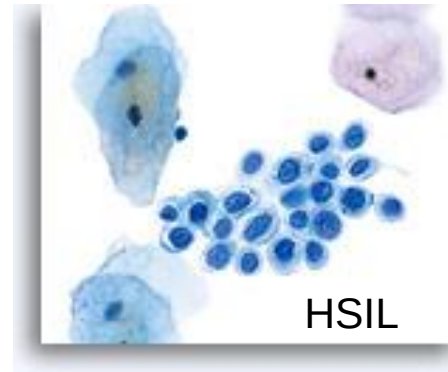
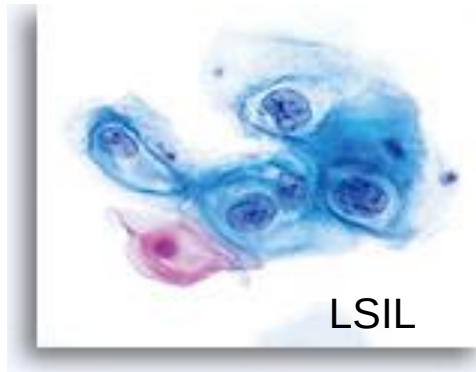
L'esame citologico

- Impiego, vantaggi e limiti della citologia diagnostica
- Sedi e tecniche di prelievo
- Invio del campione al laboratorio
- Tecniche di allestimento e colorazione
- Tecniche complementari
- Lettura al microscopio: i quadri morfologici

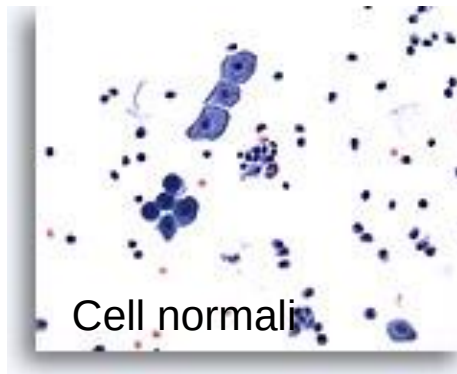
Impiego della citologia diagnostica

- Negli **screening** di popolazioni

Pap test



Urine



Impiego della citologia diagnostica

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

Come test per la discriminazione tra “patologie neoplastiche / patologie non neoplastiche” in pazienti con:

- *manifestazioni patologiche aspecifiche quali versamenti nelle cavità sierose*
Esame citologico dei liquidi di versamento delle cavità sierose
- *comparsa di sintomatologie neurologiche*
Esame citologico del liquido cefalo-rachidiano (liquor)

Impiego della citologia diagnostica

➤ 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).

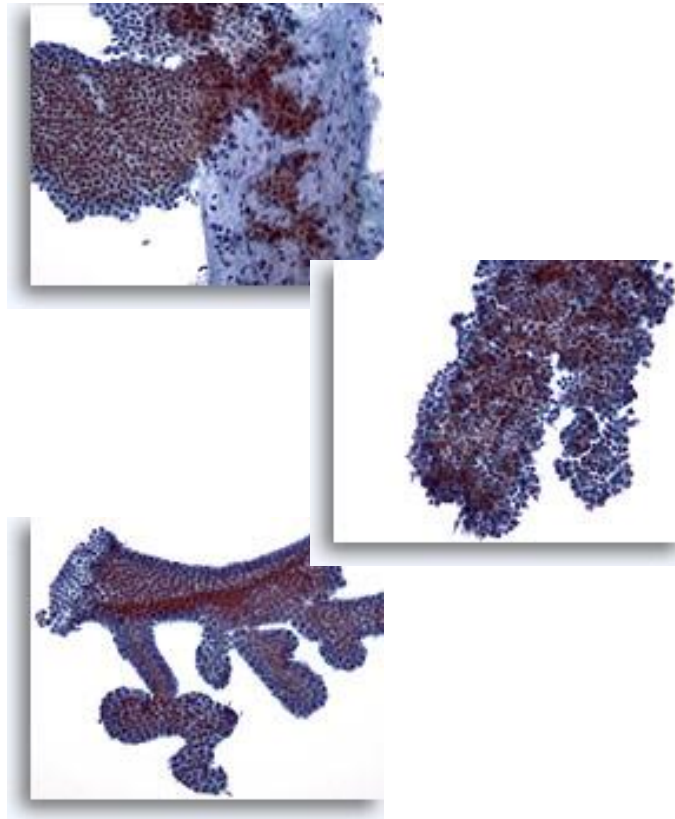
- **Citologia da agoaspirazione con ago sottile (FNA)**
- **Esame citologico del lavaggio bronchiolo-alveolare (BAL)**

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

➤ Nella **diagnostica di secondo livello**

Nodulo mammario
riscontrato alla
mammografia

FNA: quadro citologico
compatibile con
fibroadenoma



➤ Nel **follow-up di malattia**

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

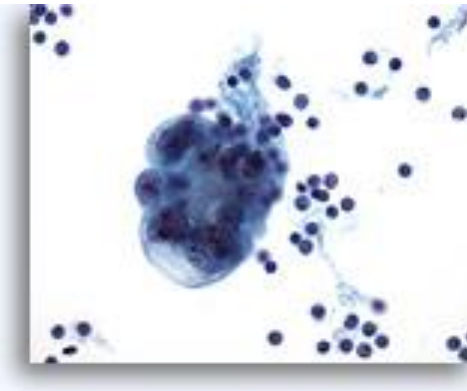
Esempi:

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

- Nel **follow-up di malattia**

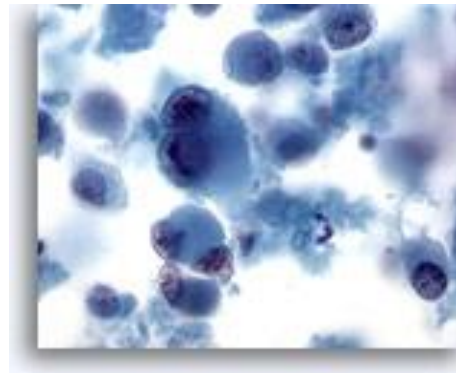
Versamento pleurico:

Recidiva di adenocarcinoma



FNA fegato:

Localizzazione di melanoma



Limiti

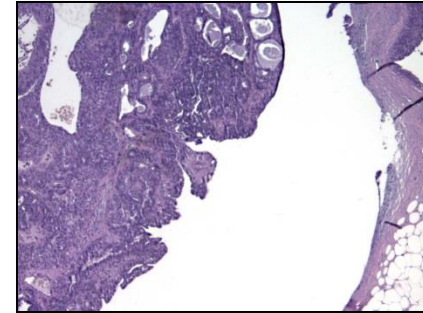
- Non dà informazioni sulla complessità delle lesioni :
 - *rapporto cellule/ stroma, pattern di crescita, dimensioni eterogeneità*

- Falsi negativi – Tumore non diagnosticato
 - *Campioni non diagnostici per errore di campionamento, di allestimento,*
 - *Cellule diagnostiche presenti ma non individuate*

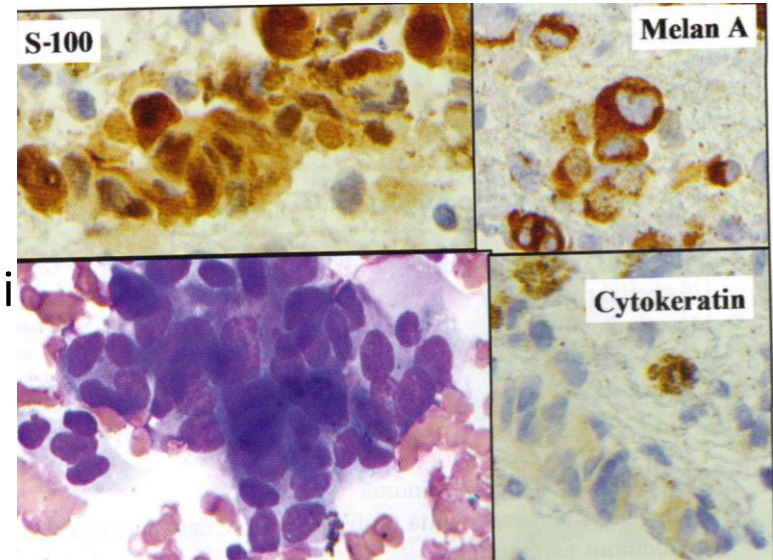
- Falso positivo.
 - **I falsi positivi devono essere evitati!**

Limiti

- Non può differenziare il carcinoma in situ dal carcinoma infiltrante



- Anche se il campione è idoneo per le indagini immunocitochimiche, non sempre è sufficiente per tipizzare neoplasie che richiedono l'esecuzione di pannelli di colorazioni



PERCHE' ...
scegliere un esame citologico

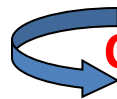


PERCHE'...

