

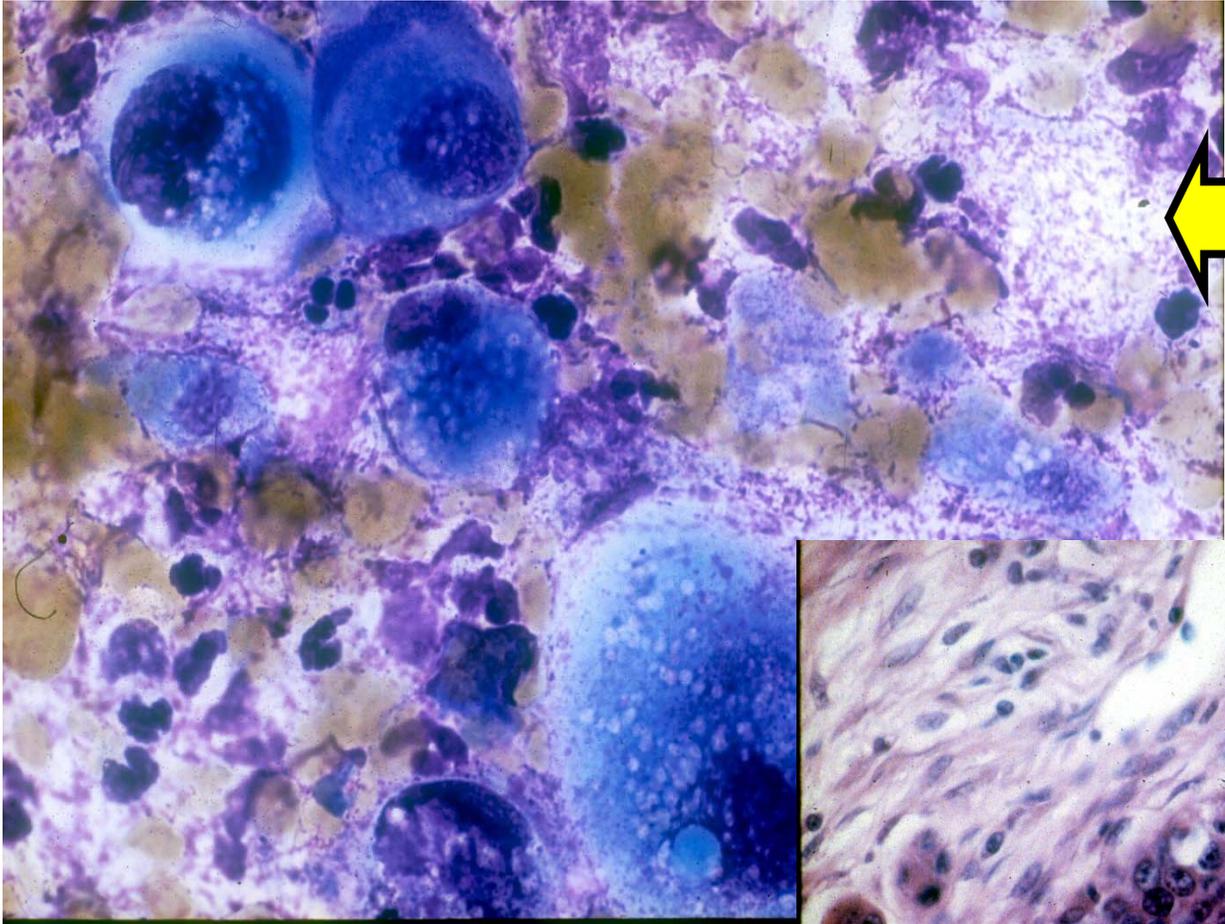
Seminario regionale SCIVAC – Moncalieri 16 giugno 2019

La citologia: manuale per l'uso di un mezzo potente

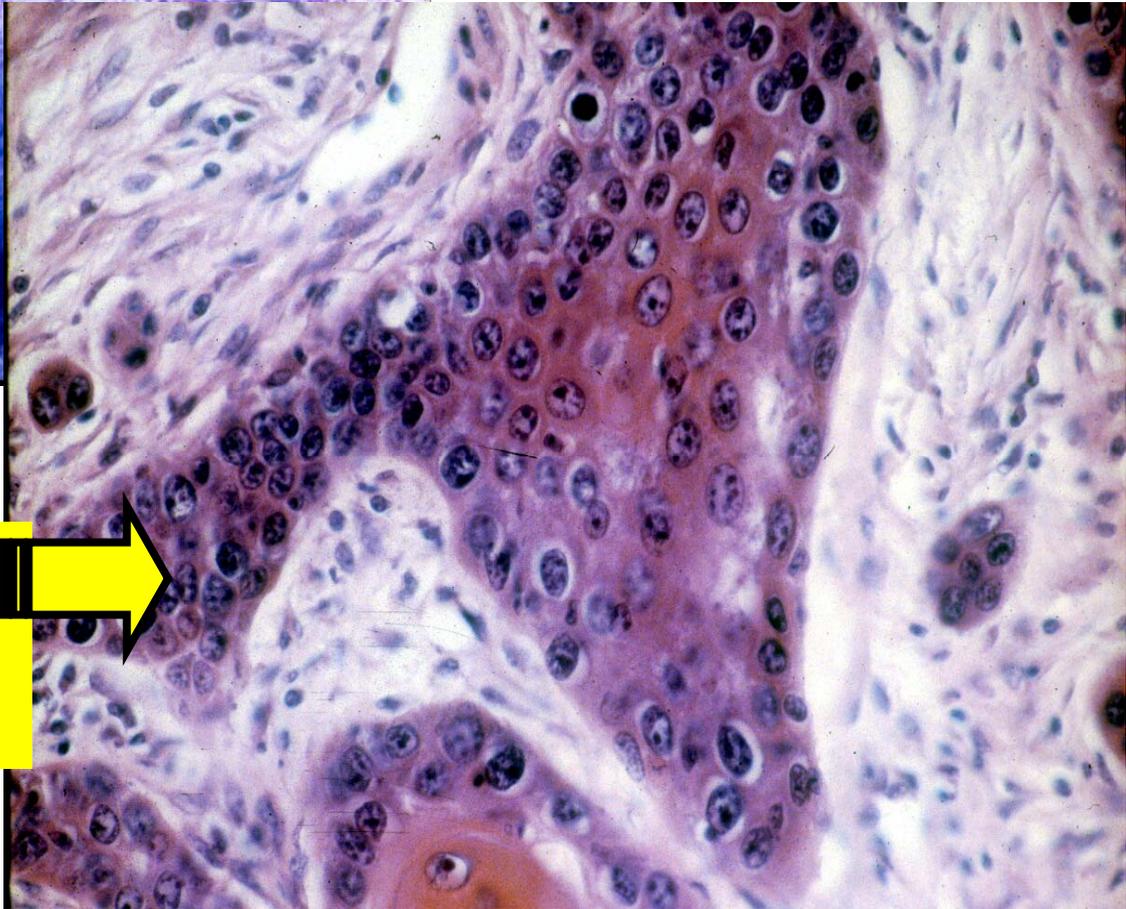


Mario Caniatti DVM, Dipl ECVP – mario.caniatti@unimi.it

Università degli Studi di Milano - Dipartimento di Medicina Veterinaria (DiMeVet)



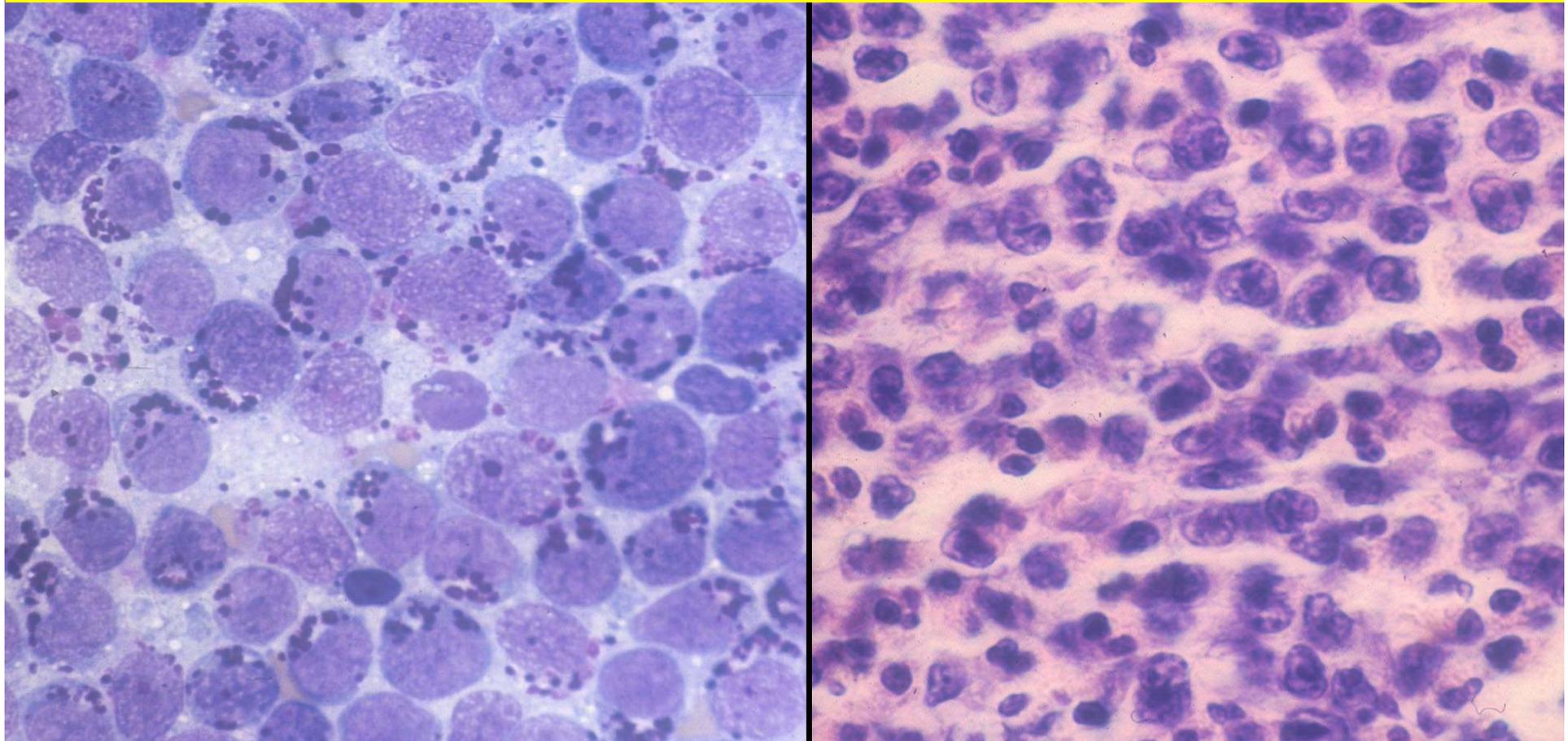
**Citologia= ottima
morfologia**



**Istologia= Buona
morfologia+struttura
(es. grado, margini...)**

L'istologia ha capacità diagnostiche superiori alla citologia perchè valuta più materia ma soprattutto perchè in istologia è conservata l'architettura del tessuto. Questo è importantissimo per le forme neoplastiche in cui il dato più importante è la definizione della pulizia dei margini di escissione.

La citologia in alcuni casi ha una superiorità diagnostica dovuta al maggiore dettaglio. Tipico è il caso delle neoplasie a cellule rotonde (foto sotto in cui la citologia evidenzia i granuli citoplasmatici di un linfoma dei linfociti granulari. Tali granuli non sono visibili in istologia)



Citologia diagnostica

- **LIMITI**

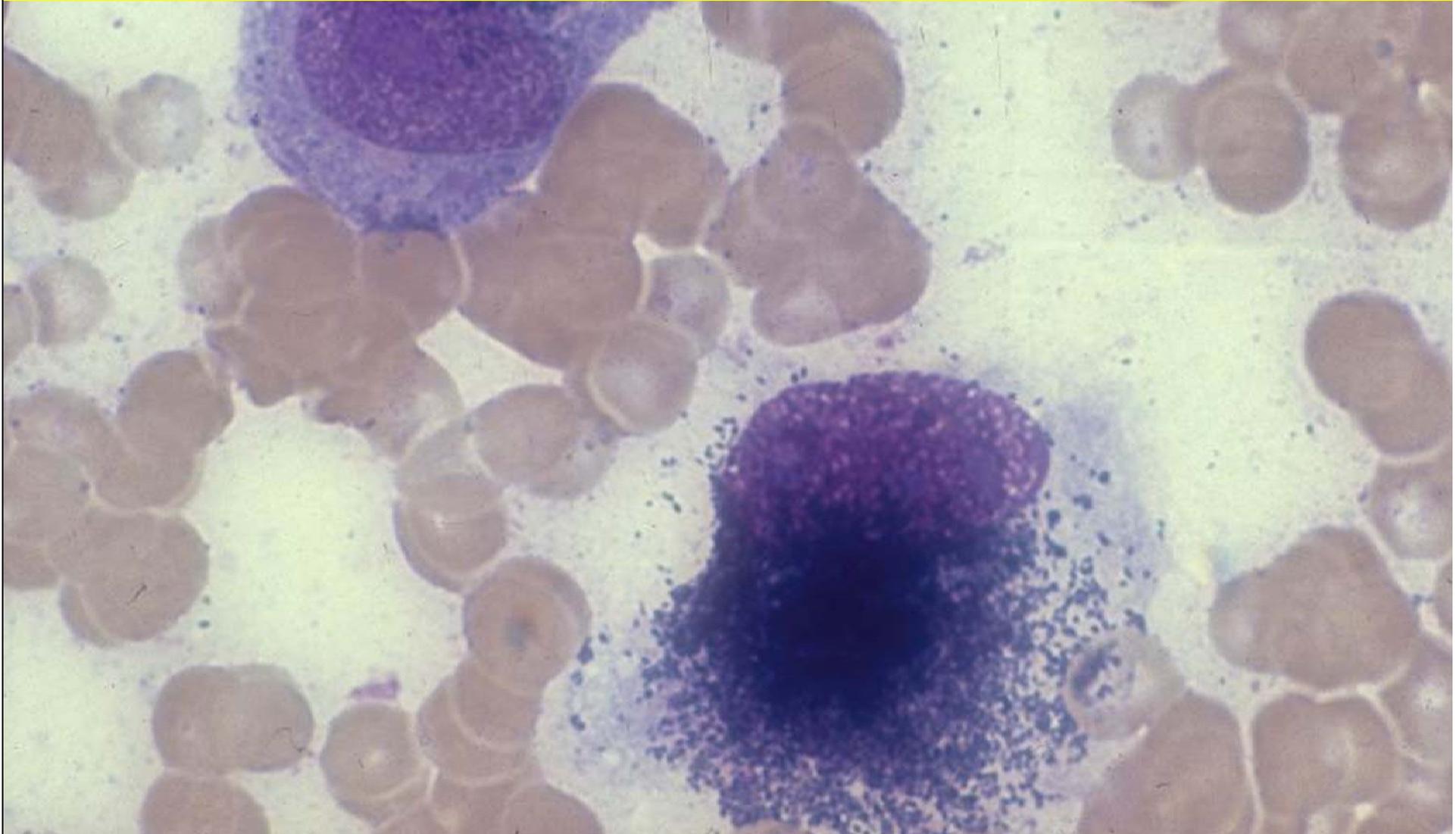
***sensibilità:** moderata in quanto il campione è piccolo e viene persa l'architettura del tessuto)

*** patologia clinica**

***tumori (+) classificazione (+/-)**

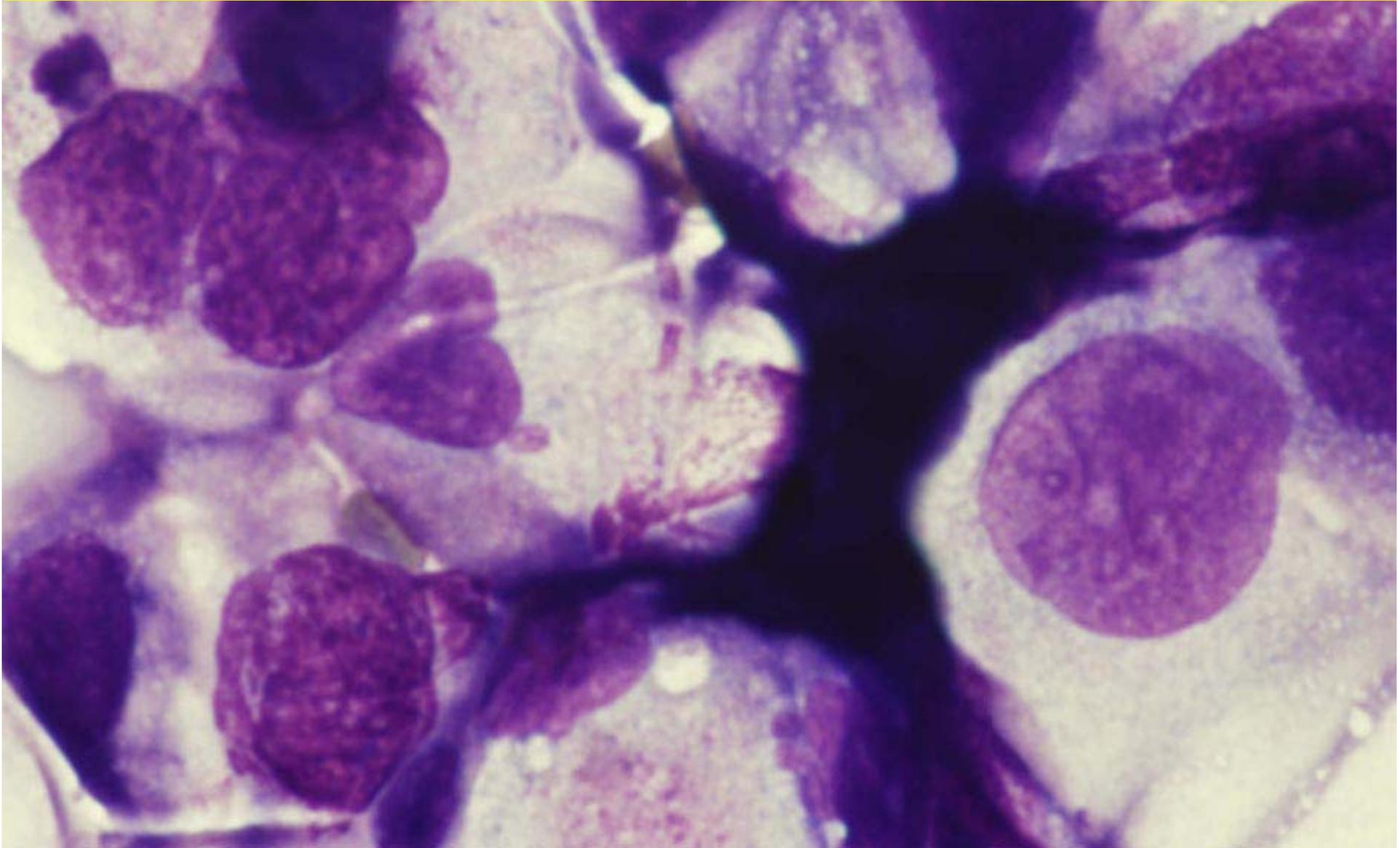
Patologia clinica

Conoscere il dato clinico è importante per la diagnosi e spesso per la prognosi (nel caso specific, nel cane una neoplasia dei melanociti ha diversa prognosi se si sviluppa nel cavo orale o in una qualsiasi sede cutanea che non sia quella digitale.