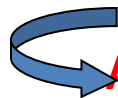
- Di rapida esecuzione
- Non traumatico, poco invasivo
- Semplice e ripetibile
- Tempi brevi di risposta
- Poco costoso
- In mani esperte attendibilità pari quasi all'istologia
- Permette di inquadrare la patologia in tempi brevi

Citologia diagnostica: vantaggi

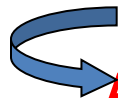
- Rapida esecuzione
- Impegno limitato di personale e strutture

 **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**

QUANDO...
fare un prelievo citologico



QUANDO...

- Organi/lesioni esplorabili
- Organi/lesioni raggiungibili
- Lesioni di difficile exeresi chirurgica
- Condizioni del paziente
 - Senza anestesia o solo sedazione
 - Minimi rischi di sanguinamento

DOVE...fare un prelievo citologico



DOVE...

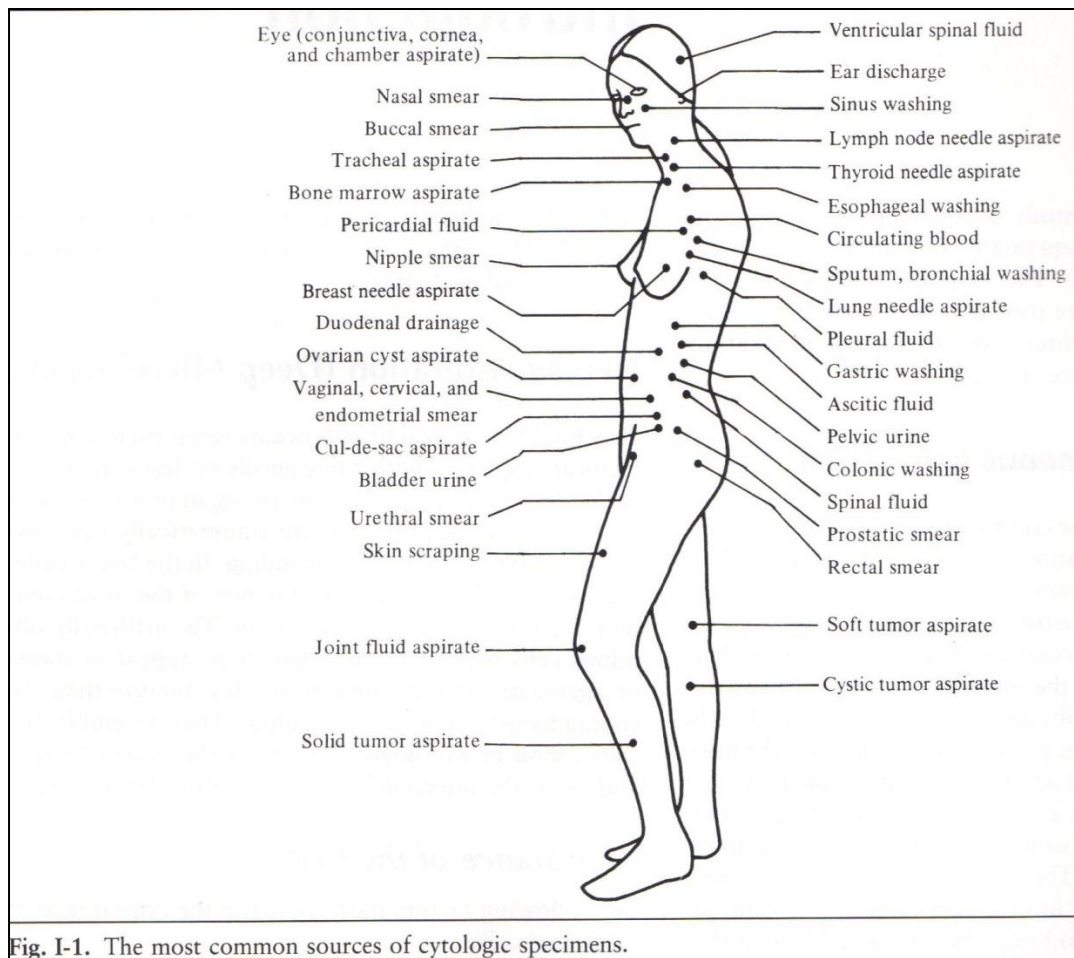


Fig. I-1. The most common sources of cytologic specimens.

DOVE...

- Lesioni di cute e sottocute
- Organi superficiali e profondi (prelievi eco-tac- guidati)
- Linfonodi esplorabili aumentati di volume
- Versamenti cavitari e articolari
- Liquido cefalo-rachidiano
- Lavaggi bronco-alveolari

COME...fare un prelievo citologico



COME...

➤ Citologia ago-aspirativa

FNA fine needle aspiration



➤ Citologia esfoliativa

Scraping

Brushing



FNA

citologia per aspirazione con ago sottile

Metodica di prelievo effettuata con ago 22-25 G consente di ottenere materiale diagnostico attraverso manovra agoaspirativa

- di lesioni nodulari superficiali
- di lesioni profonde sotto guida ecografica, fluoroscopica o TAC



FNA

- Mammella
- Tiroide
- Tessuti molli
- Ghiandole salivari

- Polmone e mediastino
- Fegato
- Pancreas
- Ovaio
- Linfonodi profondi

FNA

Fine Needle
Aspiration

ROSE
Rapid On Site Evaluation

Papanicolaou
May-Grunwald-Giemsa

tecniche speciali
FACS
Immunocitochimica
Biologia Molecolare

La citologia esfoliativa

Lo studio di cellule, normali e alterate in corso di malattie, desquamate da differenti sedi anatomiche, e adeguatamente raccolte, fissate e processate.

- La desquamazione di cellule fa parte del rinnovamento e dei processi di differenziazione dei tessuti ed organi.
- La **desquamazione è un processo continuo**, incessante e che **riflette le condizioni fisiologiche e patologiche** operanti.
- La velocità di desquamazione dipende da caratteristiche tipiche della sede, del ciclo vitale, dalle condizioni ambientali e metaboliche.
- La grande maggioranza di queste cellule originano da epiteli ma possono anche comprendere cellule mesodermiche.

La citologia esfoliativa

- Campioni con **cellule distaccatesi spontaneamente**:
 - *espettorato*
 - *urina*
 - *liquidi di versamento*
 - *liquor*
 - *secreto mammario*

- **Esfoliazione indotta** con **asportazione meccanica** mediante spazzolato o lavaggio, abrasione:
 - *Ramo bronchiale*
 - *Tubo digerente*
 - *Cervice uterina*
 - *Cute*

Invio dei materiali

- I materiali/**liquidi** devono essere inviati in **contenitori a parete rigida provvisti di chiusura ermetica ben tappati**, identificati.
- La **richiesta** del medico prelevatore che accompagna il materiale deve essere tenuta **separata** dallo stesso **per evitare inquinamenti**

- **NON** devono essere inviati i sacchetti di prelievo, i dispositivi di aspirazione né contenitori troppo alti .