Tumori (diagnosi vs. classificazione)

Più un tumore è citologicamente maligno e più sarà facile diagnosticarlo come tale, ma spesso è più difficile definirne la precisa origine da un tipo cellulare



Pericoli

***Traumi:** possibili, ma rari

***Induzione di metastasi:** possibile, ma rarissimo

***Errori (FP/FN):** errori sono sempre possibili come in tutte le attività diagnostiche. Errori “Falsi Positivi” non sono ammessi (sono errori del citologo), mentre quelli “Falsi Negativi” sono considerati limiti di questa tecnica diagnostica. Questo vale per tutte le tecniche diagnostiche.



FALSI POSITIVI:

- **Non devono capitare, ma capitano con particolare frequenza in caso**

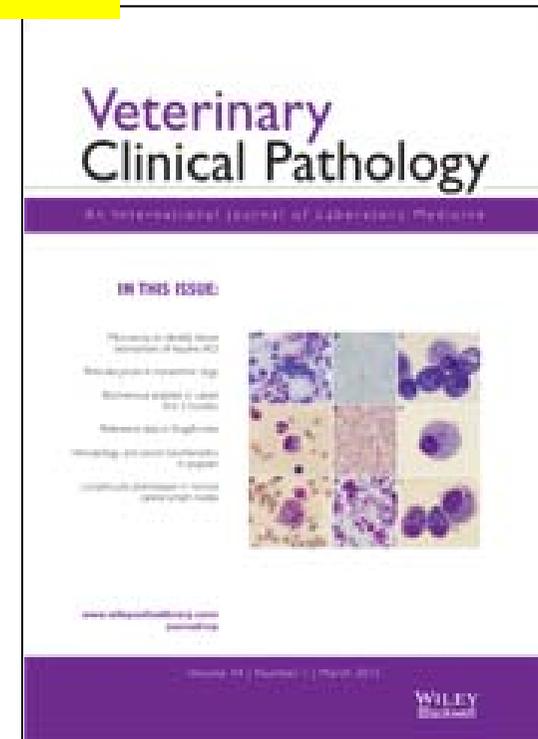
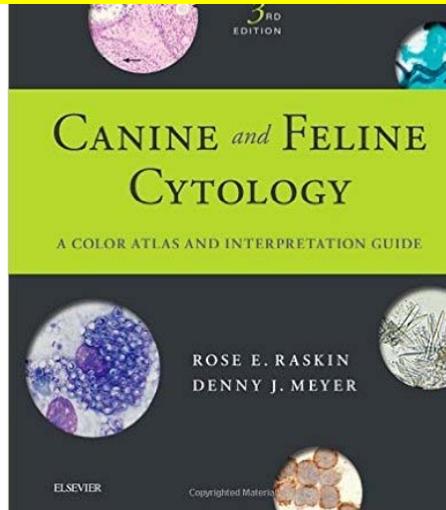
di:

1- Versamenti

2- Fibroplasia reattiva

Per non sbagliare sono importanti:

Preparazione -Studio



Cornell University College of Veterinary Medicine
ECLINPATH
leave the textbook.

Esperienza

- Casistica
- Controllo delle diagnosi
(follow-up, istologia)

Prelievo



APPOSIZIONE: si può eseguire su frammenti bioptici lavorando su una sezione di taglio fresca, oppure su lesioni cutanee ulcerate

SCARIFICAZIONE/RASCHIATO: si può eseguire su frammenti bioptici lavorando su una sezione di taglio fresca, oppure su lesioni cutanee ulcerate



PRELIEVO CON AGO: si può eseguire sia con una tecnica che prevede l'uso di una siringa che esegue una pressione negativa (agoaspirato), sia utilizzando solo l'ago (agoinfissione o fine-needle capillary). In quest'ultimo caso la siringa va innestata solo per espellere (delicatamente) il materiale sul vetrino e poi strisciarlo





La siringa da usare varia con i «gusti» di chi esegue il prelievo



Aghi troppo grossi (es. 18-19G) non vanno bene. Di solito si usano aghi da 21-22G, ma si può arrivare a calibri molto piccoli (in umana per alcuni prelievi anche 28G)

E' sempre utile fare almeno 2-3 vetrini per ogni sede di prelievo. Infatti un vetro solo potrebbe rompersi o potremmo avere bisogno di colorazioni speciali



Sì!

~~NO!~~

LO STRISCIO IDEALE

Striscio ideale

**Striscio inadeguato:
si perdono cellule
sul fondo**

**Striscio linea: non bel-
da valutare, ma utile**

Testa

Corpo

Coda

morfologia

**gruppi/clusters, strutture voluminose,
parassiti**



Fissazione e colorazione

1-All'aria

**(colorazione tipo Romanowsky,
Nuovo blu di metilene)**

1- Alcool/cytospray

(Ematossilina-Eosina, Papanicolaou)

Poco o nulla usate in medicina veterinaria)

Colorazioni tipo Romanowsky o ematologiche.

Si chiamano così perché sono le colorazioni normalmente usate per gli strisci di sangue

1-Wright

2-May-Grünwald Giemsa

3-Giemsa

4-Leishman...

5-Colorazioni rapide:

Diff-Quik®

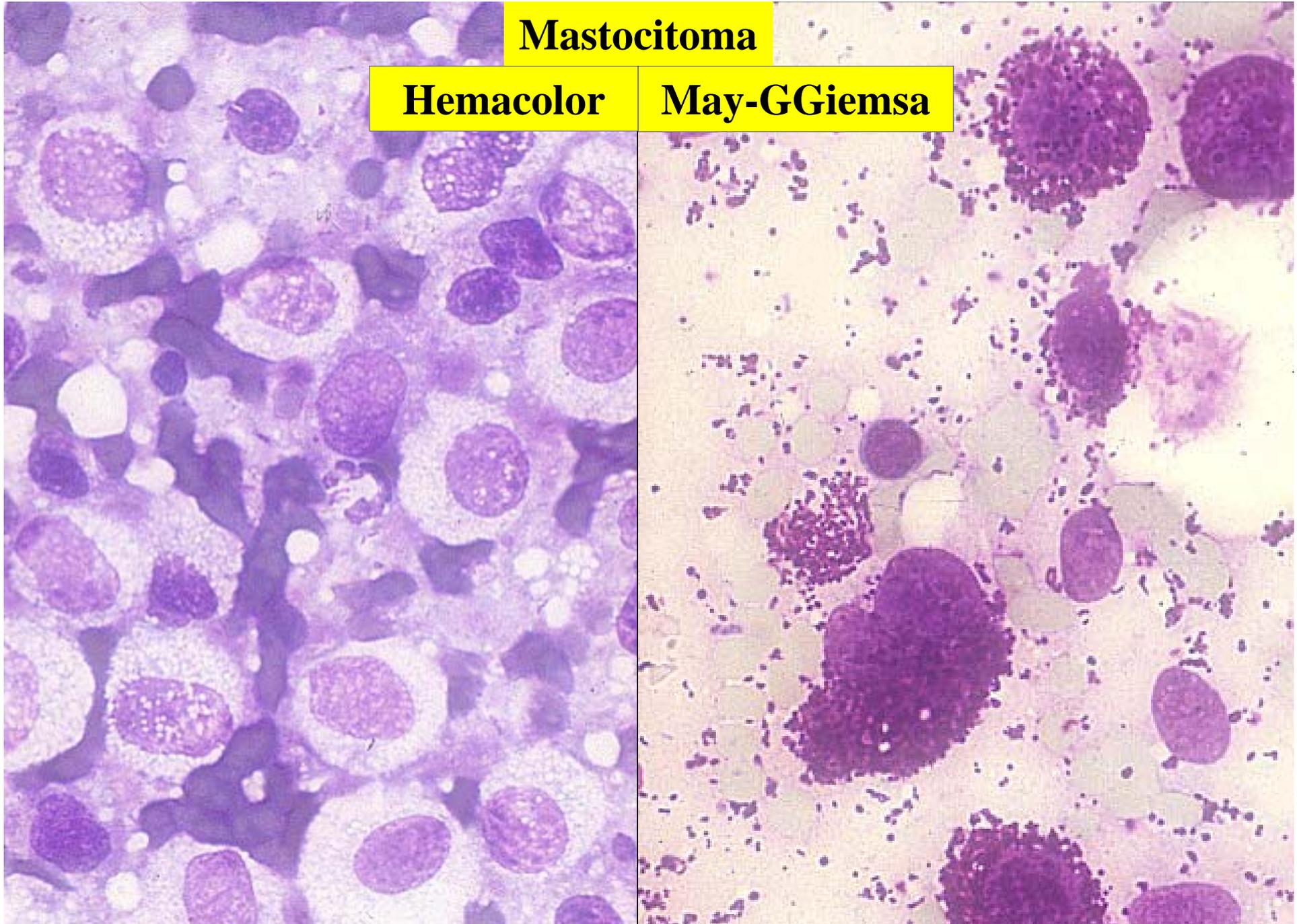
Hemacolor®



Mastocitoma

Hemacolor

May-GGiemsa



Le colorazioni rapide a volte colorano poco o nulla i granuli dei mastociti

Istochimica

Colorazioni speciali di tipo istochimico servono a mettere in luce alcune eziologie o sostanze:

-Ziehl-Neelsen: micobatteri acido-alcool resistenti

-PAS: miceti

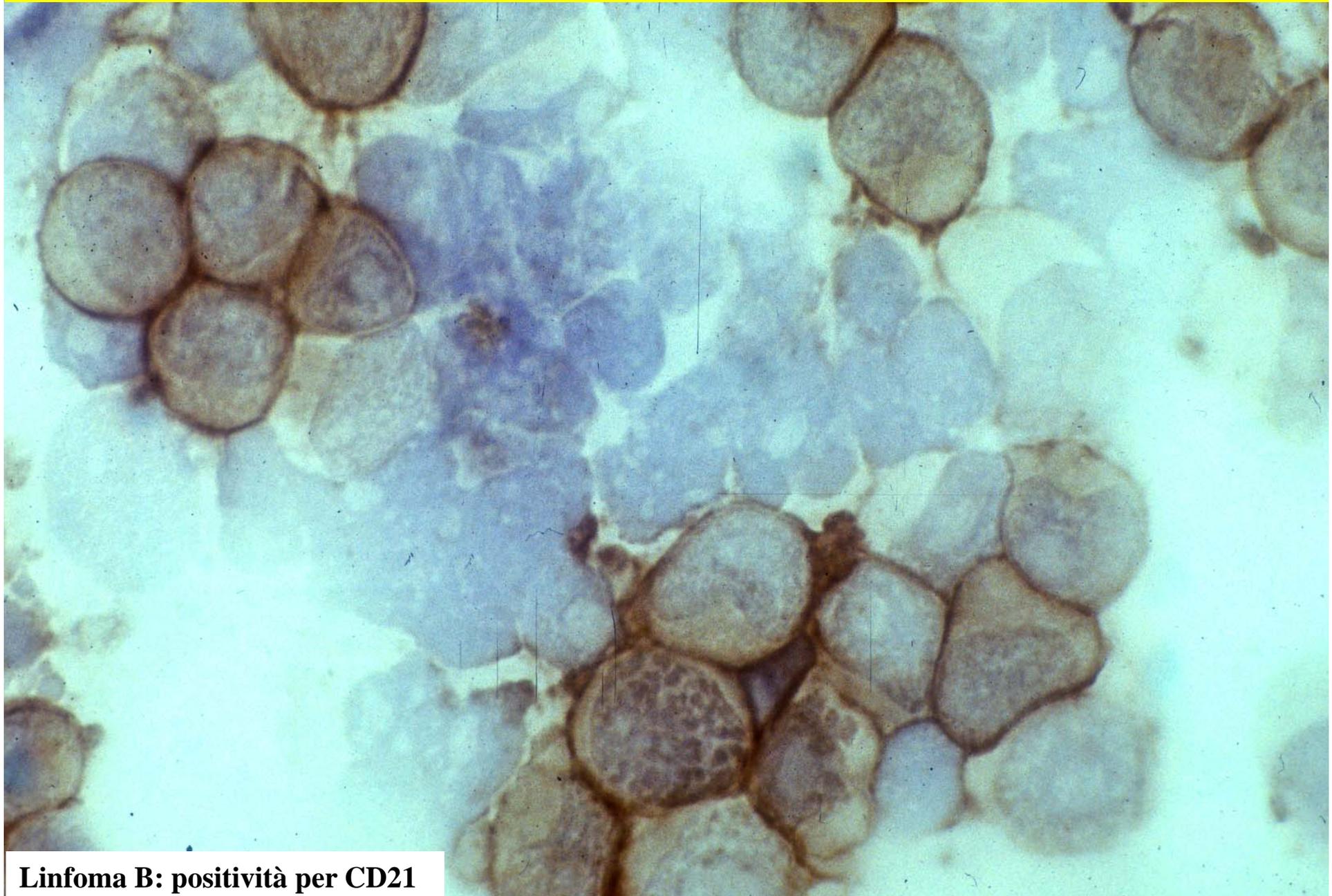
-Blu di Perls/Prussia: emosiderina

-Rosso Congo: amiloide

-...



Immunocitochimica: mette il luce antigeni della più varia natura (es. virali, batterici, tissutali ecc.). E' necessario avere un anticorpo adatto.



Linfoma B: positività per CD21

I pilastri dell'esame citologico

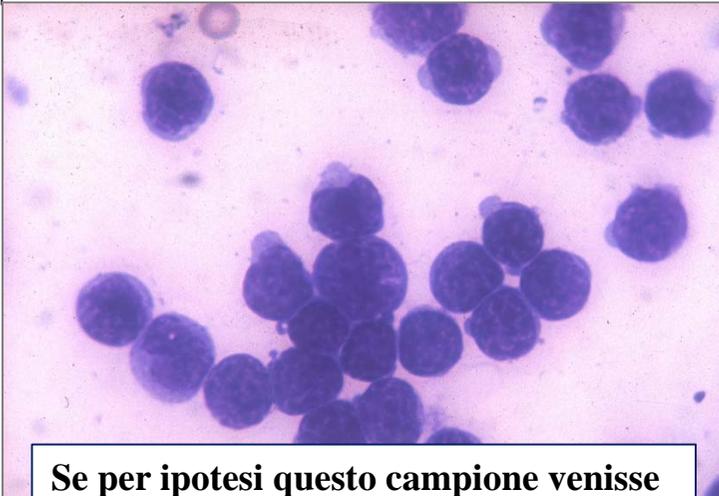
- 0- Cose da fare o sapere prima**
- 1- Indaga tutto il campione**
- 2- Valuta solo cellule intatte**
- 3- Basa la diagnosi su un numero adeguato di cellule**
- 4- Classifica le cellule**
- 5- Valuta la componente acellulare**
- 6- Riconosci gli artefatti**

0 - Cose da fare o sapere prima

Segnalamento e dati clinici

Carcinoma infiammatorio: il dato macroscopico è fondamentale

Sede e tecnica di prelievo



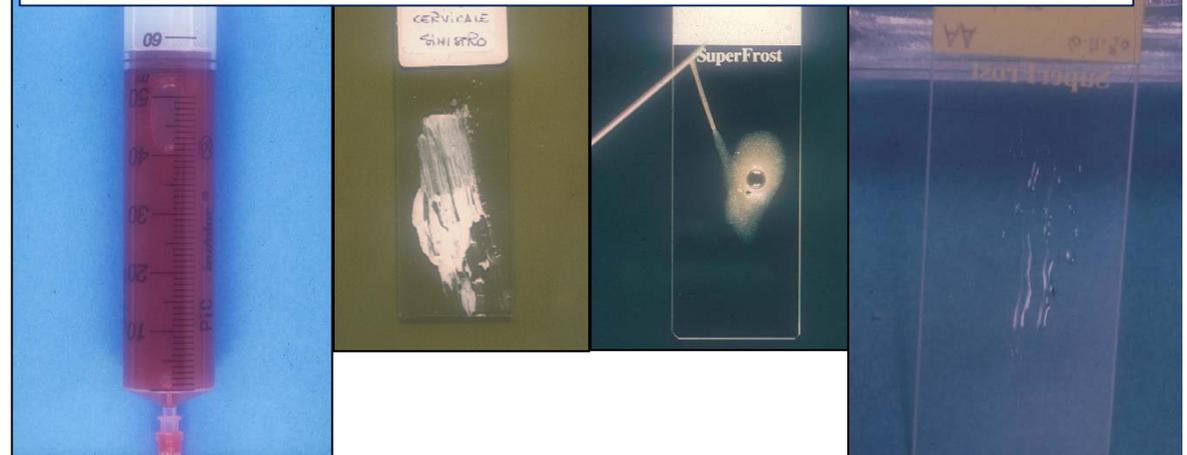
Se per ipotesi questo campione venisse da:

- Fegato= flogosi o neoplasia
- Linfonodo= forse normale
- Midollo osseo= neoplasia

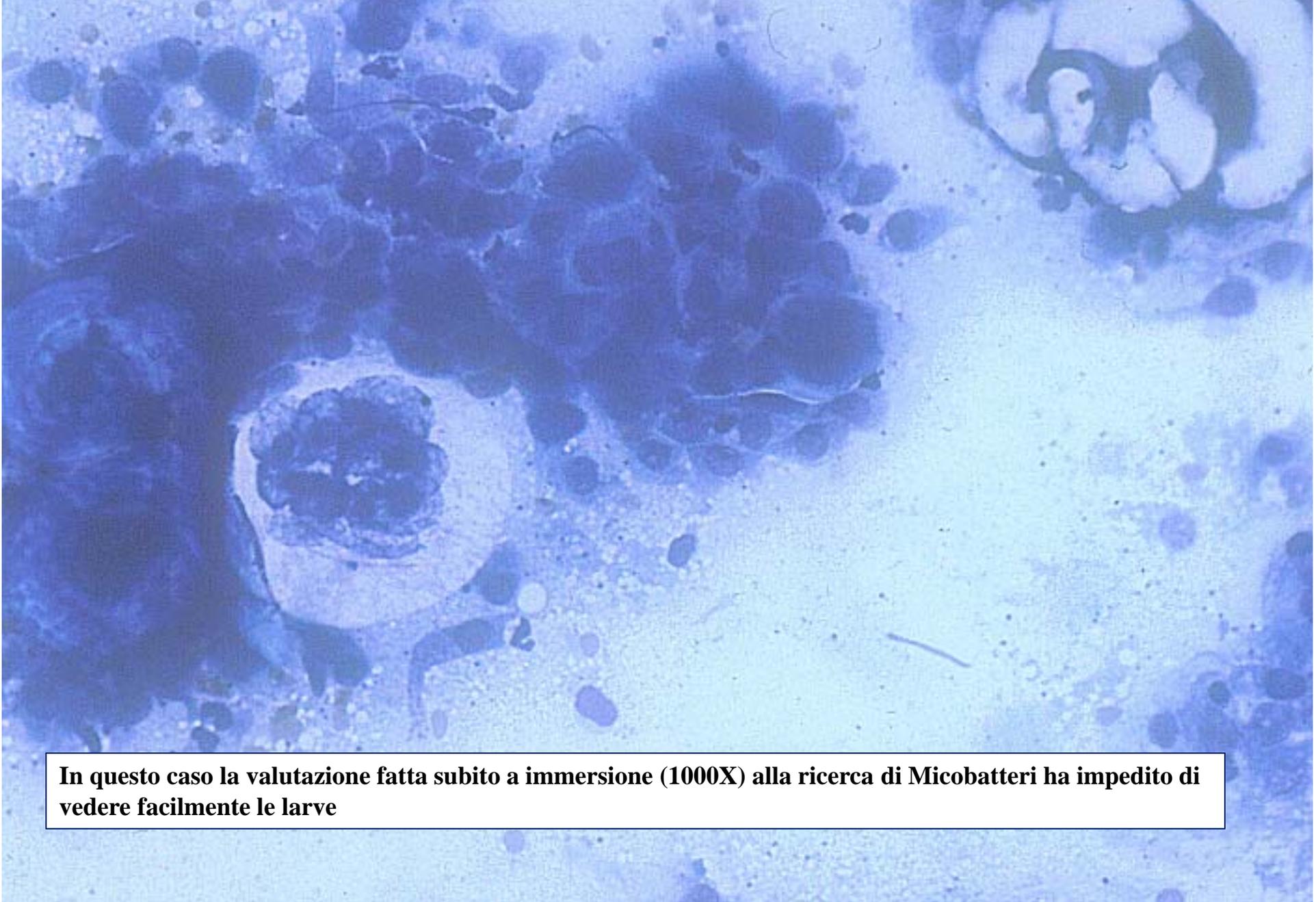


Esame macroscopico

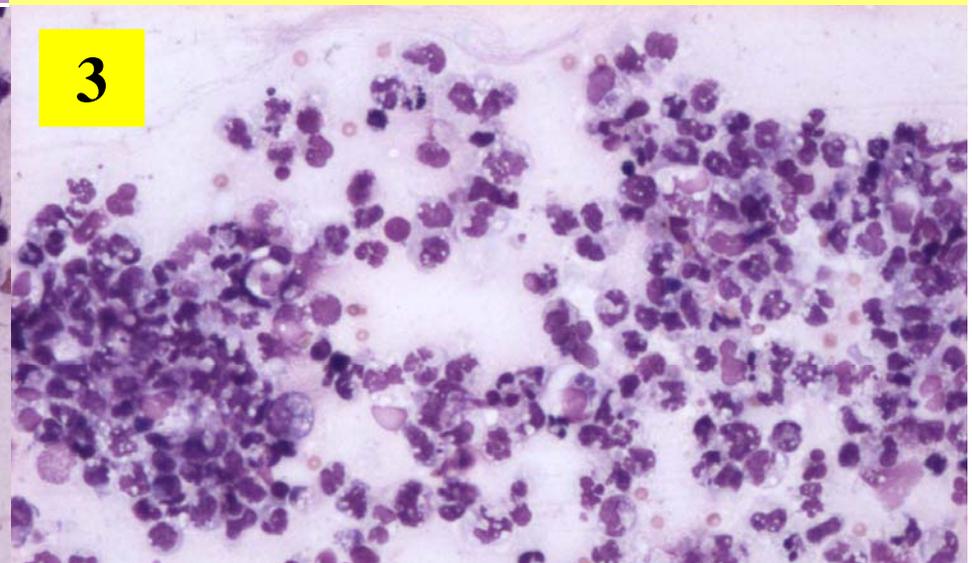
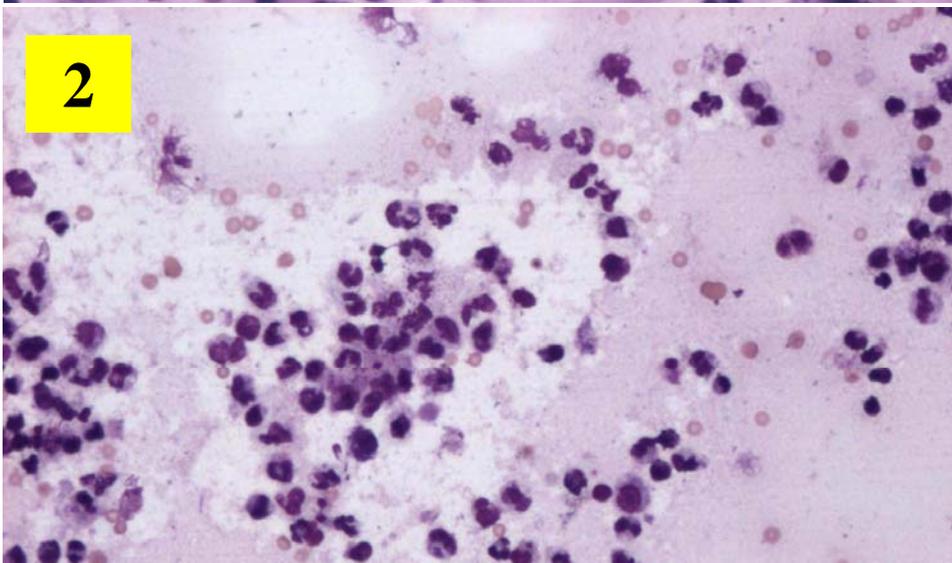
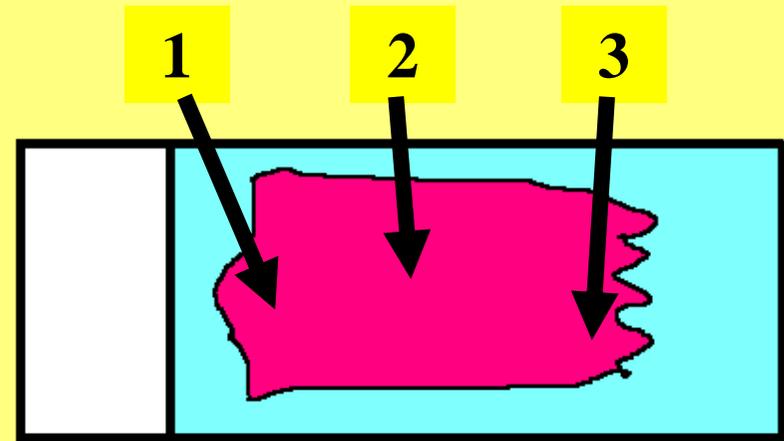
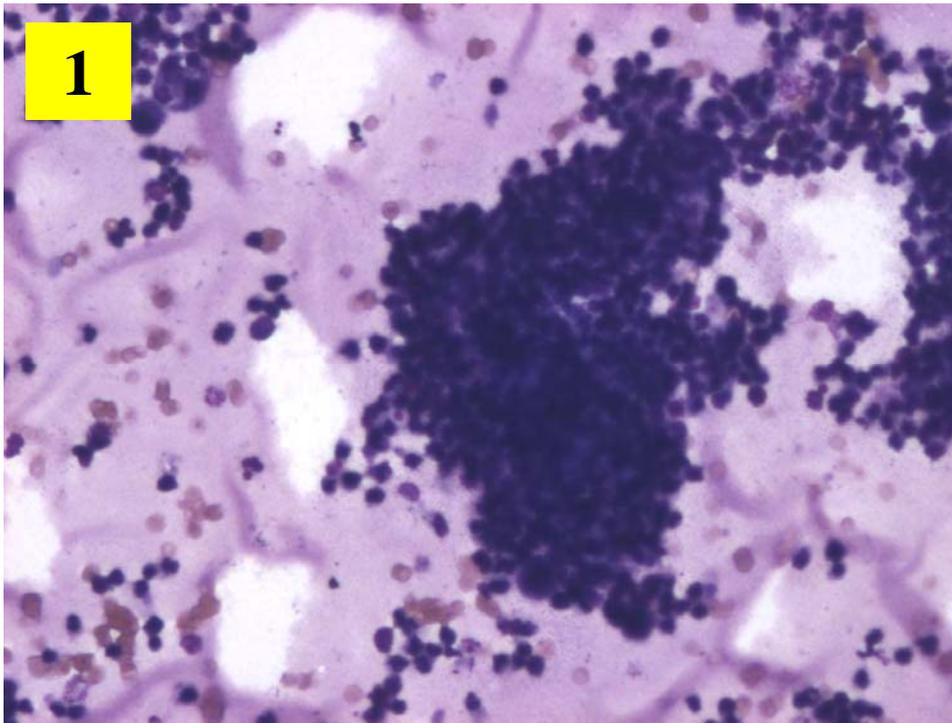
Fondamentale nei versamenti, ma non solo. Es. spesso i lipomi cedono lipidi, ma non adipociti > vetrino acellulare



1- Indaga tutto il campione... **NO IMMERSIONE!!!**



In questo caso la valutazione fatta subito a immersione (1000X) alla ricerca di Micobatteri ha impedito di vedere facilmente le larve



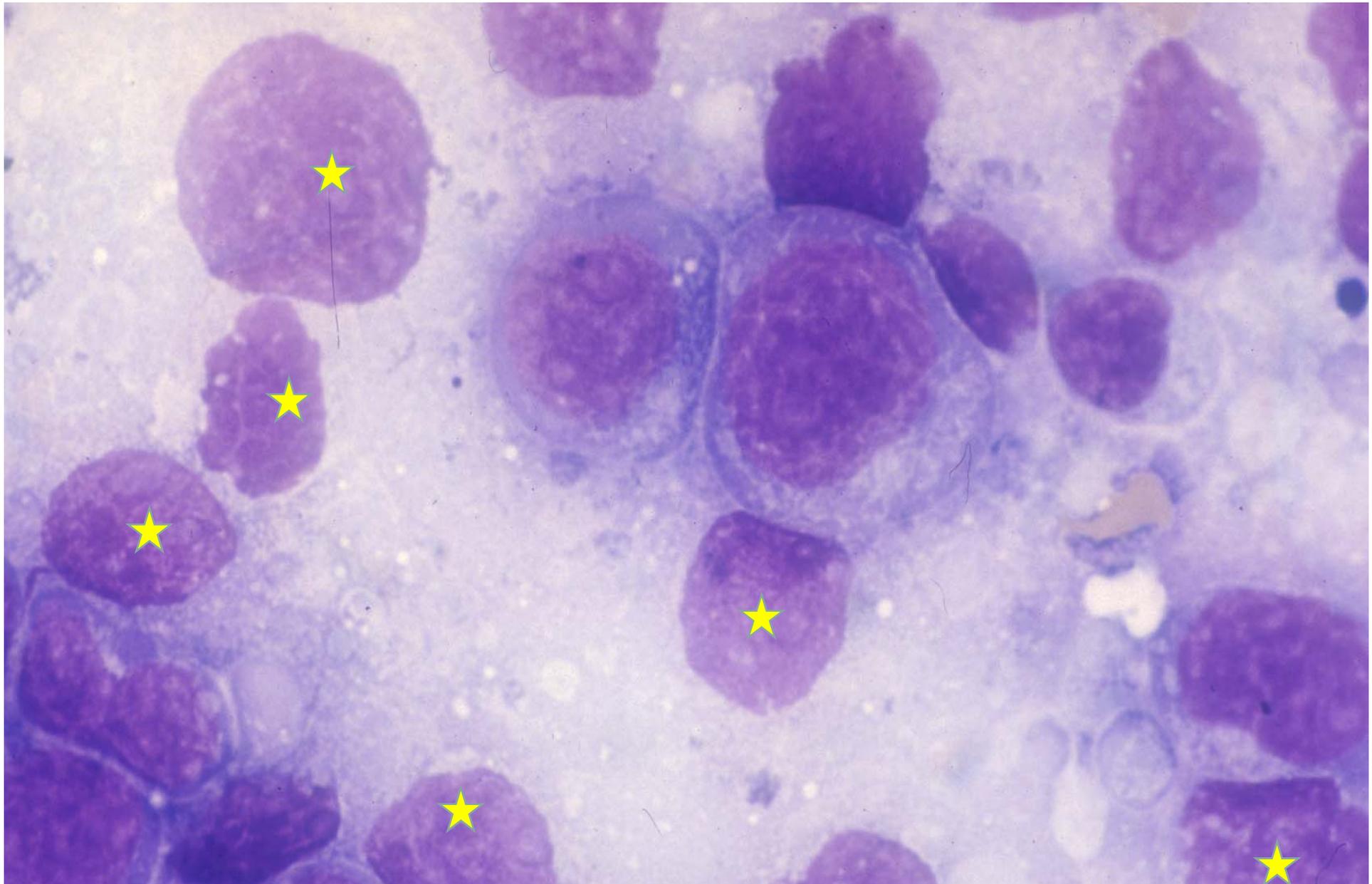
Versamento pleurico: valutare solo una parte del vetrino può far pensare a: (1) gruppi di cellule; oppure a (2) significativa presenza di linfociti. Si tratta di artefatti dovuti a lenta asciugatura del vetrino perché il campione era acquoso. Sul fondo dello striscio (3) si rileva la vera natura infiammatoria neutrofilica del campione

2- Valuta solo cellule intatte



“solo un pazzo interpreta un piatto di uova strapazzate”

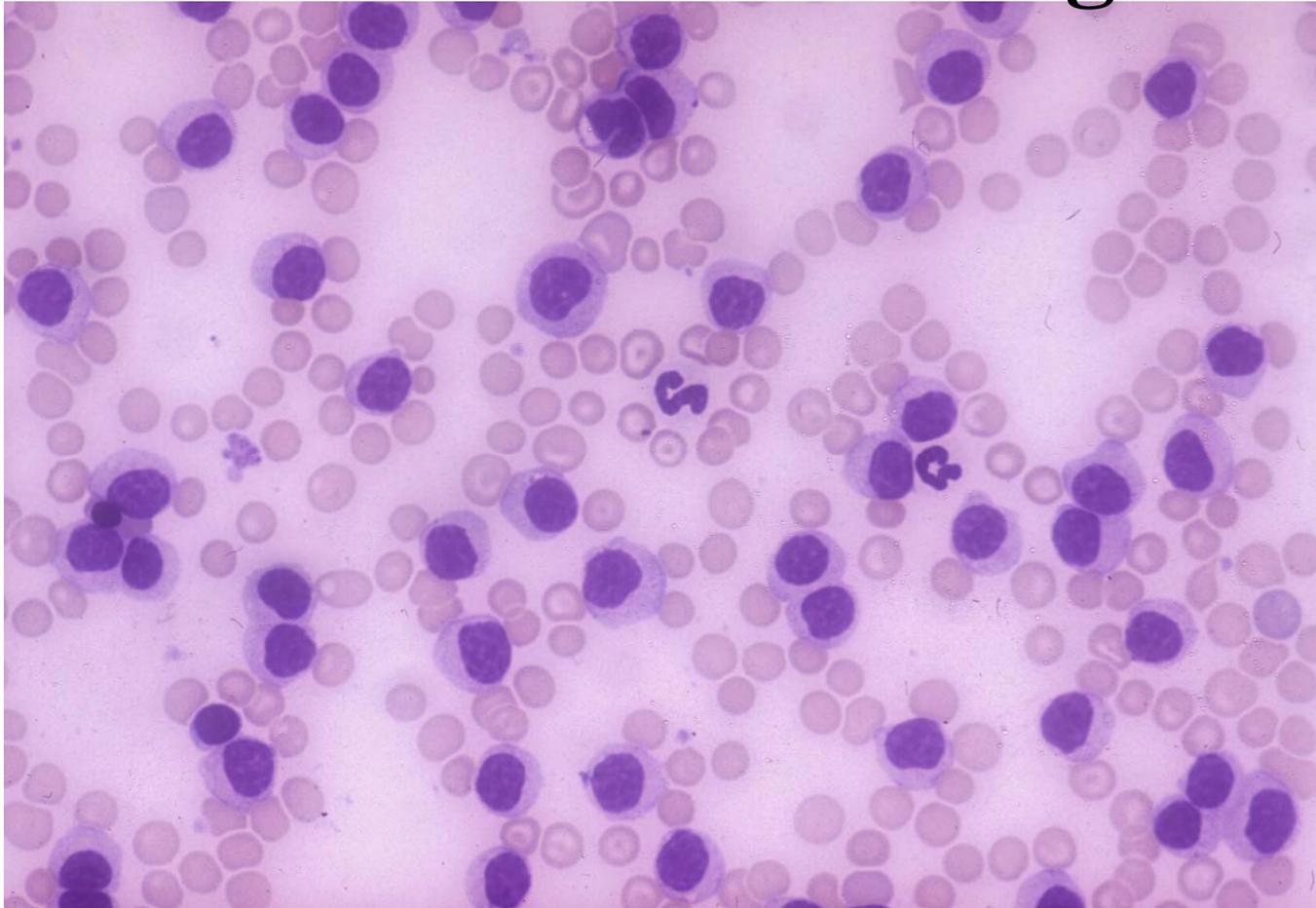
(Perman et al., 1979)



Nuclei nudi non vanno mai valutati. Si tratta di cellule rotte. Comuni nei prelievi da tessuto linfoide, ma anche in caso di ghiandole endocrine. Può essere un artefatto o in campioni strisciati con eccessiva forza.

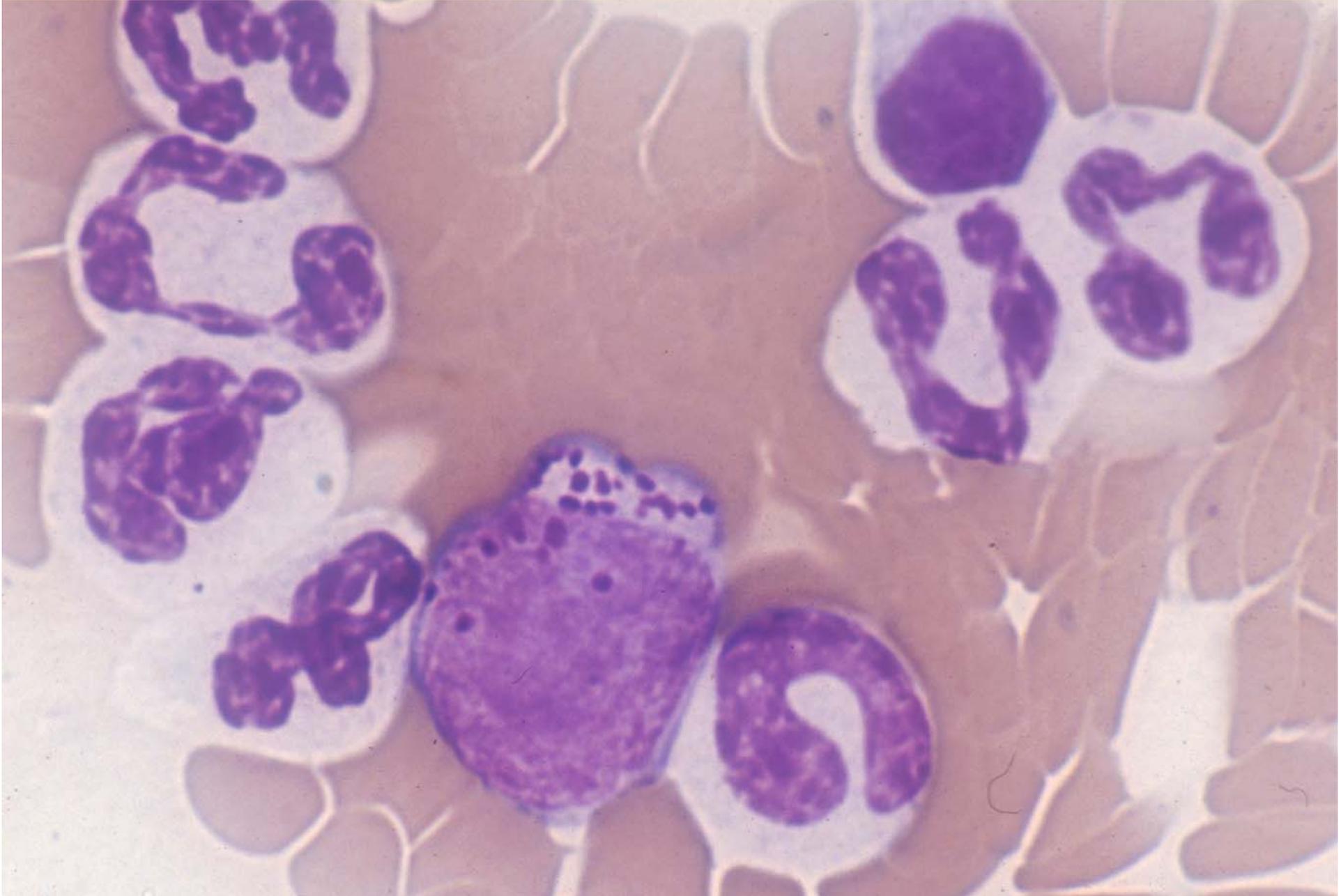
3- Basa la diagnosi su un numero adeguato di cellule

Buona cellularità = diagnosi



Dai sempre un giudizio: assente > scarsa > moderata > buona

La presenza di un linfocita granulare in uno striscio di sangue non significa che si sia di fronte a una forma neoplastica.