- Inviare una quantità massima di 1000 ml
- utilizzare contenitori con tappo a vite chiusi ermeticamente.
- non aggiungere additivi ma conservare a 4°C fino al ritiro del corriere
- porre i contenitori in posizione verticale nei box di trasporto



La richiesta di esame citologico

- *Identificazione del paziente* (nome, cognome, data di nascita, sesso)
- *Identificazione del richiedente* (unità operativa, nome, cognome e firma del richiedente)
- *Identificazione del materiale*, specificando data del prelievo, tipo di prelievo, localizzazione topografica e lateralità del prelievo (es. mammella destra, versamento pleurico sinistro, lobo superiore del polmone sinistro, etc.)
- *Numero di contenitori*; in caso di prelievi multipli differenziati deve essere riportato il numero arabo identificativo del campione, corrispondente a quanto riportato sulla richiesta

nel caso di materiali provenienti da pazienti con patologie infettive rilevanti, sul contenitore deve essere riportata l'eventualità di rischio biologico

Al fine di una **corretta diagnosi** per **l'efficienza del risultato** analitico risultano essere **fondamentali**

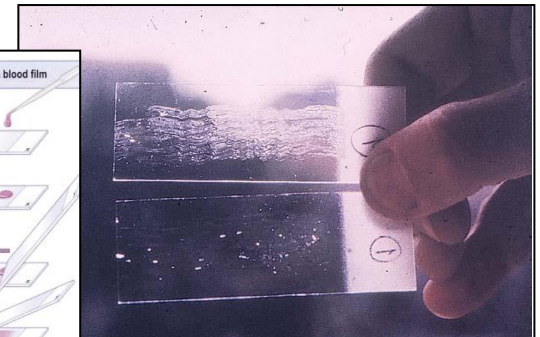
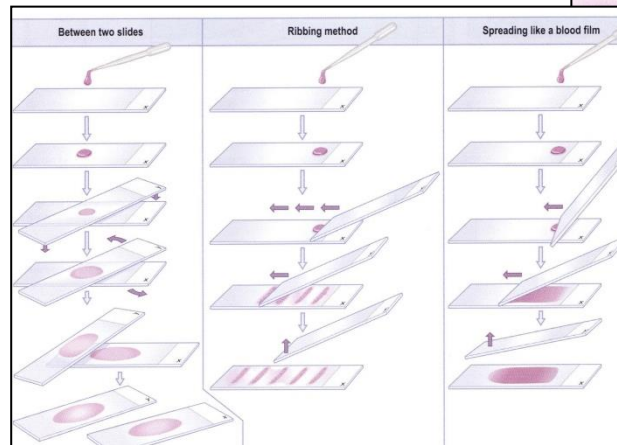
- **Le notizie cliniche** utili per la diagnosi (es. patologie pregresse correlabili all'intervento o prelievo, pregresse diagnosi anatomo patologiche per neoplasie o correlabili alla patologia in atto, risultati di esami di imaging, terapie in corso o pregresse).
- **L'assenza di notizie cliniche rappresenta il 40% delle omissioni osservate sulle richieste di esame**
- Nel 6.1% dei casi la successiva integrazione con le notizie cliniche ha portato a una revisione della precedente diagnosi

Allestimento dei campioni

Il materiale ottenuto con le diverse tecniche di prelievo può essere

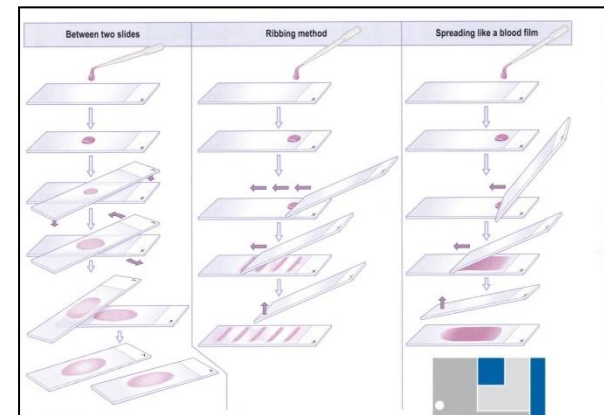
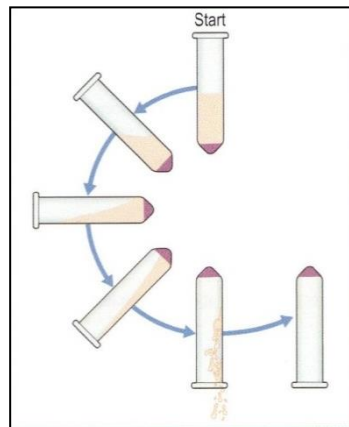
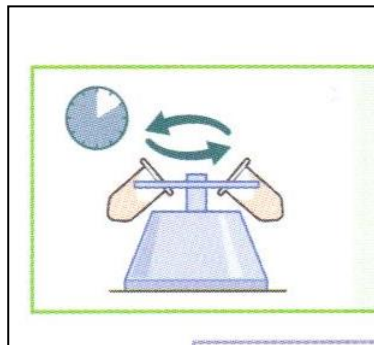
➤ **Strisciato** direttamente sui vetrini portaoggetto

- *Agoaspirato*
- *Spazzolato*
- *Espettorato*
- *Pap-test*



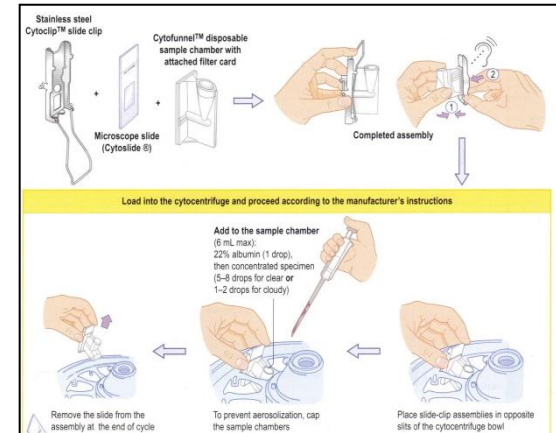
➤ **Centrifugato** per essere arricchito e successivamente strisciato

- La cellularità presente consente di ottenere, dopo centrifugazione, un sedimento visibile nella provetta.
- E' il metodo più semplice per arricchire i campioni liquidi
 - *urine*
 - *versamenti*
 - *lavaggi*



➤ Citocentrifugato

- Dopo la prima centrifugazione si risospende il sedimento
- Si distribuisce in particolari couvettes in grado di garantire l'adesione delle cellule presenti ad un vetrino porta-oggetto.
- Le cellule sono concentrate in una piccola area



➤ Citocentrifugato

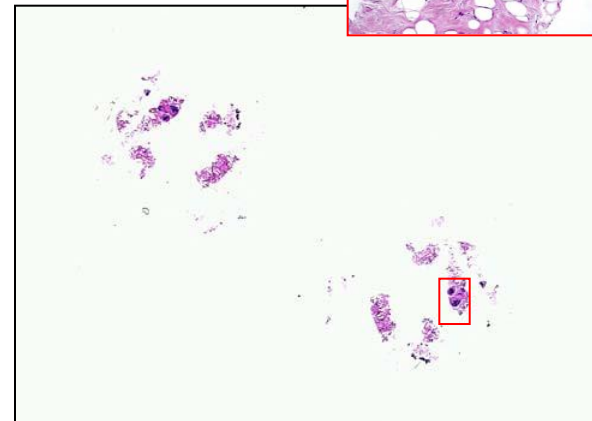
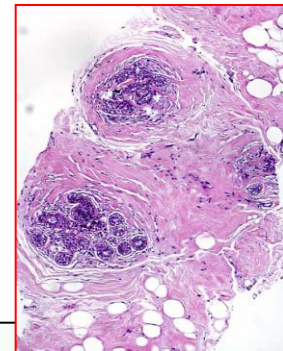
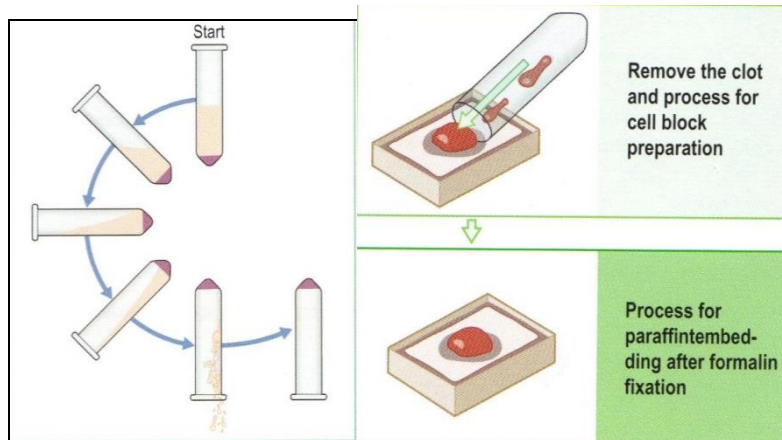
- Si impiega una particolare centrifuga con una testa rotante con 12 alloggiamenti per couvettes porta-campione
- Il numero dei giri e il tempo impostato variano a dipendenza del materiale
- 600-900rpm per 3-5 minuti