4- Classifica le cellule

1-normali

2-iperplastiche

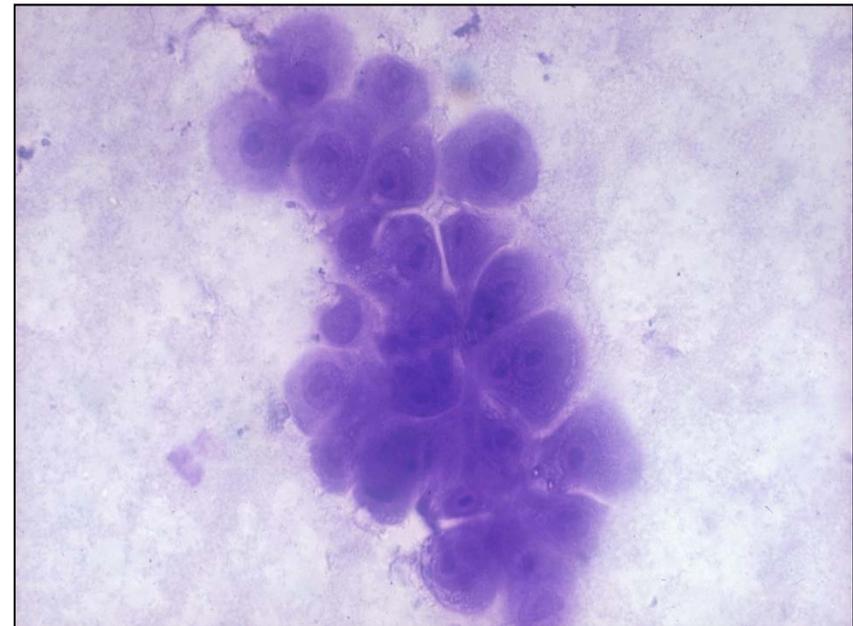
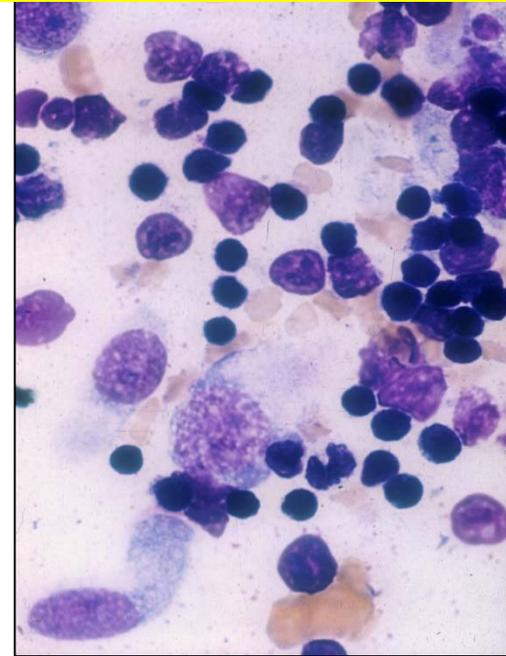
3-infiammatorie

4-neoplastiche

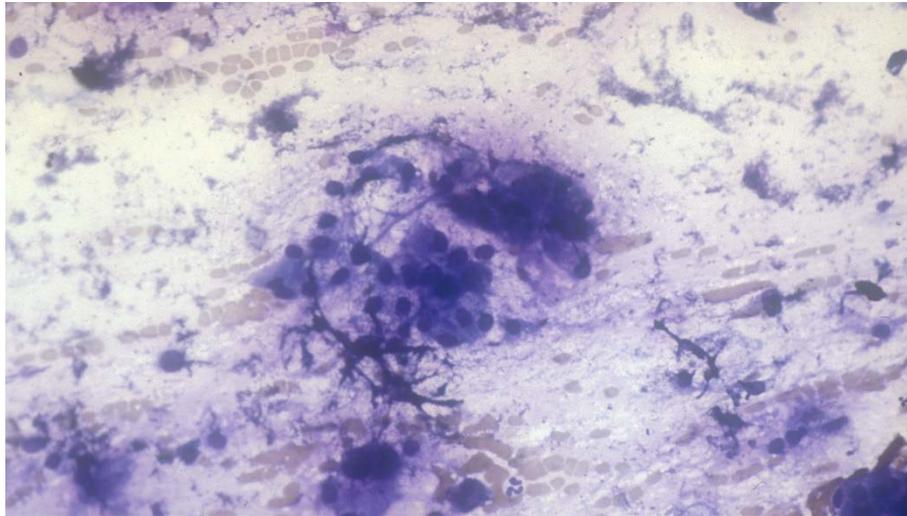
(benigne vs maligne)

5-miste

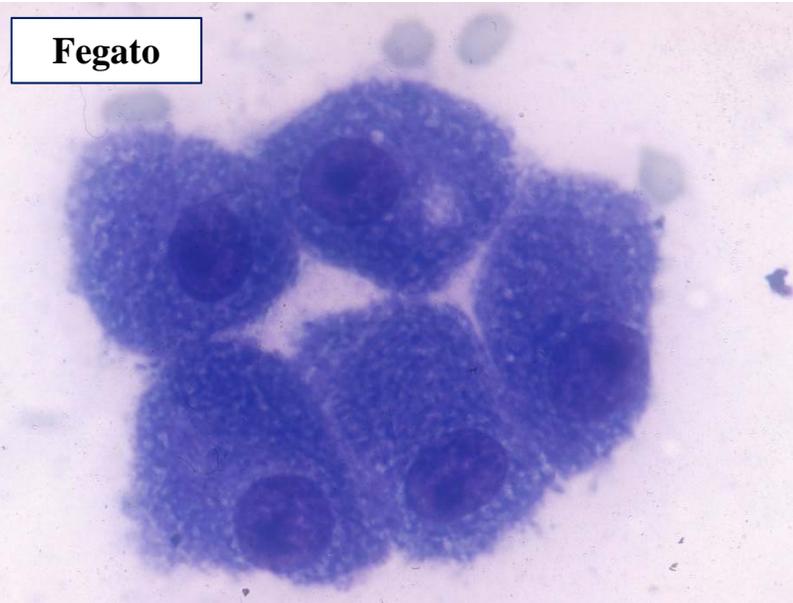
Questi i diversi tipi di cellule che si possono incontrare in un citologico



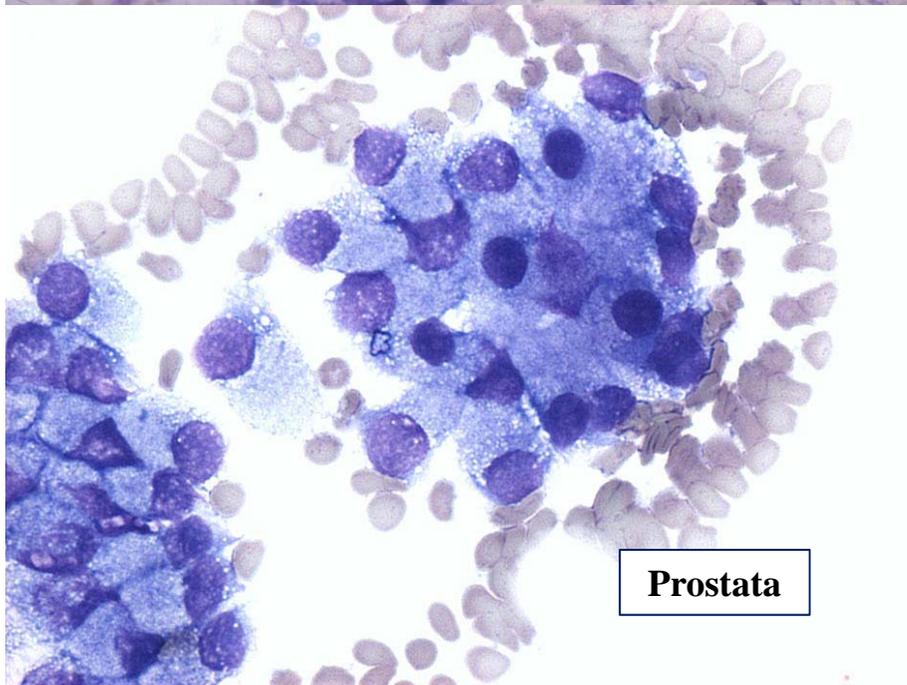
Cellule "normali " per una determinata sede



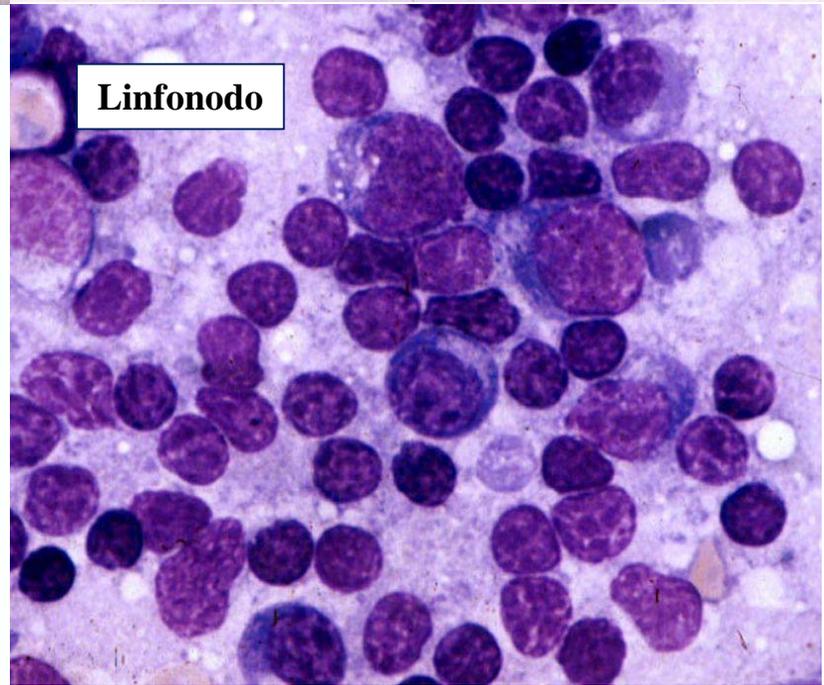
Ghiandola salivare. Spesso campionata come linfonodo



Fegato

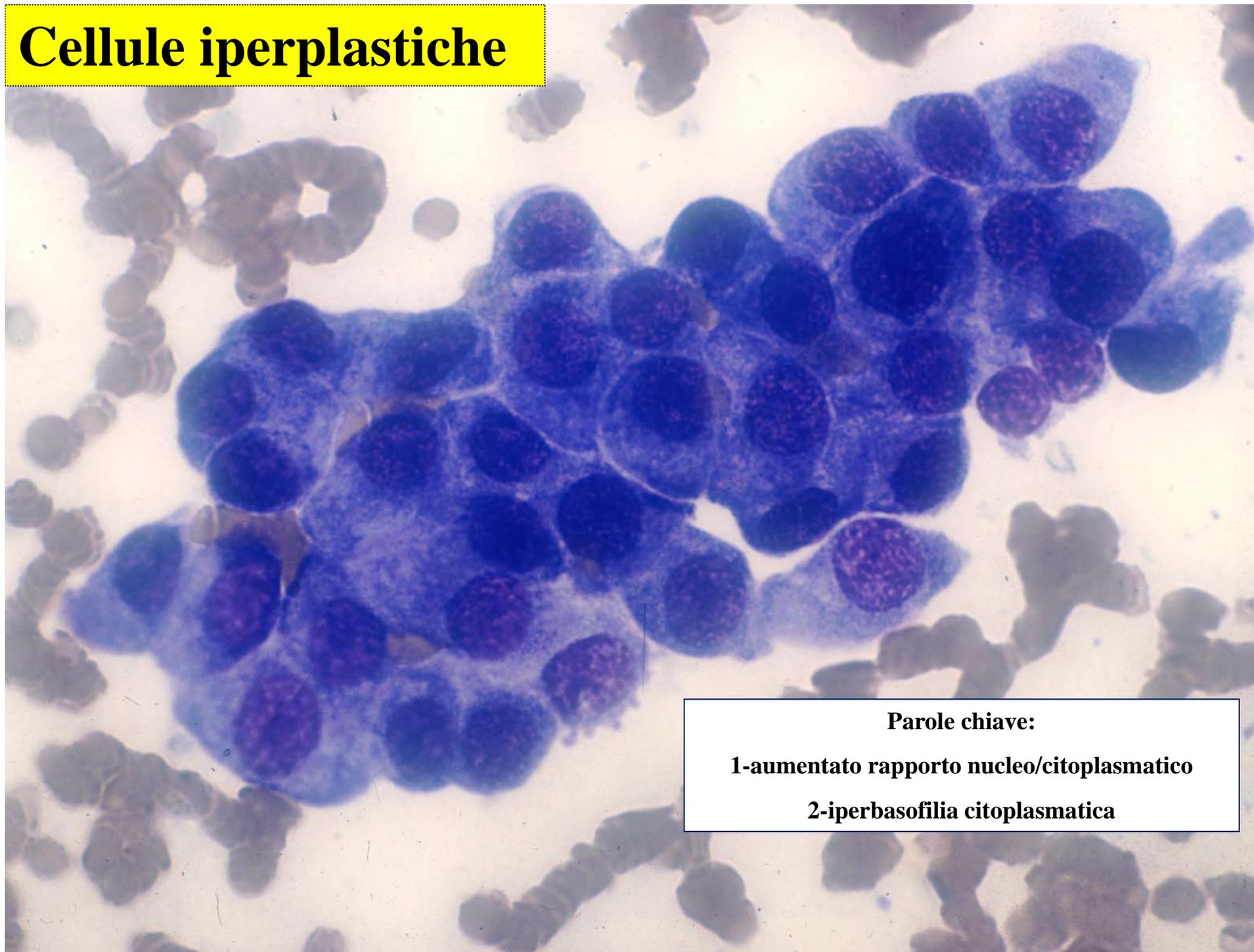


Prostata



Linfonodo

Cellule iperplastiche



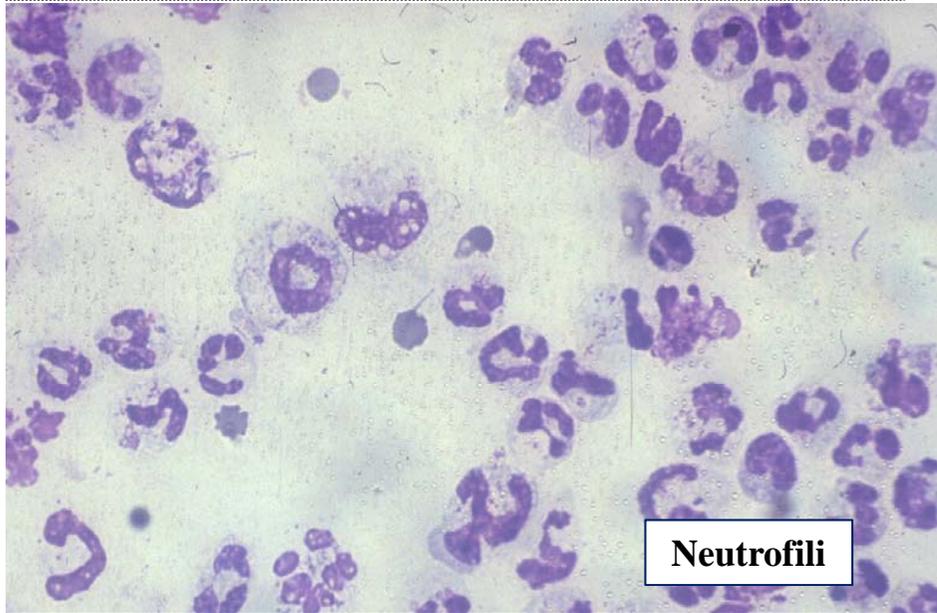
Parole chiave:

1-aumentato rapporto nucleo/citoplasmatico

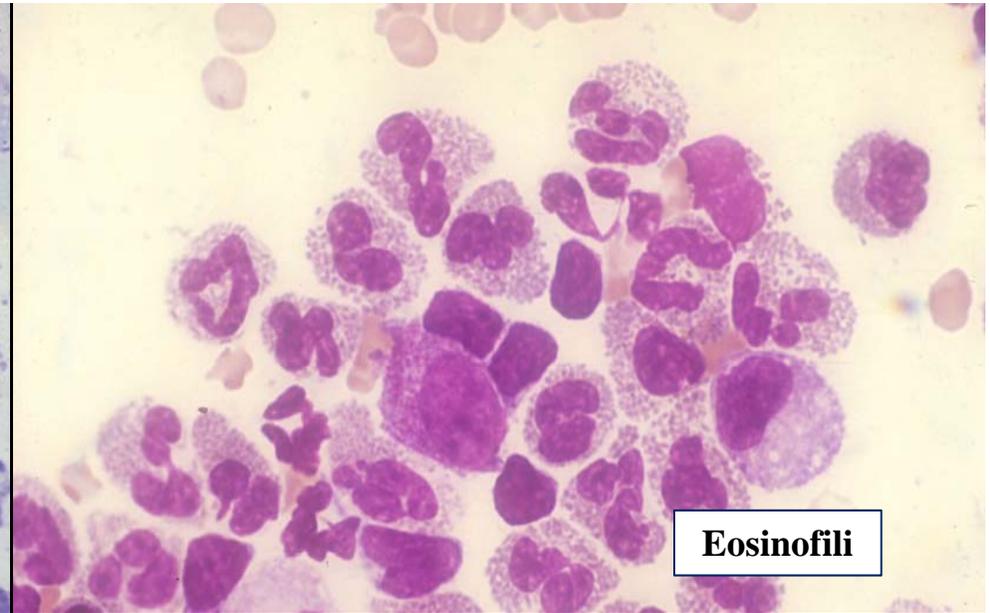
2-iperbasofilia citoplasmatica

Cellule infiammatorie

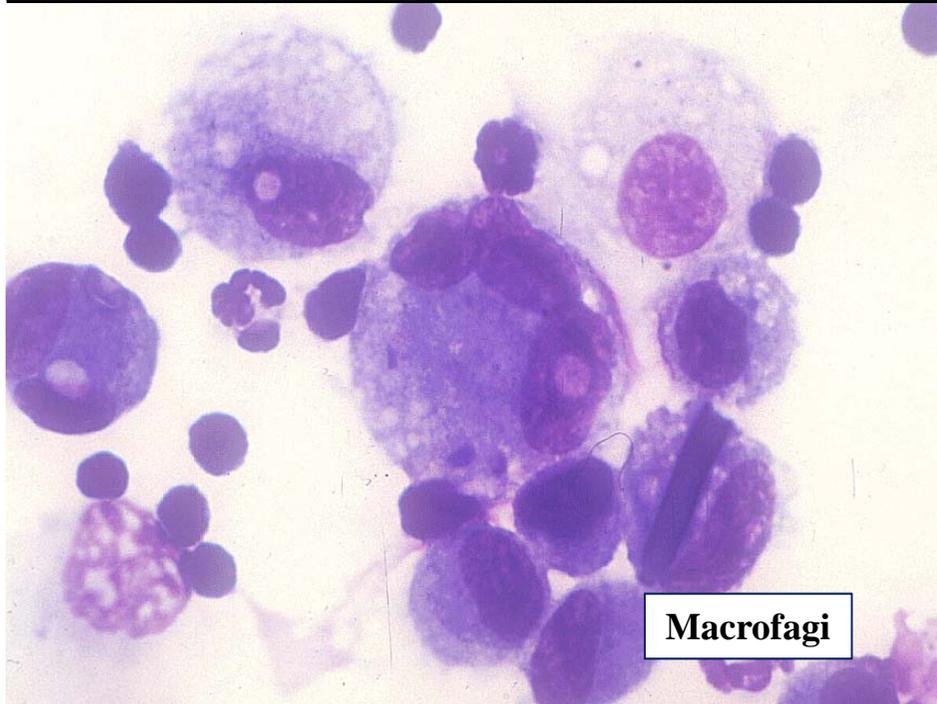
I processi infiammatori si classificano in base al tipo cellulare presente



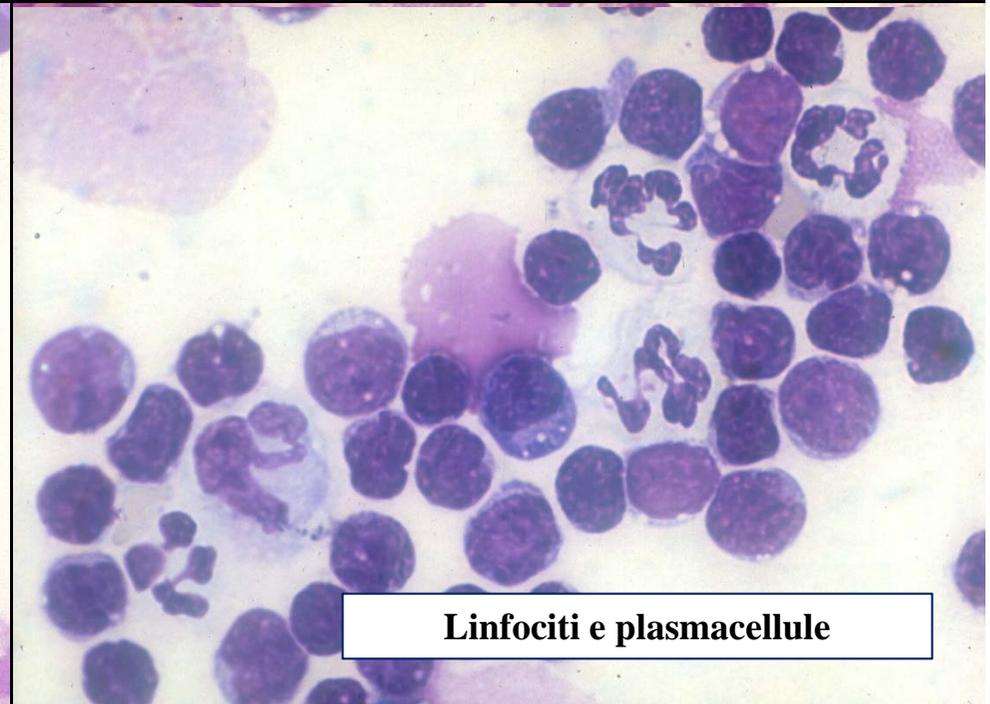
Neutrofili



Eosinofili



Macrofagi



Linfociti e plasmacellule

I neutrofil

N.B.- interessano 3 cose:

1-presenza di neutrofil

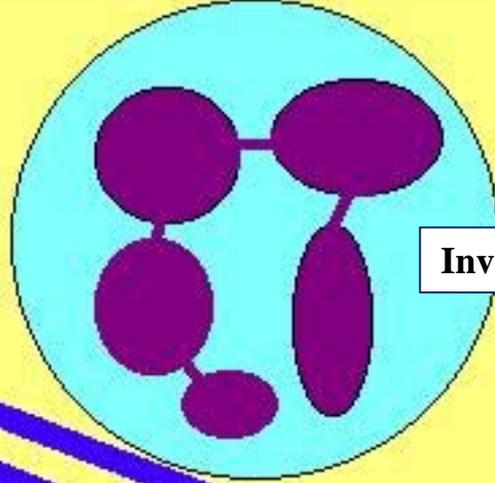
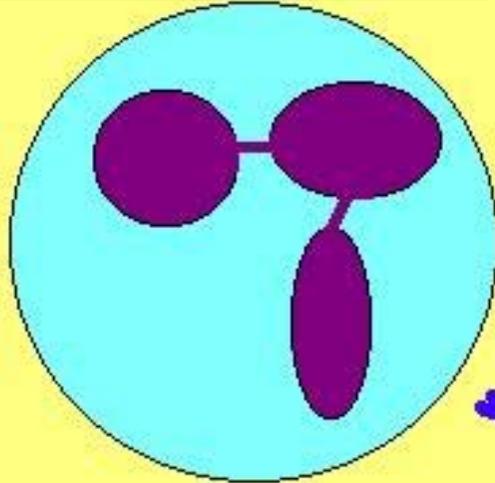
2-Aspetti degenerativi nucleari

3-fagocitosi batterica

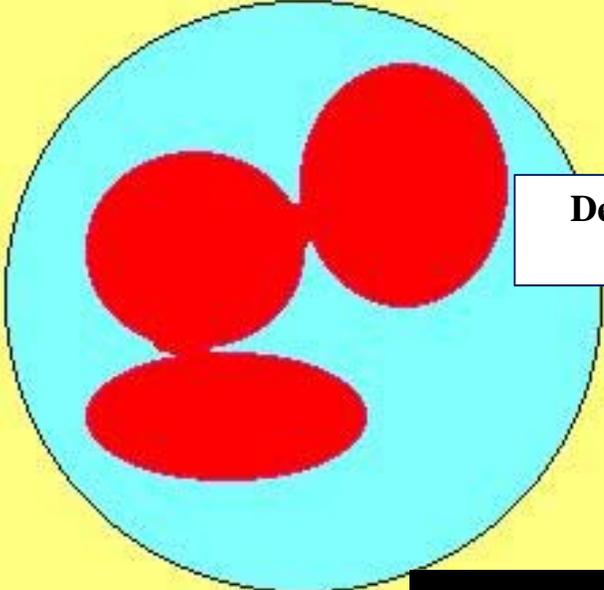
NEUTROFILO

Ipersegmentazione

Picnosi



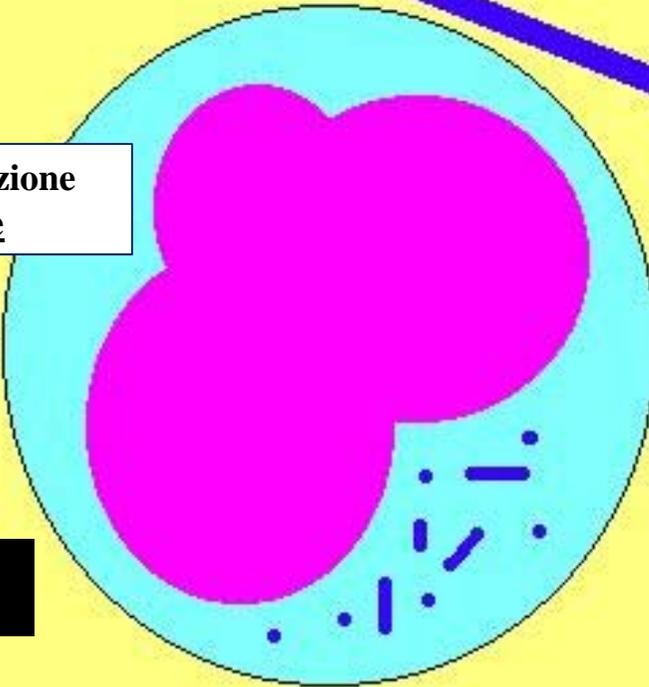
Invecchiamento



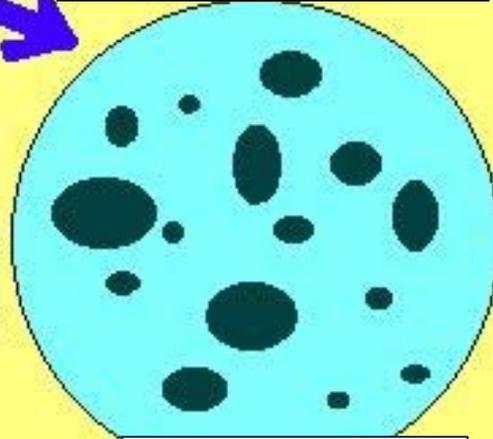
Degenerazione grave



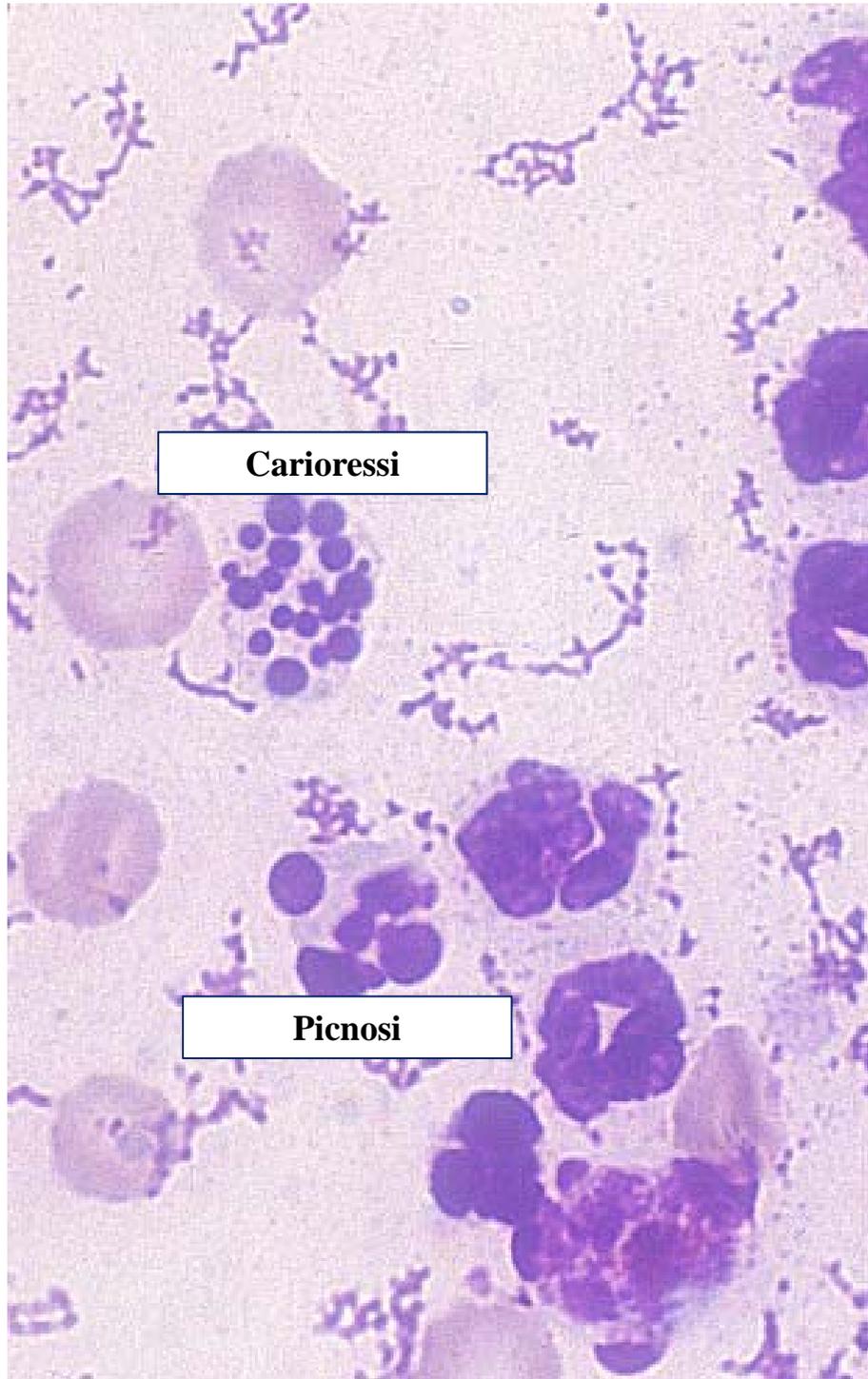
Cariolisi



Carioressi

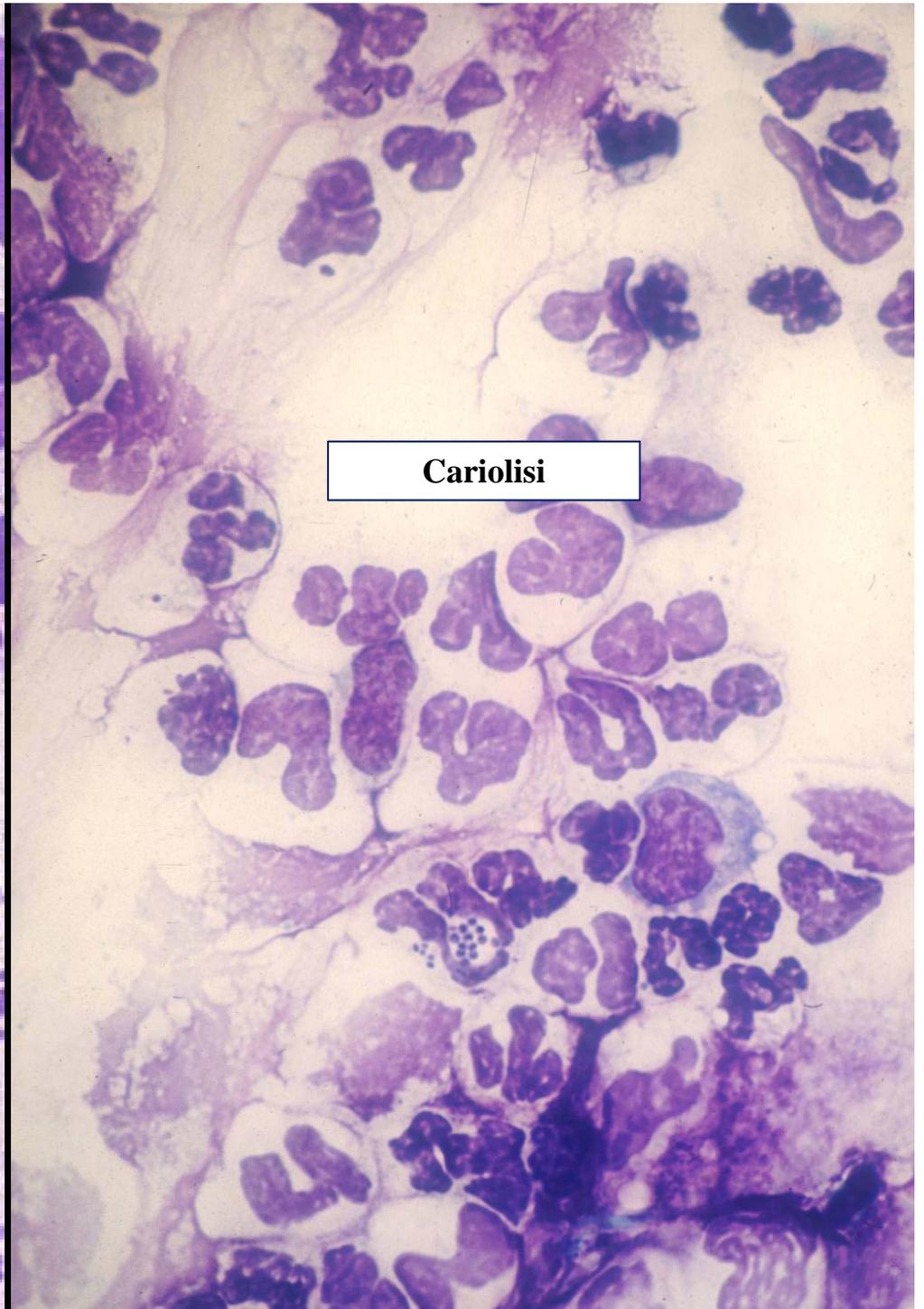


Degenerazione «non grave»?