➤ Citoincluso - cell block

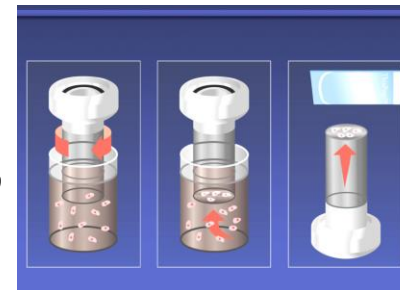
- *Sedimento*
- *Microfrustoli* di materiale prelevato mediante agoaspirazione

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



➤ **Allestimento in strato sottile**
Materiale in fase liquida

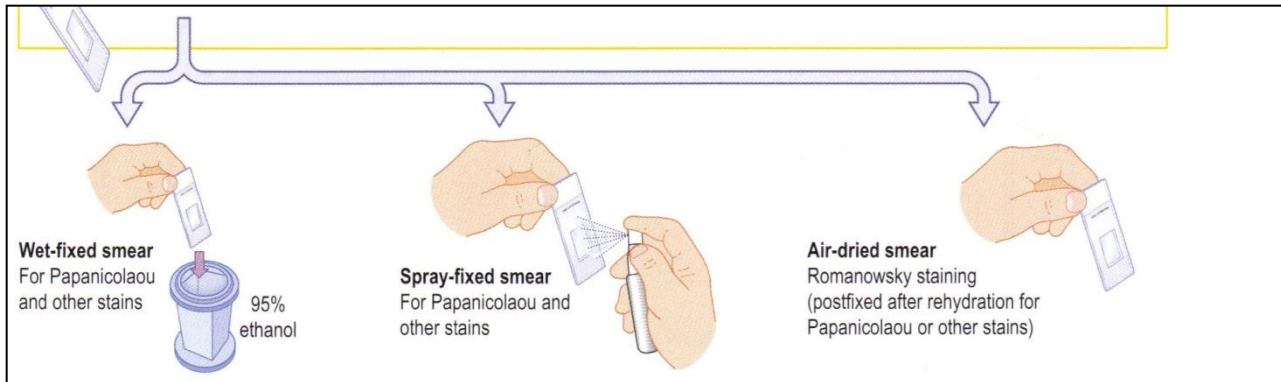
- E' un metodo di allestimento automatico dei preparati
 - Le cellule sospese nel fissativo vengono depositate automaticamente dallo strumento in un **singolo strato di spessore uniforme**, su un'area limitata del vetrino.
1. *Dispersione omogenea delle cellule*
 2. *Raccolta delle cellule*
 3. *Trasferimento delle cellule sul vetrino*



Fissazione

- Tappa **fondamentale** per avere dei campioni citologici ottimali è **l'immediata fissazione**

deve avvenire subito dopo l'allestimento quando sono ancora umidi.



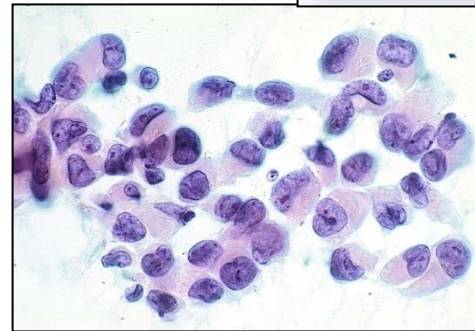
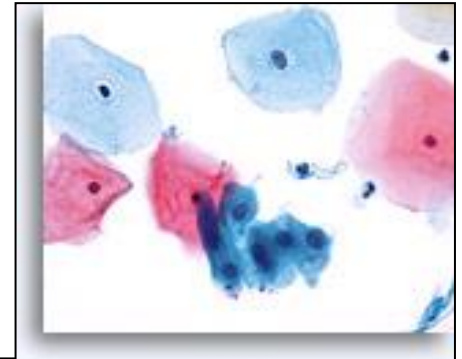
Colorazione

➤ Il metodo di **Papanicolaou**, d'elezione per la citologia e il pap- test

- ❑ colorazione nucleare
 - ematossilina
- ❑ colorazione citoplasmatica
 - Orange G
 - EA con miscela di coloranti
 - (verde luce SF ed eosina giallastra)

Buona definizione del nucleo,
membrana nucleare e nucleoli,
e del citoplasma

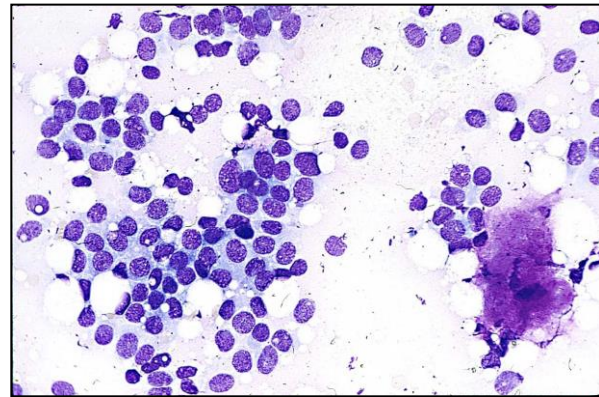
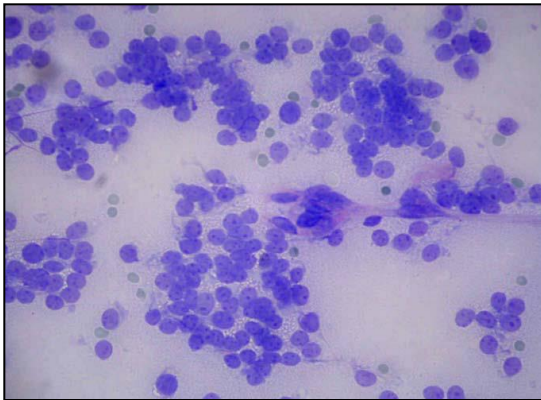
Richiede fissazione alcolica



- 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

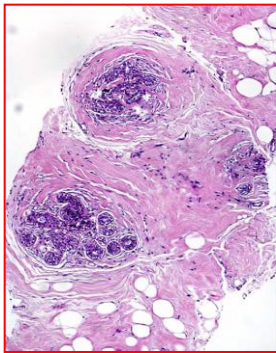
Richiede vetrini essiccati all'aria (**fissazione a secco**)

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

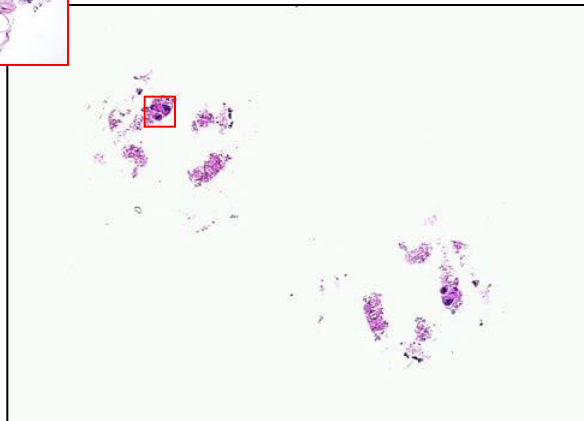
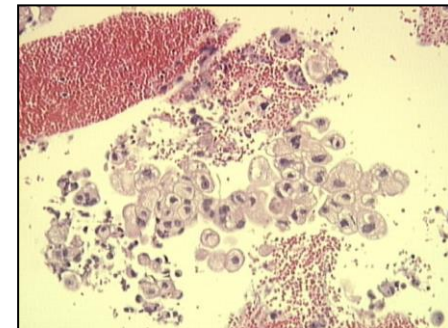


colorazione nucleare

- ematossilina

colorazione citoplasmatica

- eosina

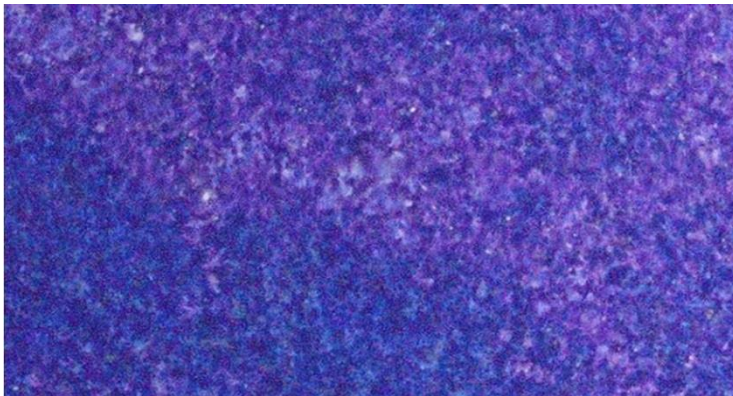
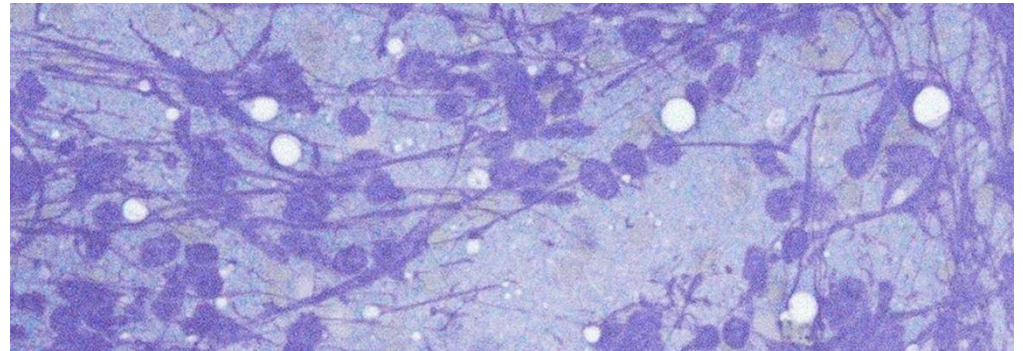


Valutazione dei preparati

- Buono stato di conservazione delle cellule
- Presenza di un numero adeguato di cellule
- Campione rappresentativo della lesione
- Fissazione adeguata

- Devono essere valutate le cellule ben conservate e riconoscibili

Cellule »rotte«

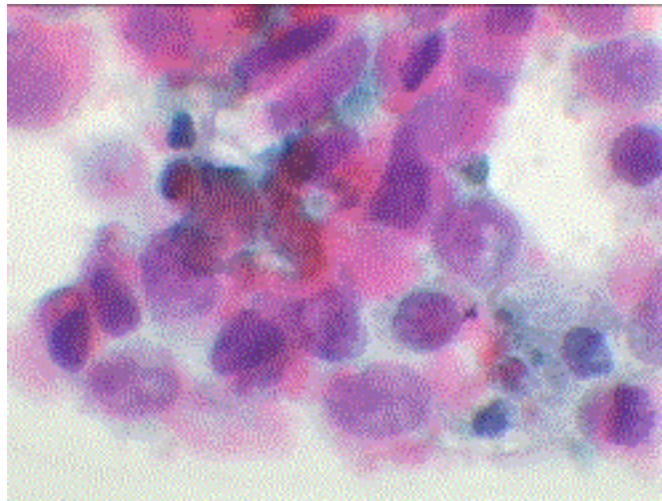


Eccessivo spessore del materiale

➤ Effetti di una cattiva /ritardata fissazione

- rigonfiamento nucleare
- degenerazione citoplasmatica
- perdita/modificazione degli antigeni cellulari

trasformazioni cellulari che influenzano l'interpretazione del preparato e la valutazione diagnostica.



Colorazioni complementari

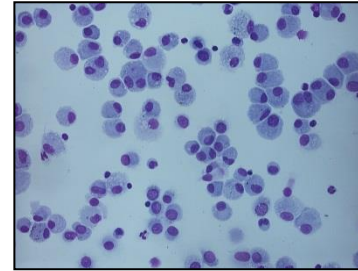
- **Diff Quick**

per la conta cellulare % nei BAL

macrofagi

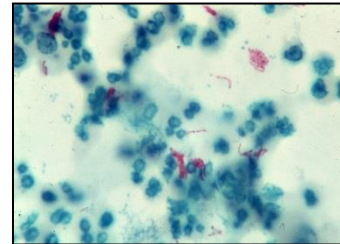
linfociti

granulociti eosinofili



- Colorazione di **Ziehl Neelsen**

per la ricerca di micobatteri



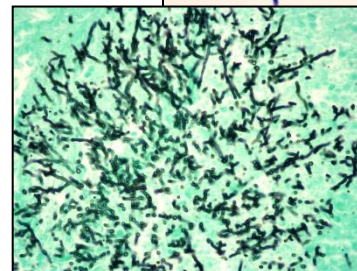
- Colorazione di **Gram**

per la ricerca dei batteri gram +



- Colorazione di **Grocott**

per la ricerca di funghi



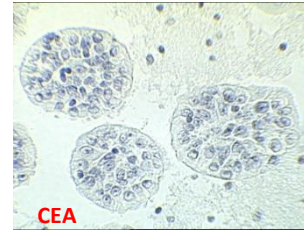
Tecniche complementari

ICC

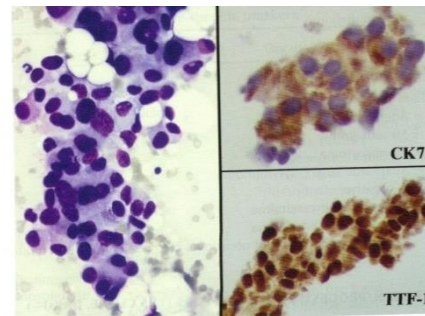
L'**immunocitochimica** è una particolare colorazione che consente di evidenziare morfologicamente la **localizzazione di** uno o più **antigeni cellulari mediante l'uso di appropriati anticorpi**