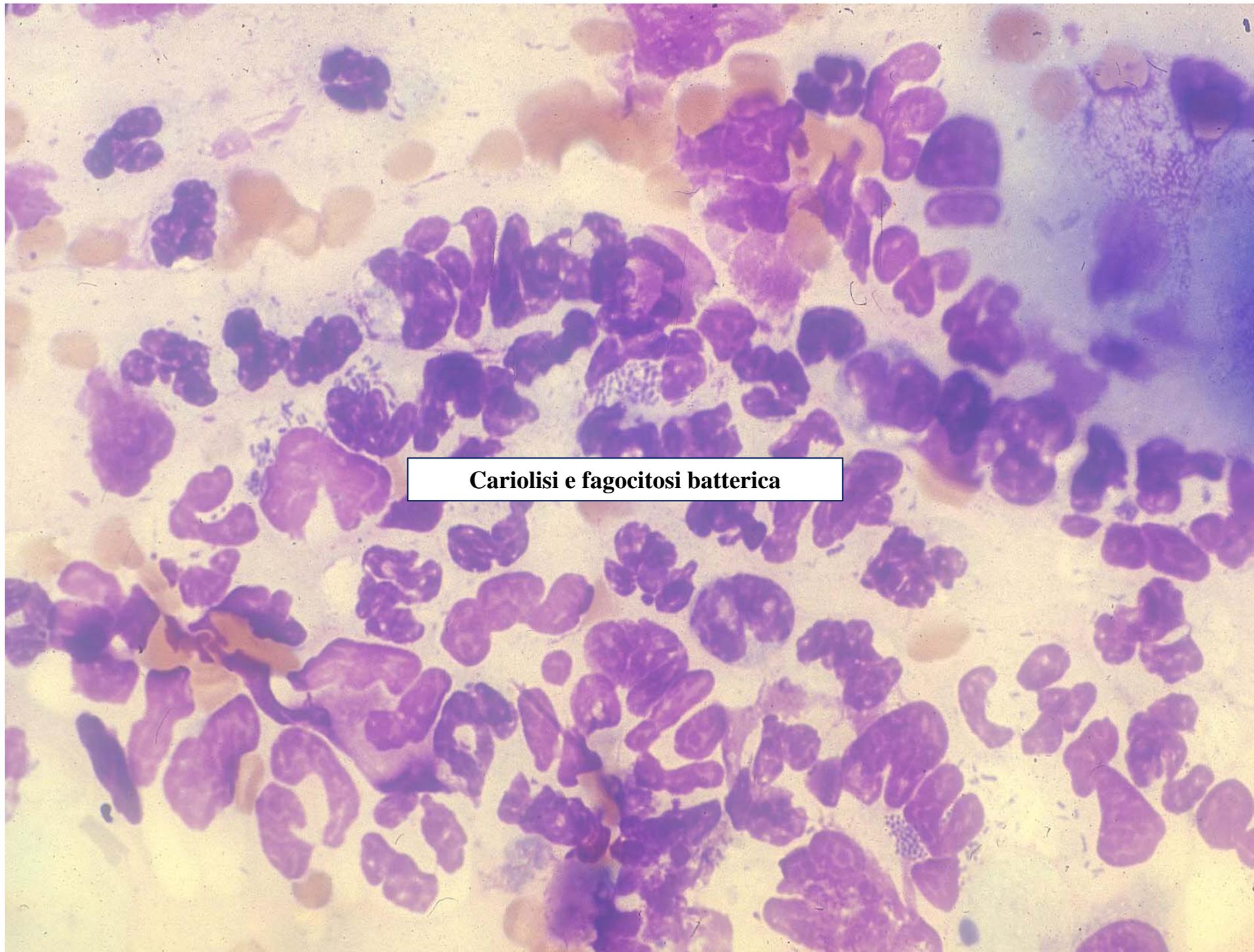


Carioressi

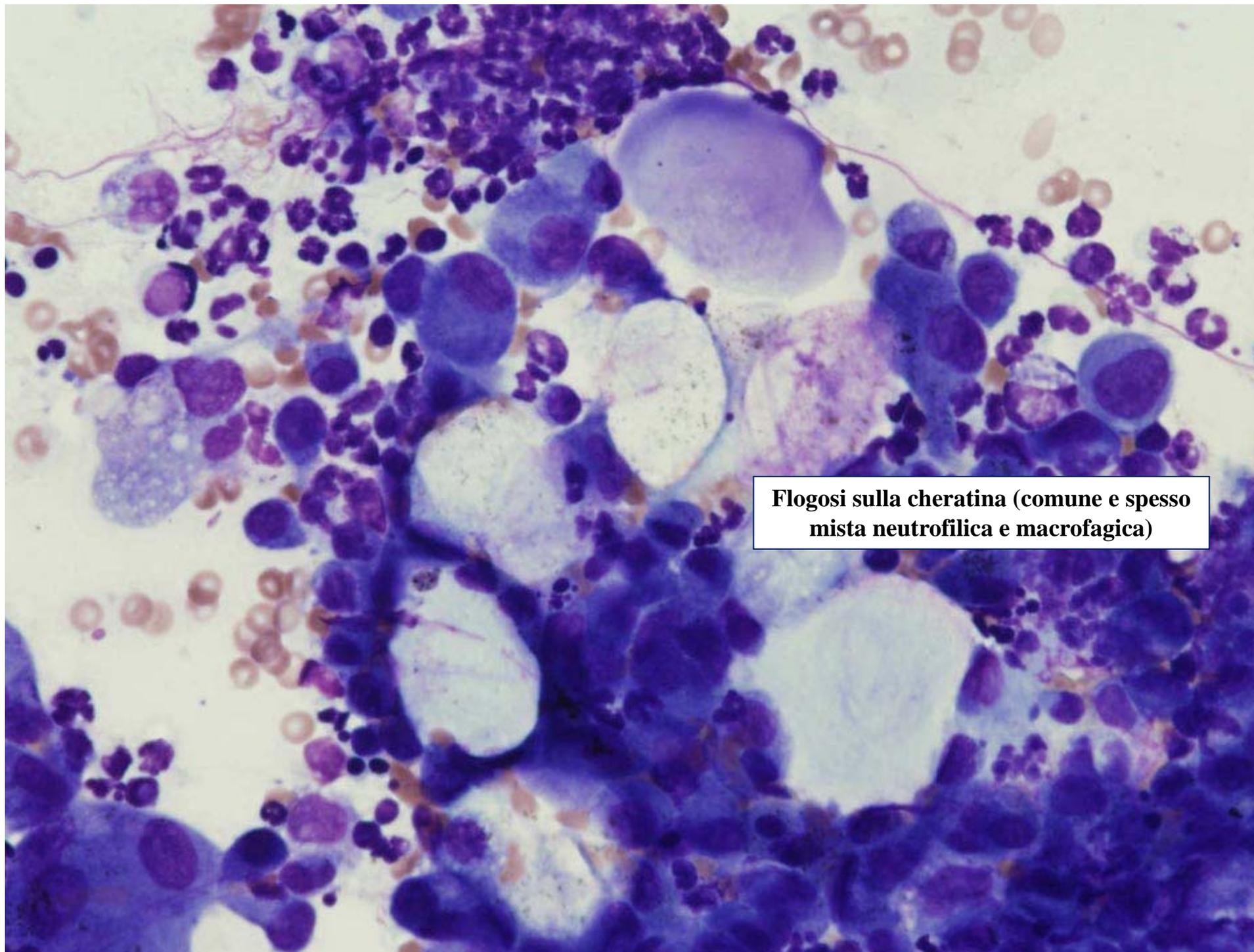
Picnosi



Cariolisi



Cariolisi e fagocitosi batterica

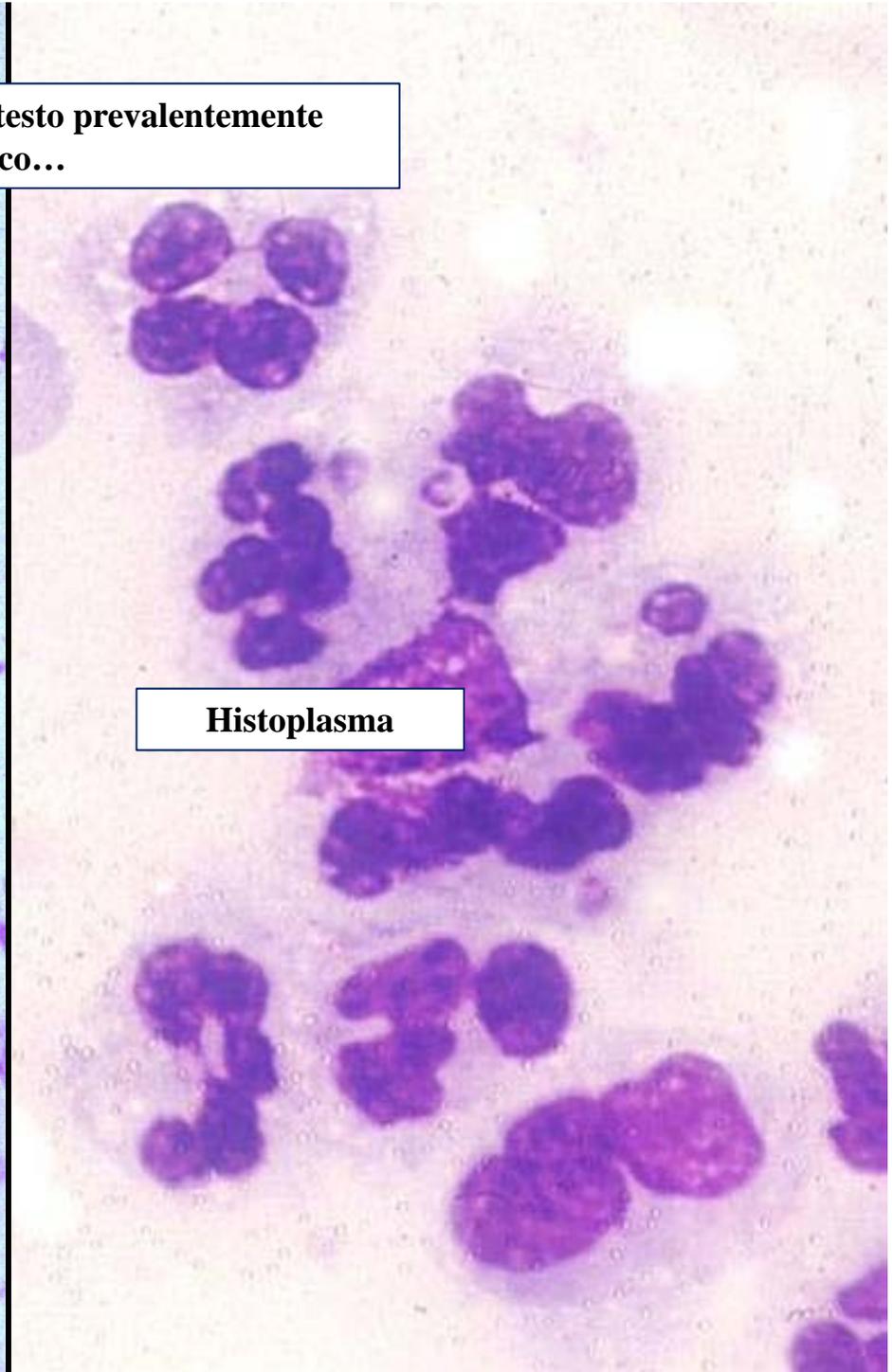
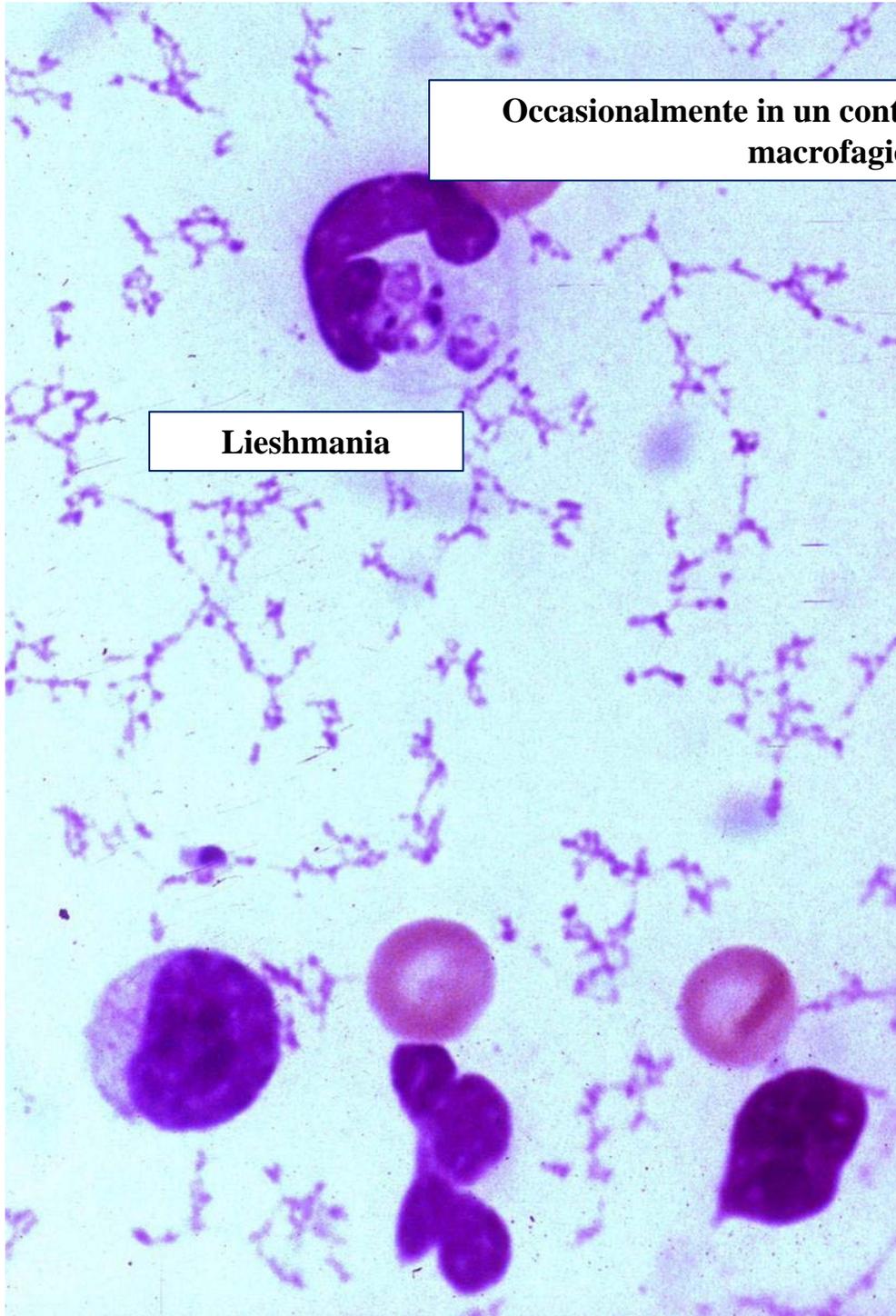


Flogosi sulla cheratina (comune e spesso mista neutrofilica e macrofagica)

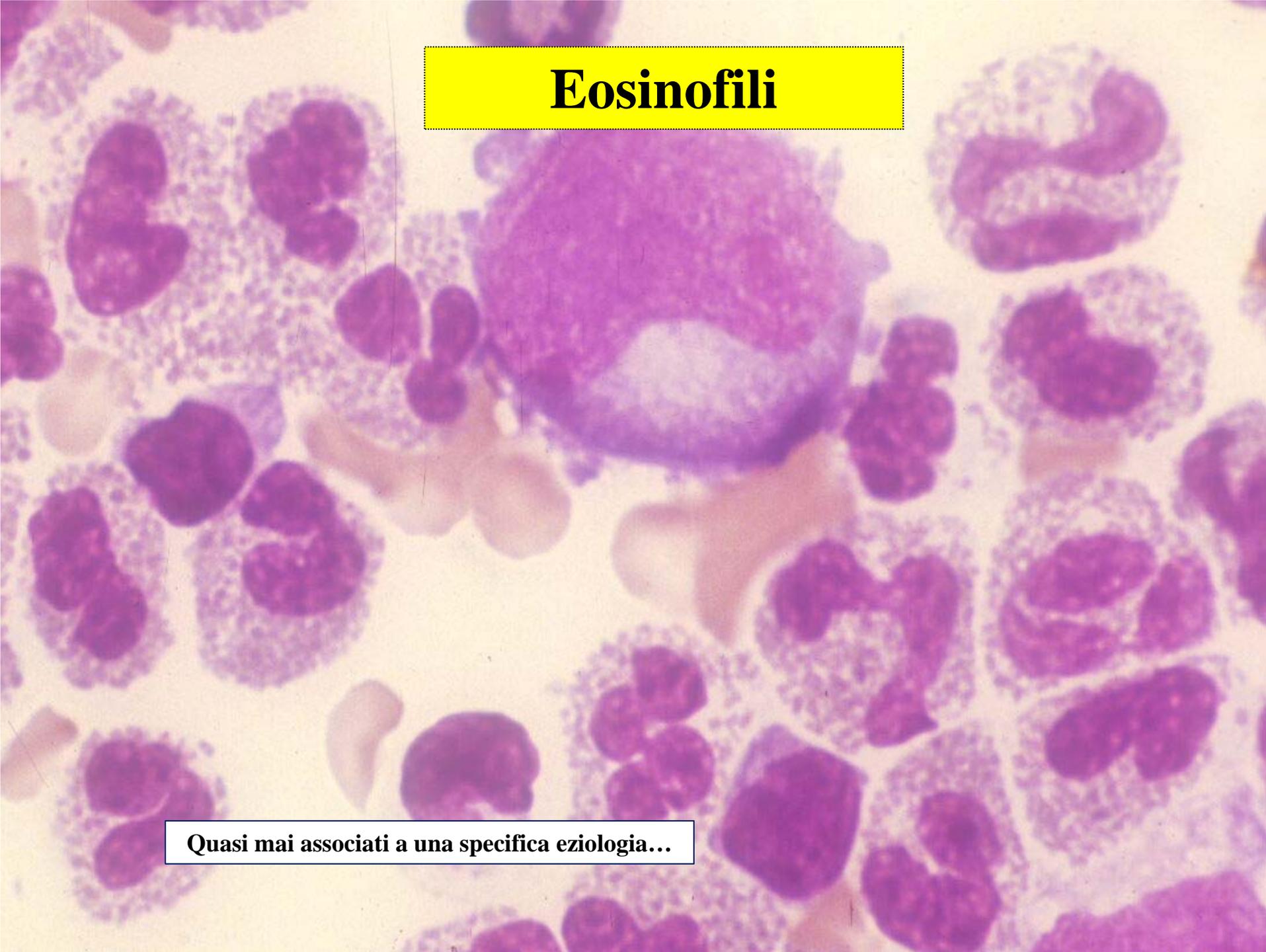
Occasionalmente in un contesto prevalentemente macrofagico...