ICC

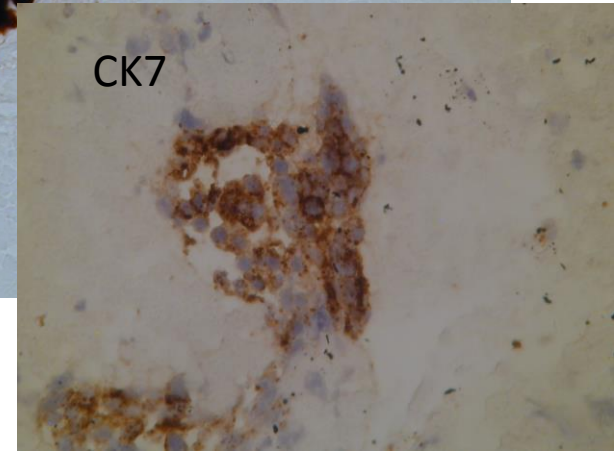
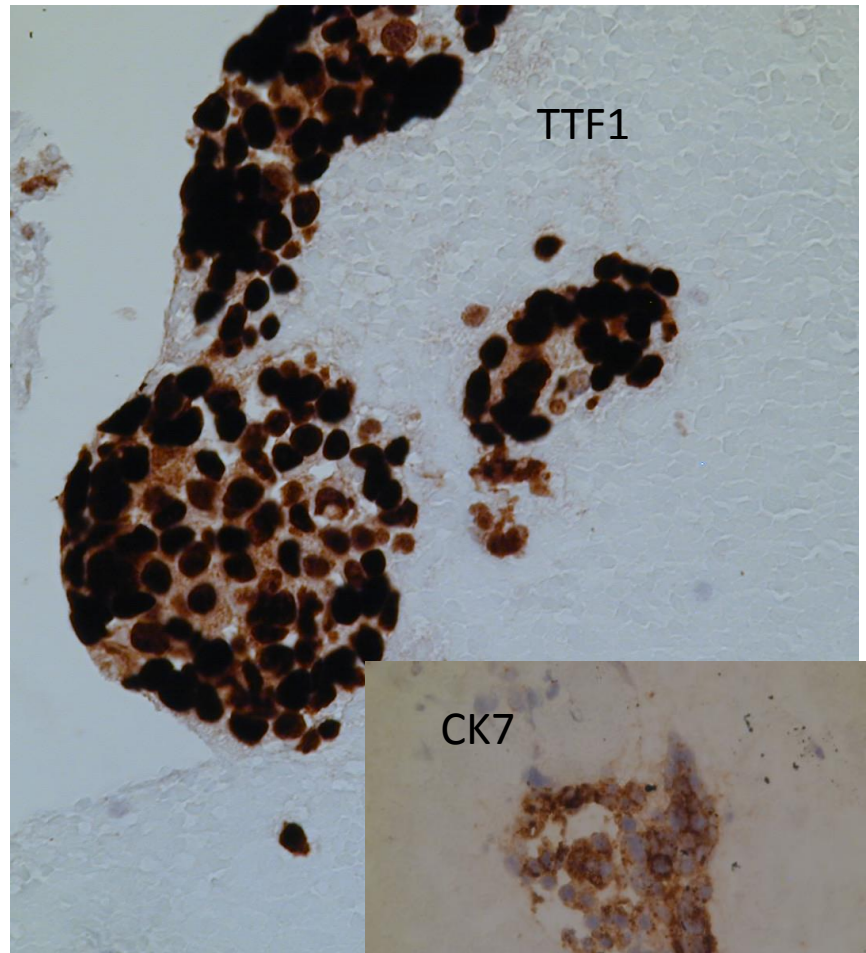
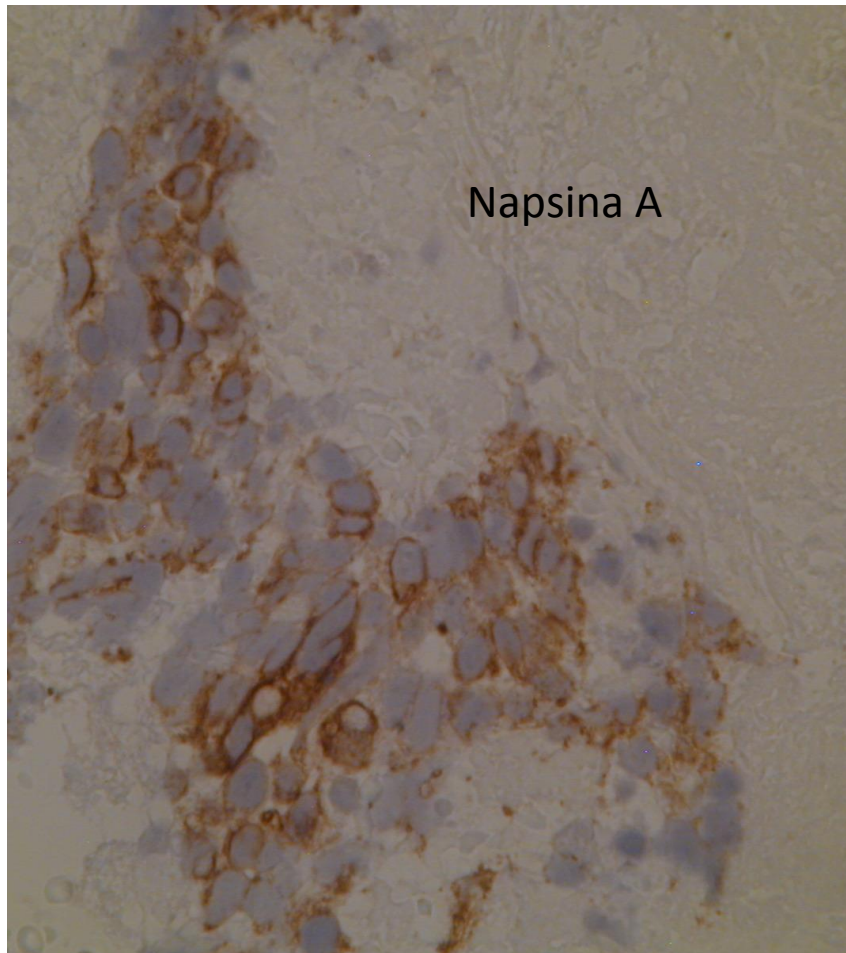
- Discriminare l'istotipo cellulare
 - cellule epiteliali/mesoteliali nei versamenti



- Tipizzare l'origine delle neoplasie



Tipizzare le neoplasie

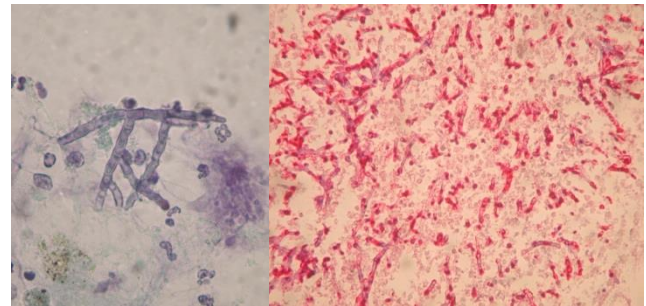
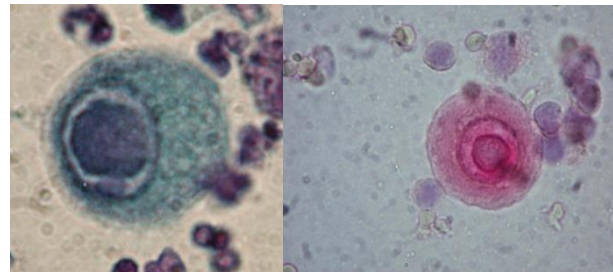


ICC

➤ Identificare agenti patogeni

- *CMV*

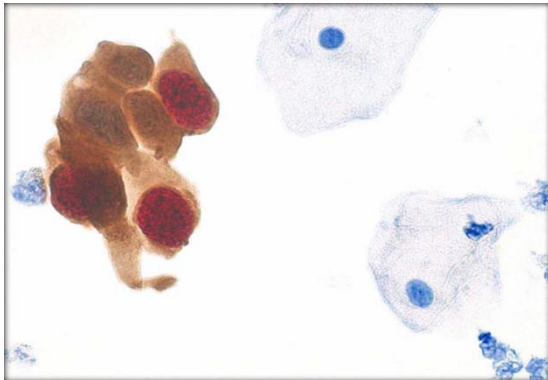
- *aspergillo*



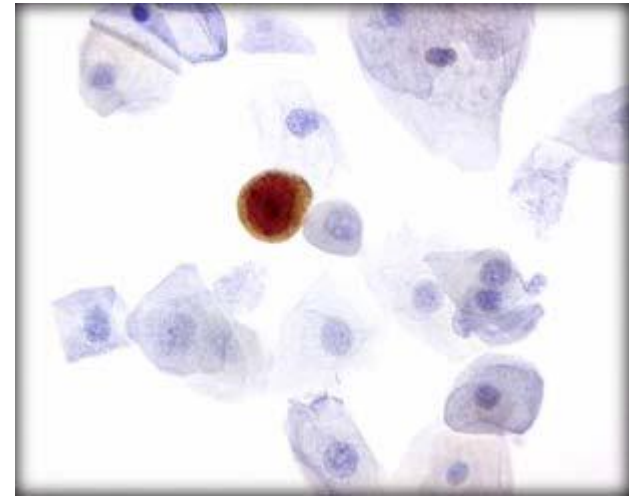
ICC

- Fornire informazioni
sull'evoluzione di una lesione

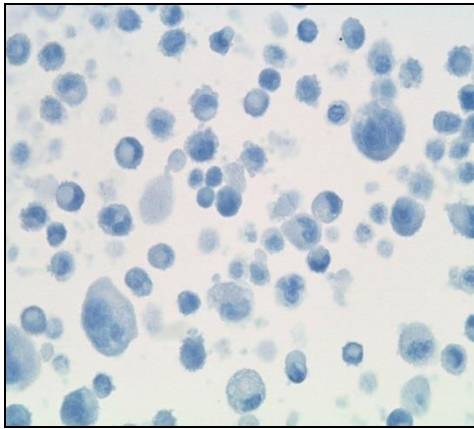
- *Pap-test*



**Cellula con doppia
Colorazione
P16/Ki67**



**Cluster di cellule con doppia colorazione
Co-espressione è segnale di deregolazione cellulare
quindi **rischio elevato di progressione****