Lieshmania

Histoplasma

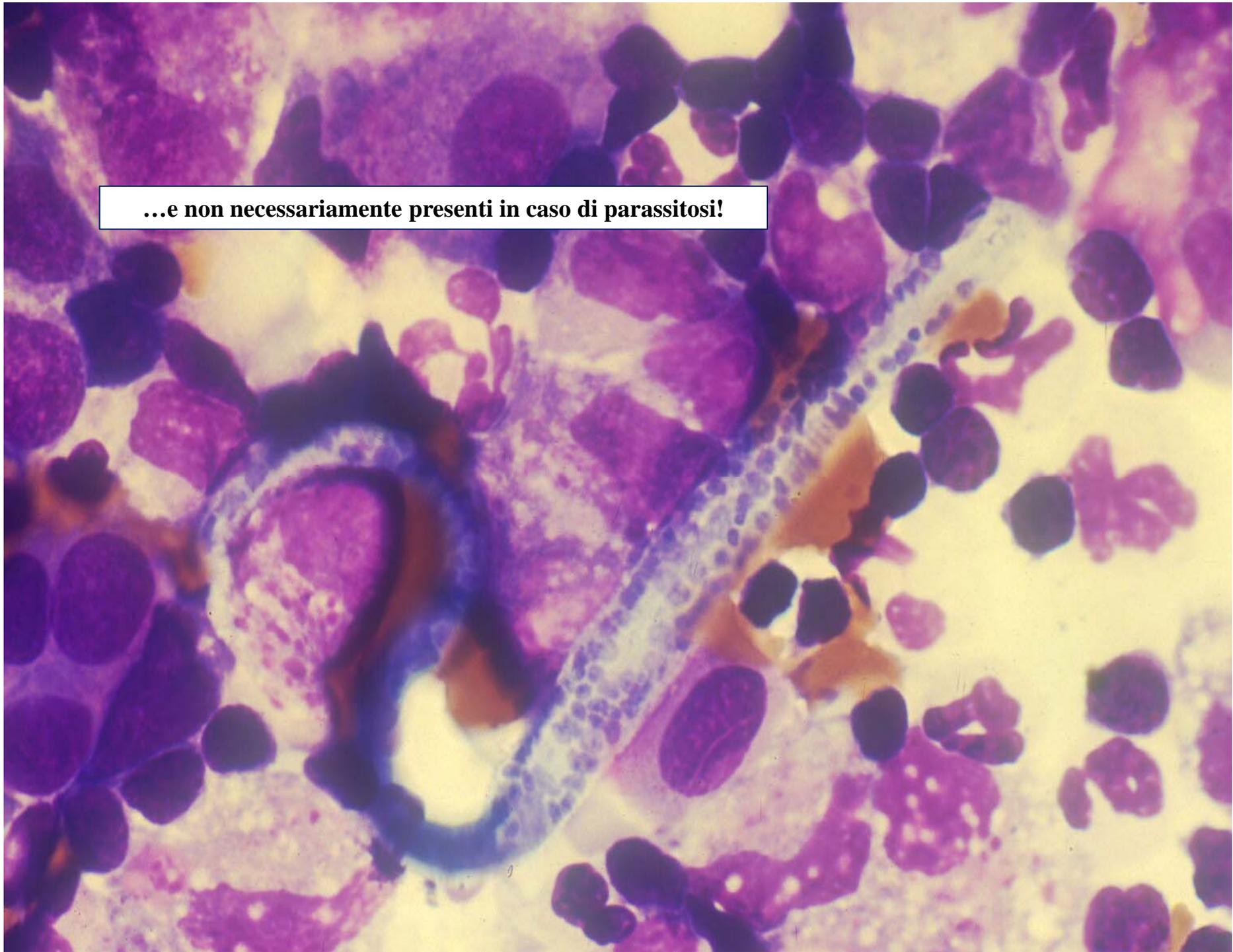


Eosinofili

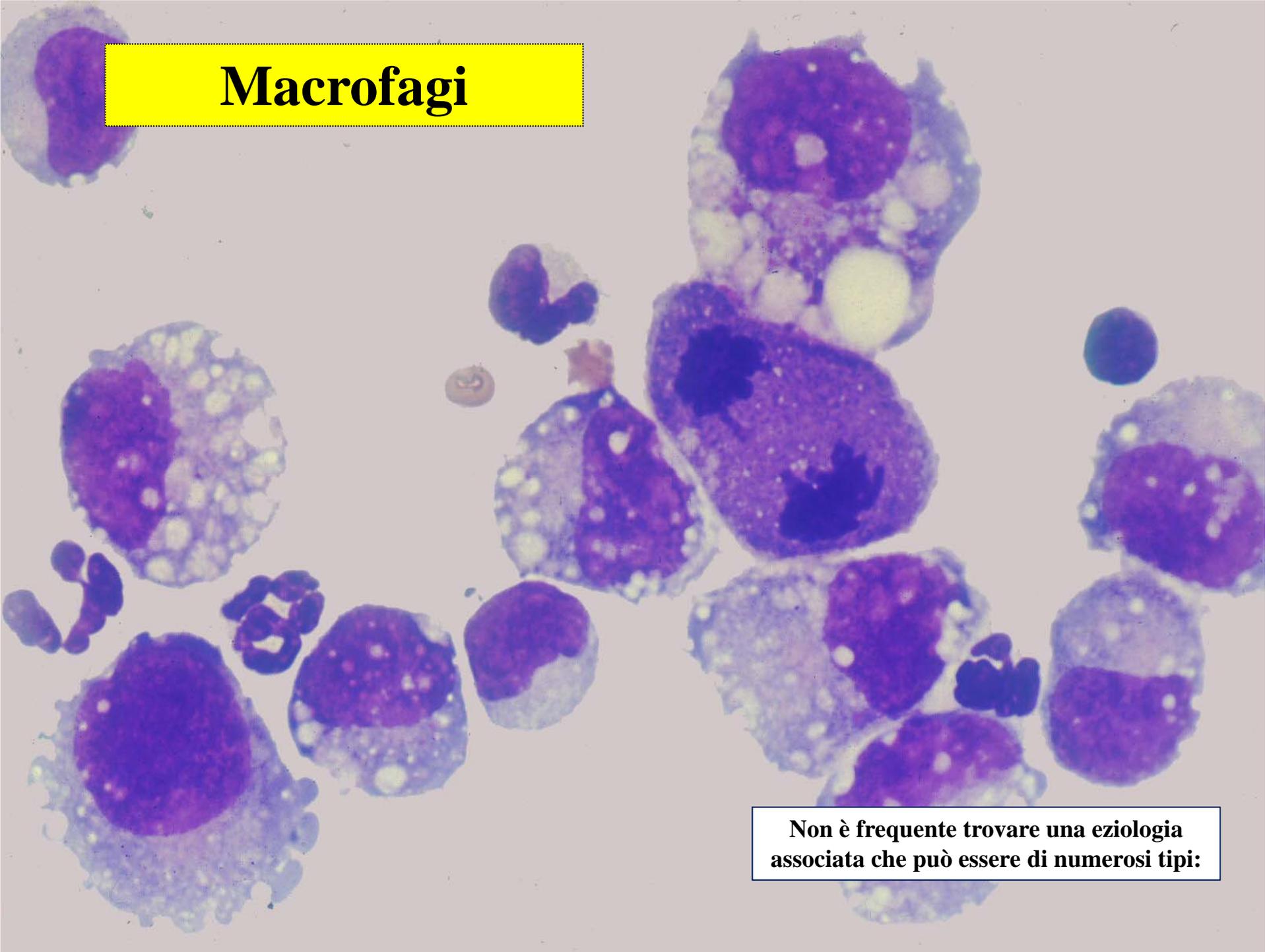


Quasi mai associati a una specifica eziologia...

...e non necessariamente presenti in caso di parassitosi!

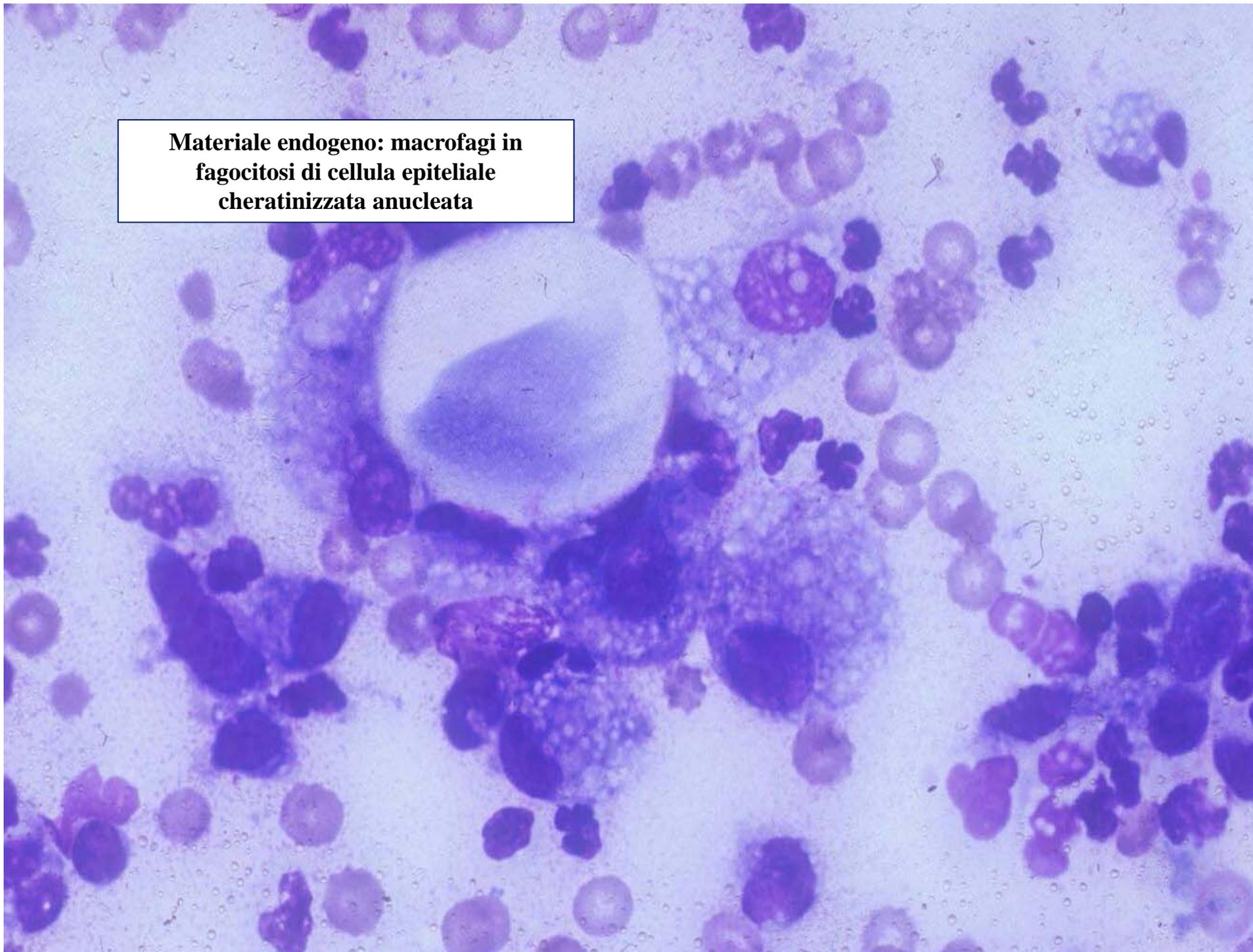


Macrofagi

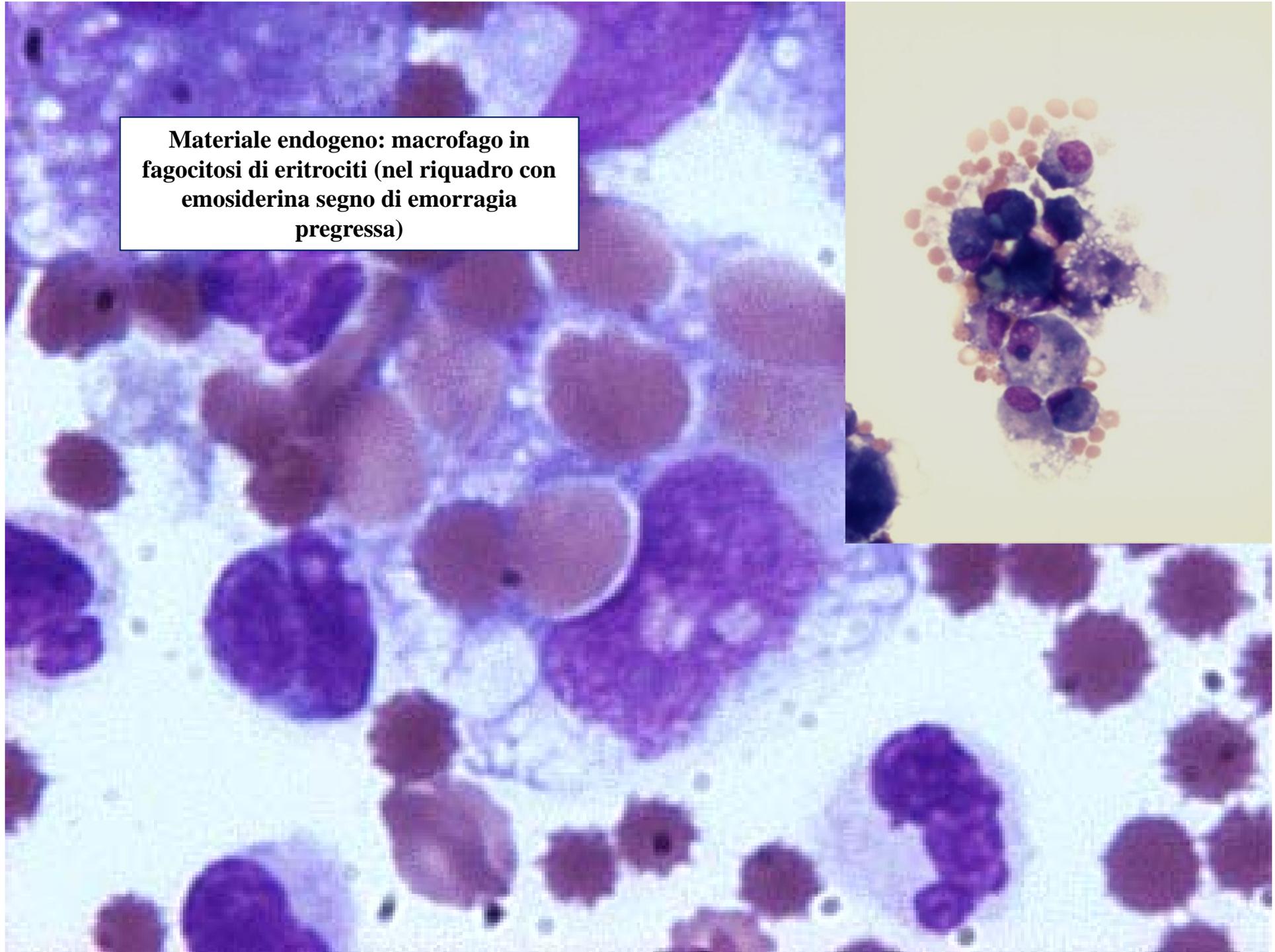
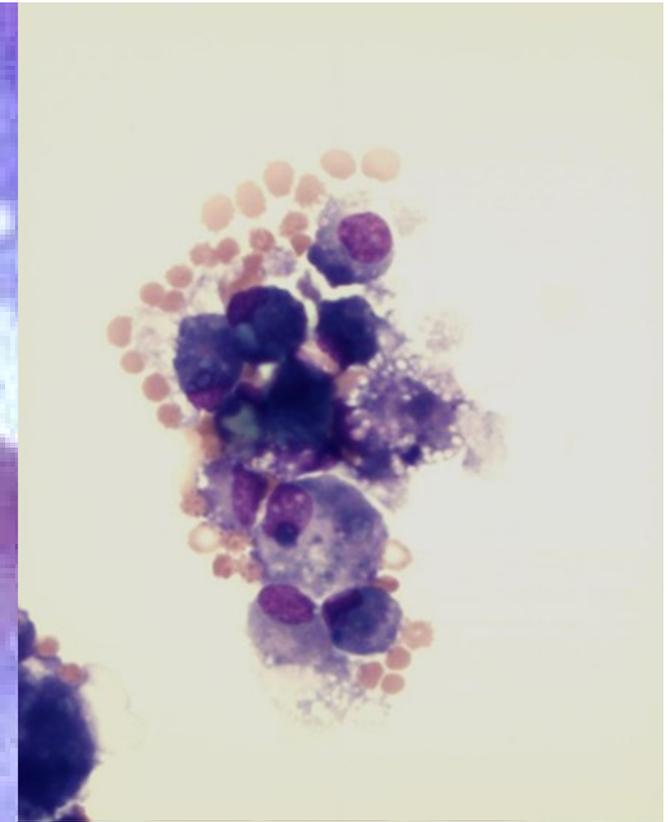
A microscopic image showing several macrophages. The cells are stained with a purple dye, likely hematoxylin, which highlights their nuclei and internal organelles. The macrophages exhibit a variety of shapes and sizes, with some having large, prominent nuclei and others appearing more rounded or elongated. The cytoplasm of the cells is filled with granules and vesicles, characteristic of these immune cells. The background is a light, uniform color, providing a clear contrast for the stained cells.

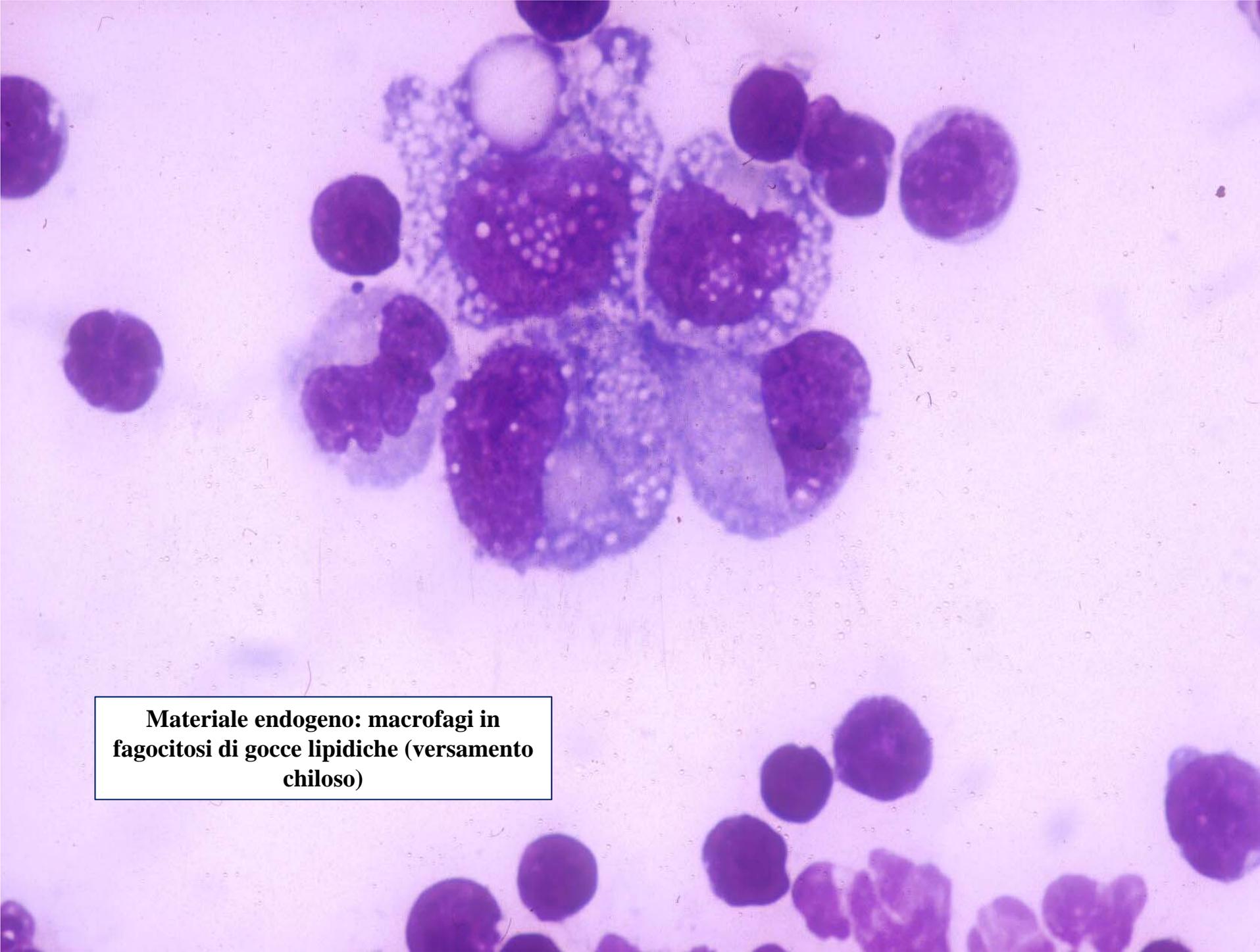
Non è frequente trovare una eziologia associata che può essere di numerosi tipi:

**Materiale endogeno: macrofagi in
fagocitosi di cellula epiteliale
cheratinizzata anucleata**



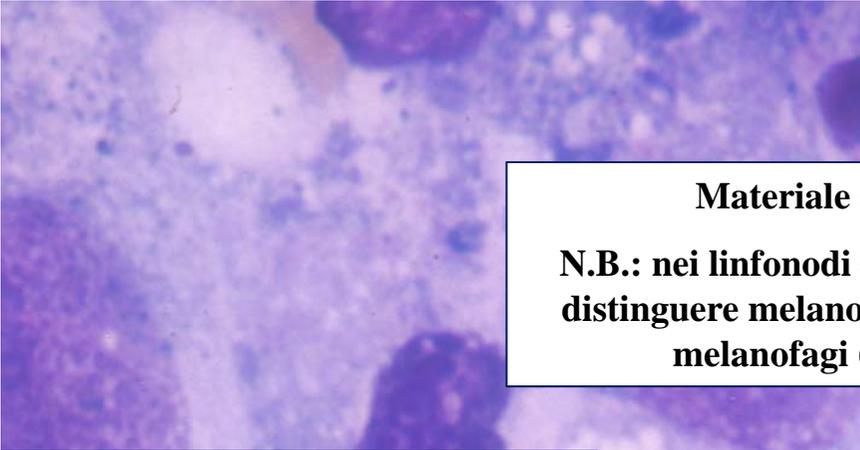
Materiale endogeno: macrofago in fagocitosi di eritrociti (nel riquadro con emosiderina segno di emorragia pregressa)