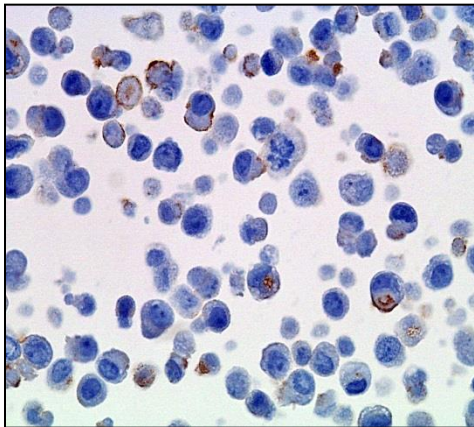


Score 0

21'600 copie

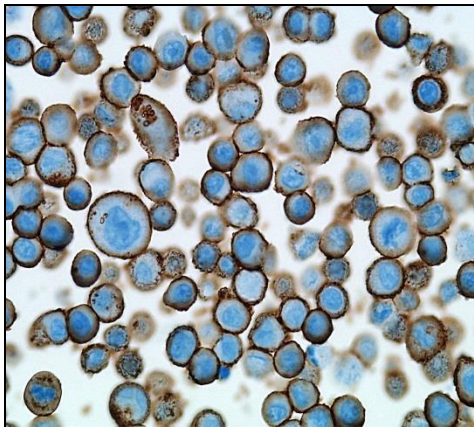
➤ Fornire informazioni

sulla risposta a una terapia in base alla presenza di recettori specifici



Score 1

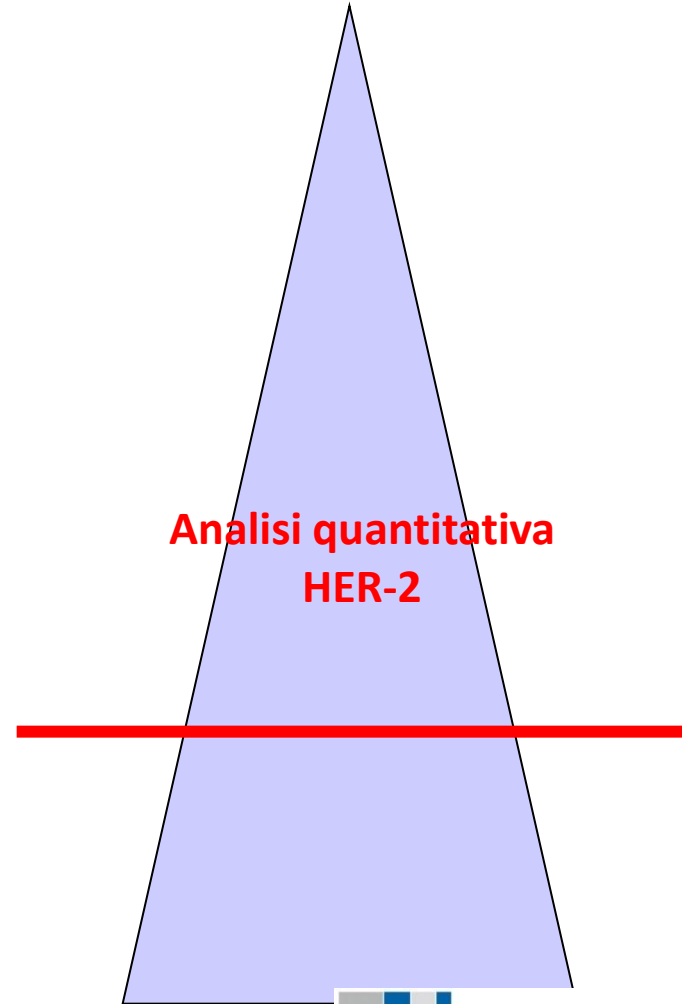
92'400 copie



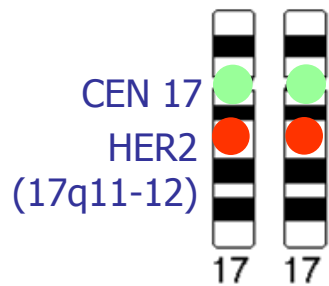
Score 3

2'390'000 copie

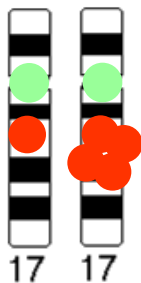
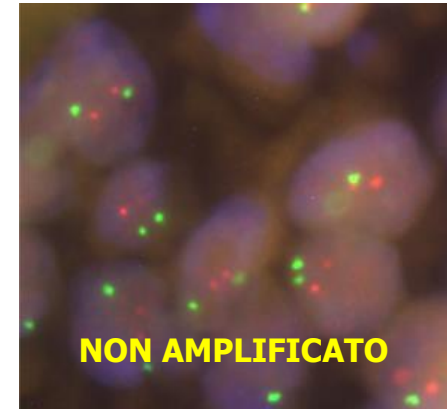
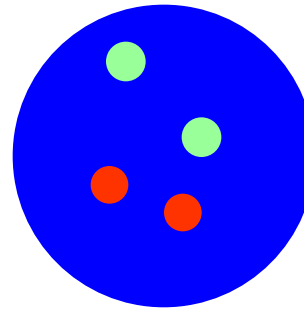
**Analisi quantitativa
HER-2**



Tecniche complementari: FISH

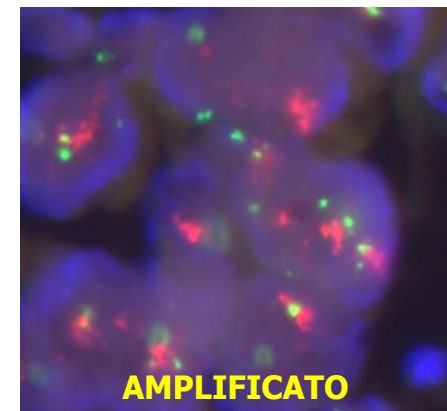
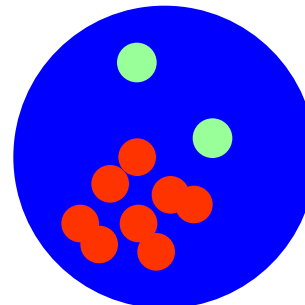


$$\text{HER2/CEN17} < 2$$



$$\text{HER2/CEN17} > 2$$

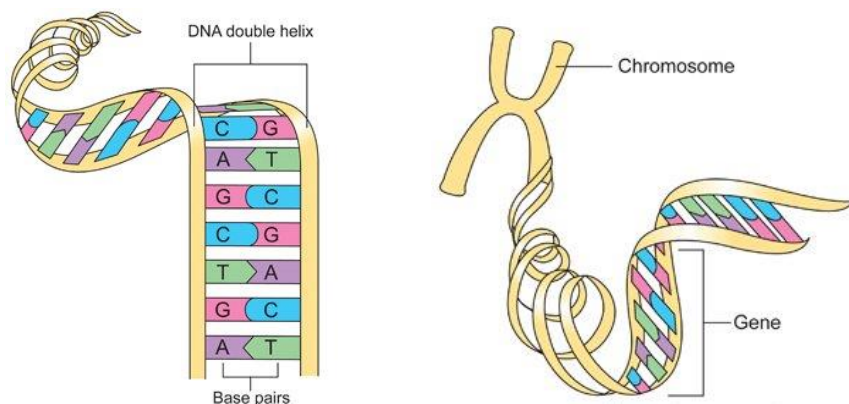
$$R = 4$$



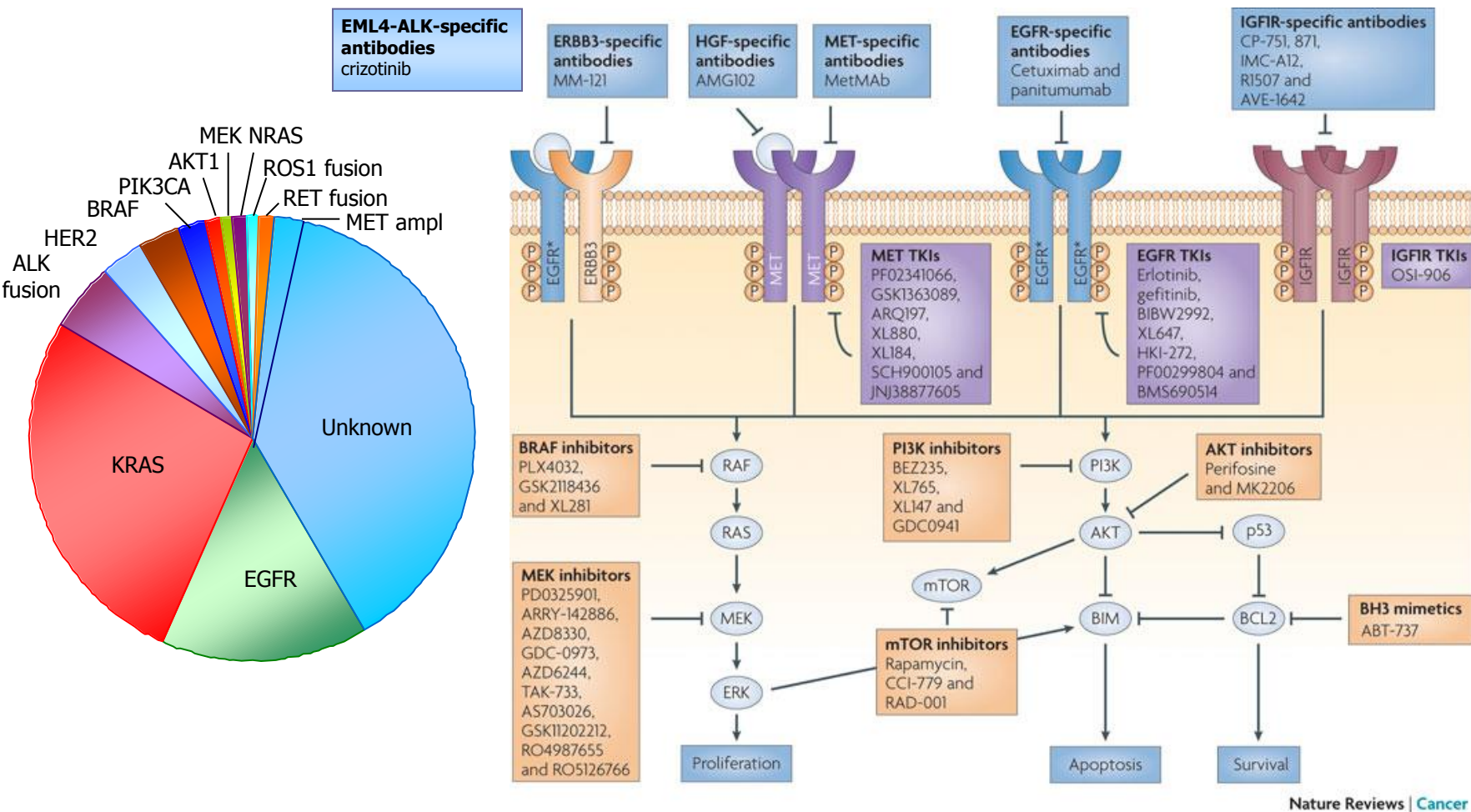
Tecniche complementari

➤ PCR - Estrazione Amplificazione e Sequenziamento del DNA

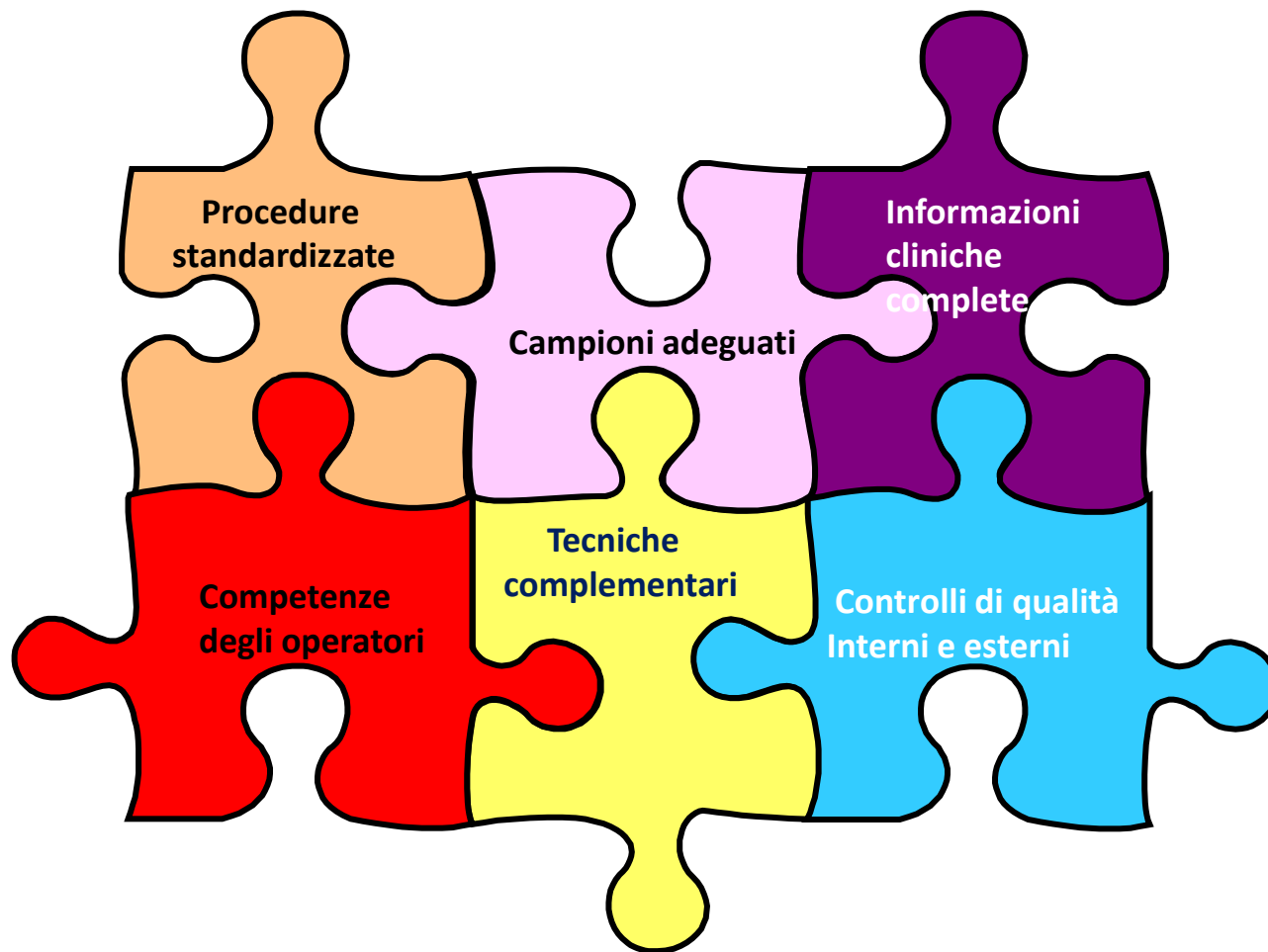
- *Ricerca di mutazioni cromosomiche*
Analisi di alterazioni molecolari per diagnosi e terapie target
- *Ricerca e tipizzazione di virus HPV*
Screening del carcinoma della cervice uterina
- *Ricerca di CT e NG nei prelievi cervicali (pap-test)*



ADK polmonare: alterazioni molecolari e terapie target



Nature Reviews | Cancer



aumentano l'accuratezza diagnostica!