**Materiale endogeno: macrofagi in
fagocitosi di gocce lipidiche (versamento
chiloso)**

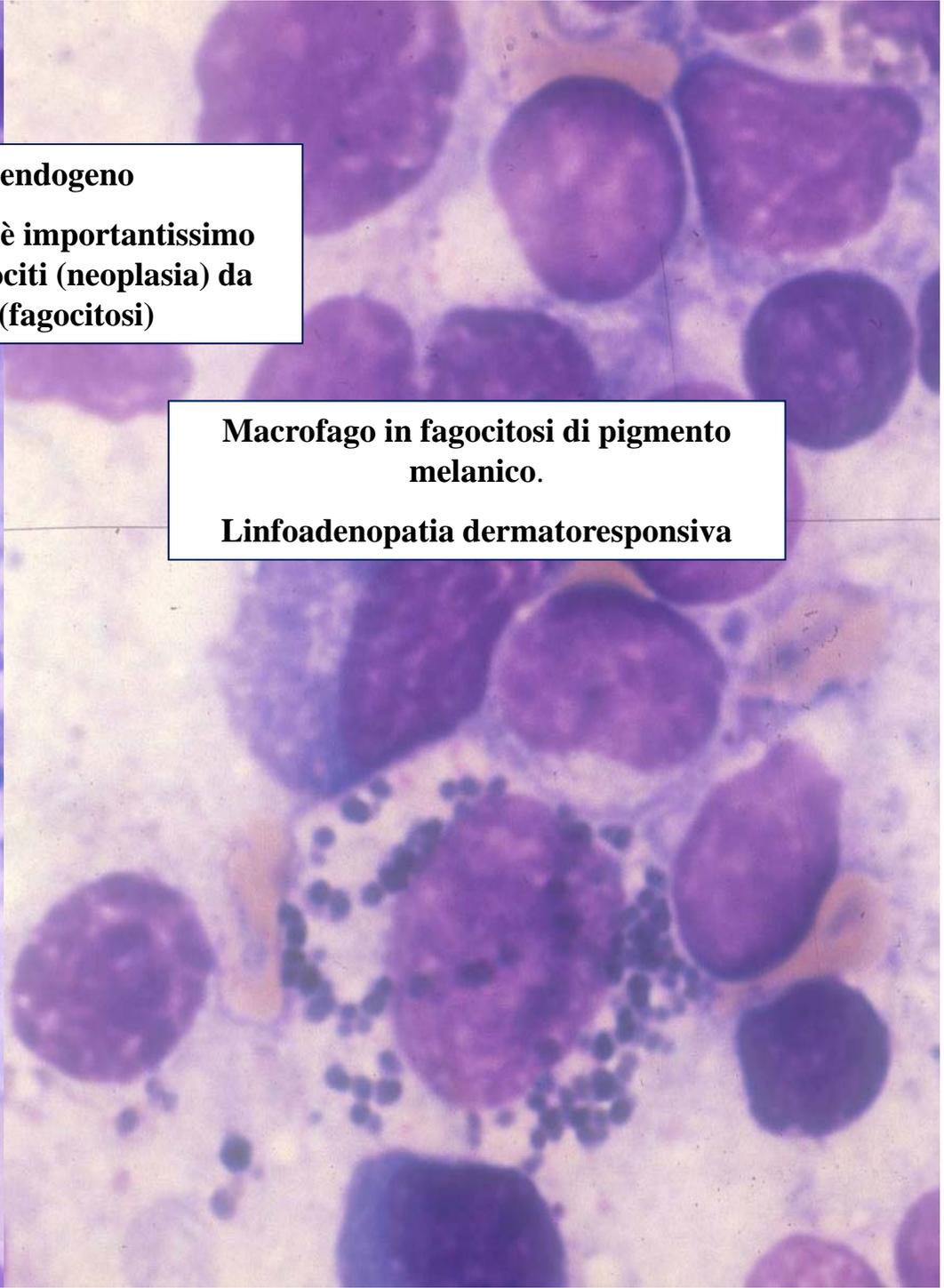
This micrograph shows several macrophages in the process of phagocytosis. The cells are characterized by their large, foamy or vacuolated cytoplasm, which is filled with numerous small, clear droplets. These droplets represent lipid material that has been internalized by the macrophages. The nuclei of the macrophages are typically pushed to the periphery of the cell. The overall appearance is that of xanthoma cells or foamy macrophages, which are commonly found in areas of chronic inflammation and lipid accumulation, such as in atherosclerosis or xanthoma formation.



Materiale endogeno

N.B.: nei linfonodi è importantissimo distinguere melanociti (neoplasia) da melanofagi (fagocitosi)

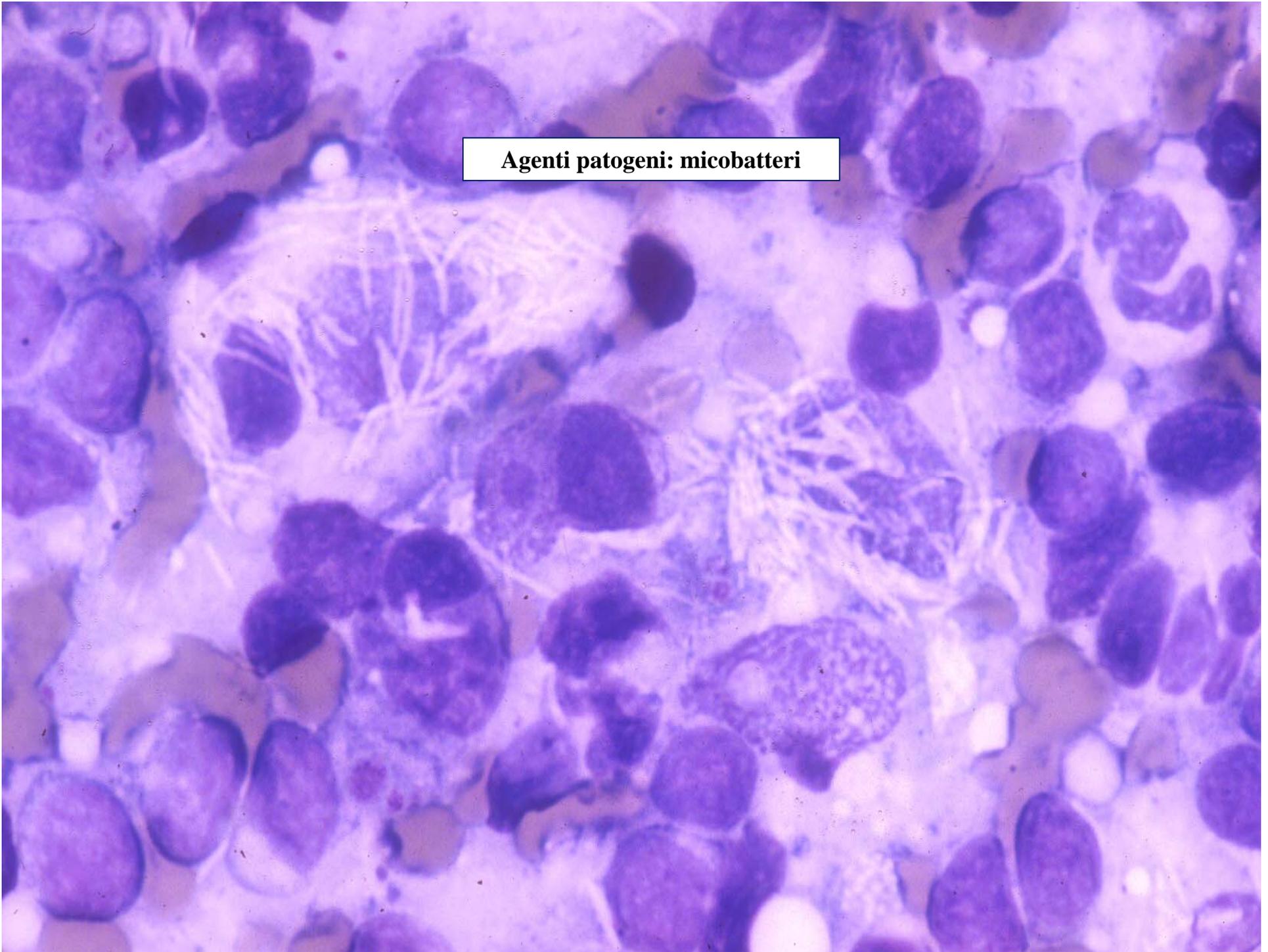
fonodo con metastasi di melanoma.



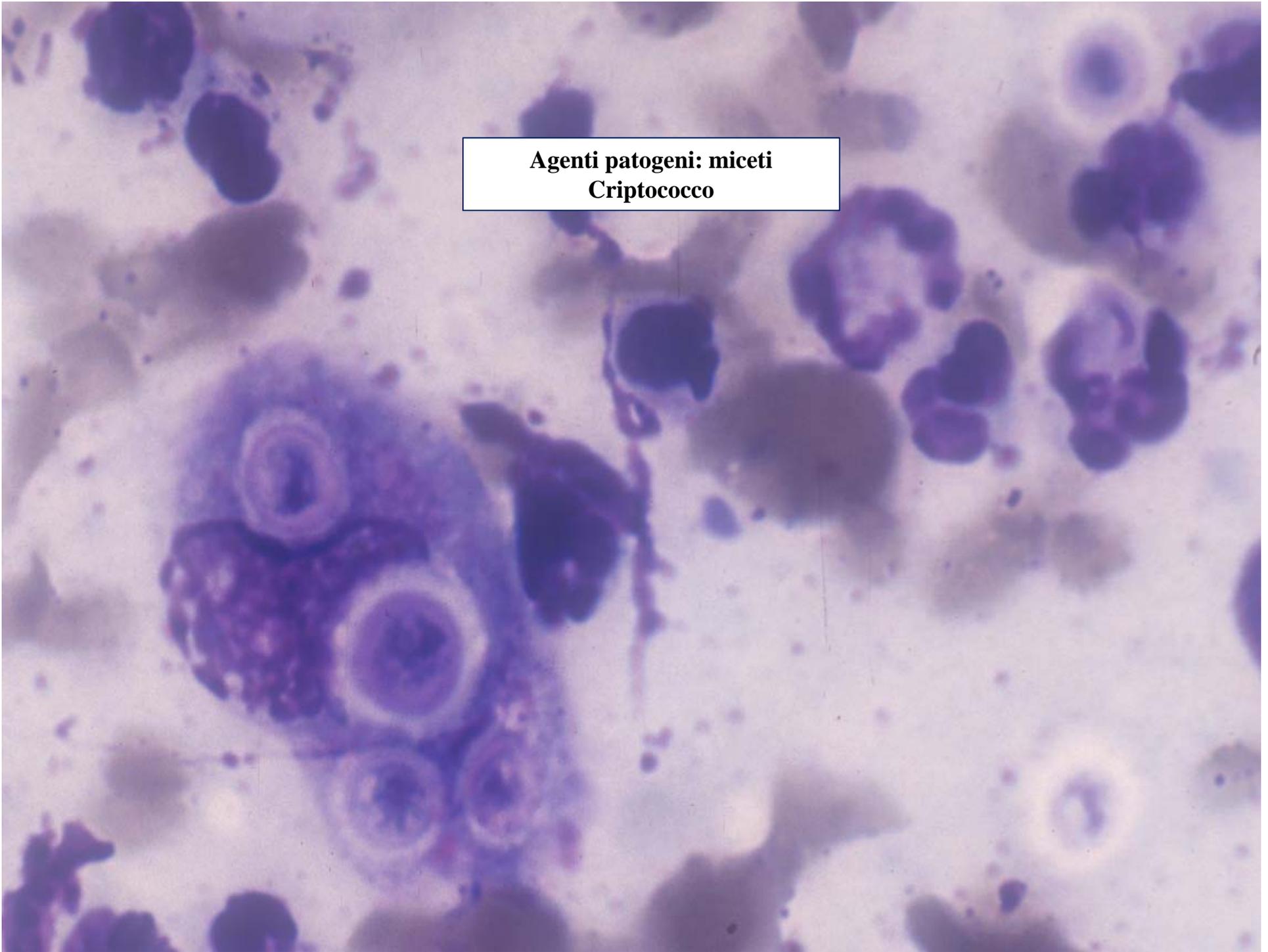
Macrofago in fagocitosi di pigmento melanico.

Linfoadenopatia dermatoresponsiva

Agenti patogeni: micobatteri

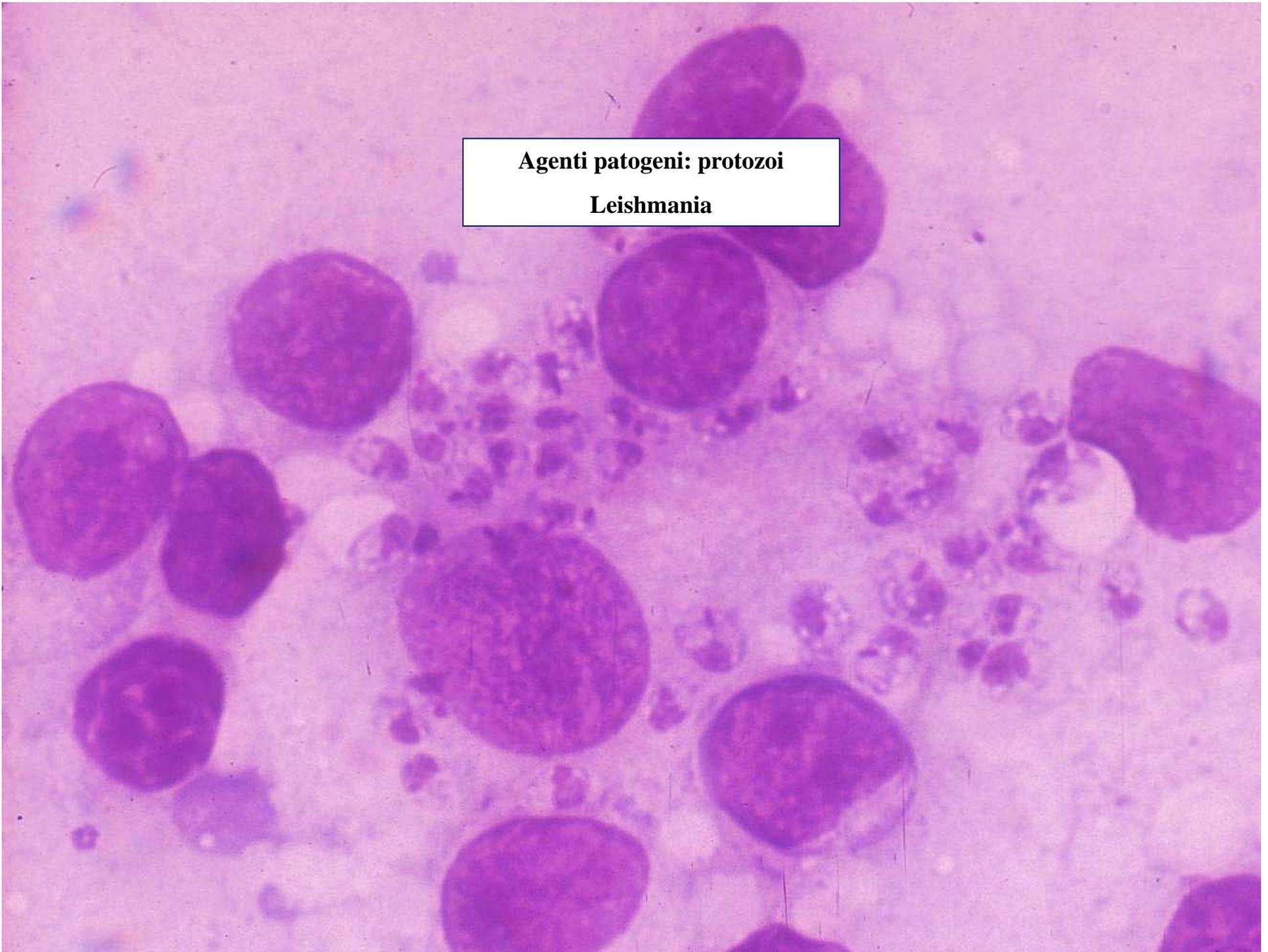


**Agenti patogeni: miceti
Criptococco**

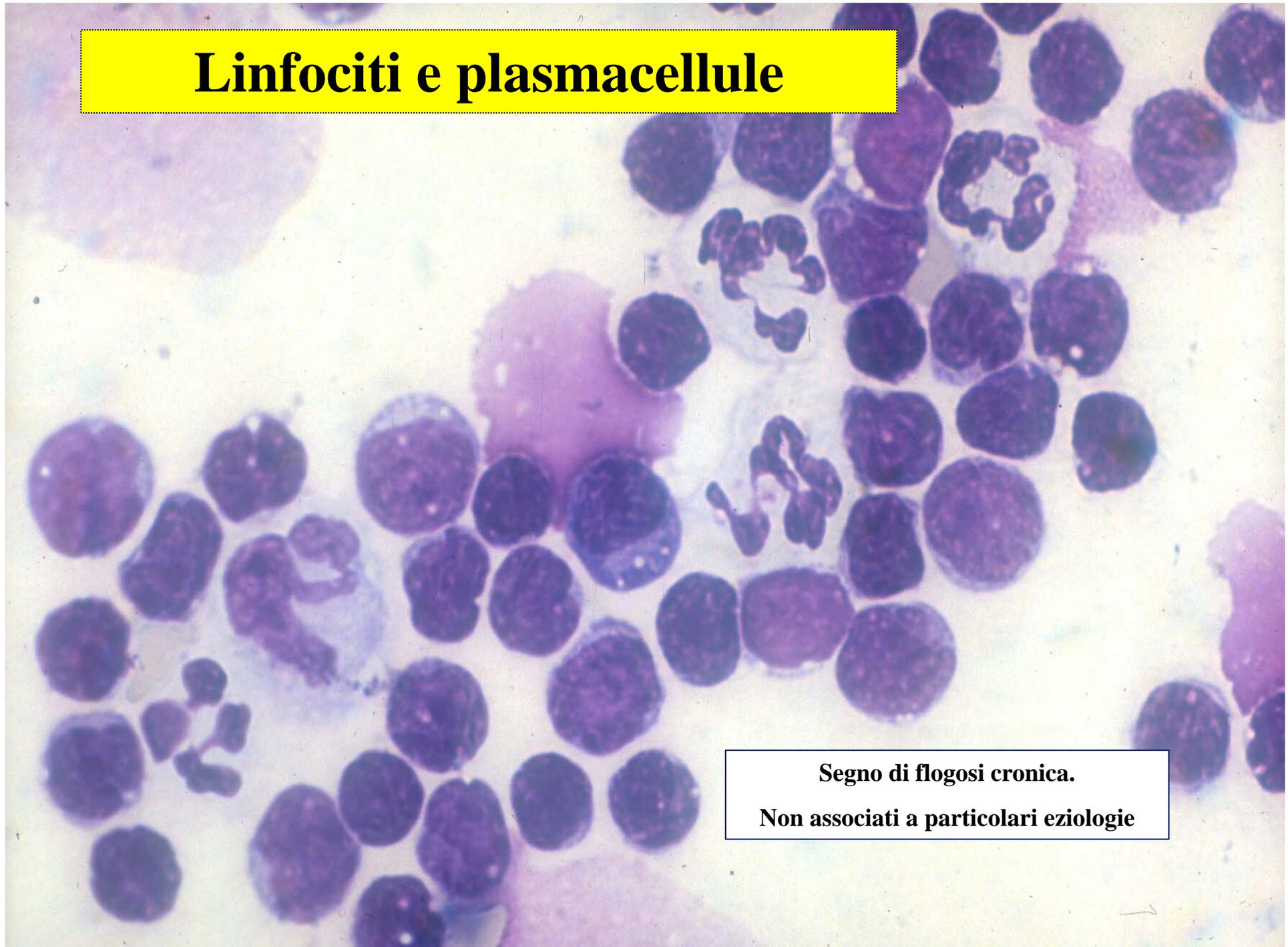


Agenti patogeni: protozoi

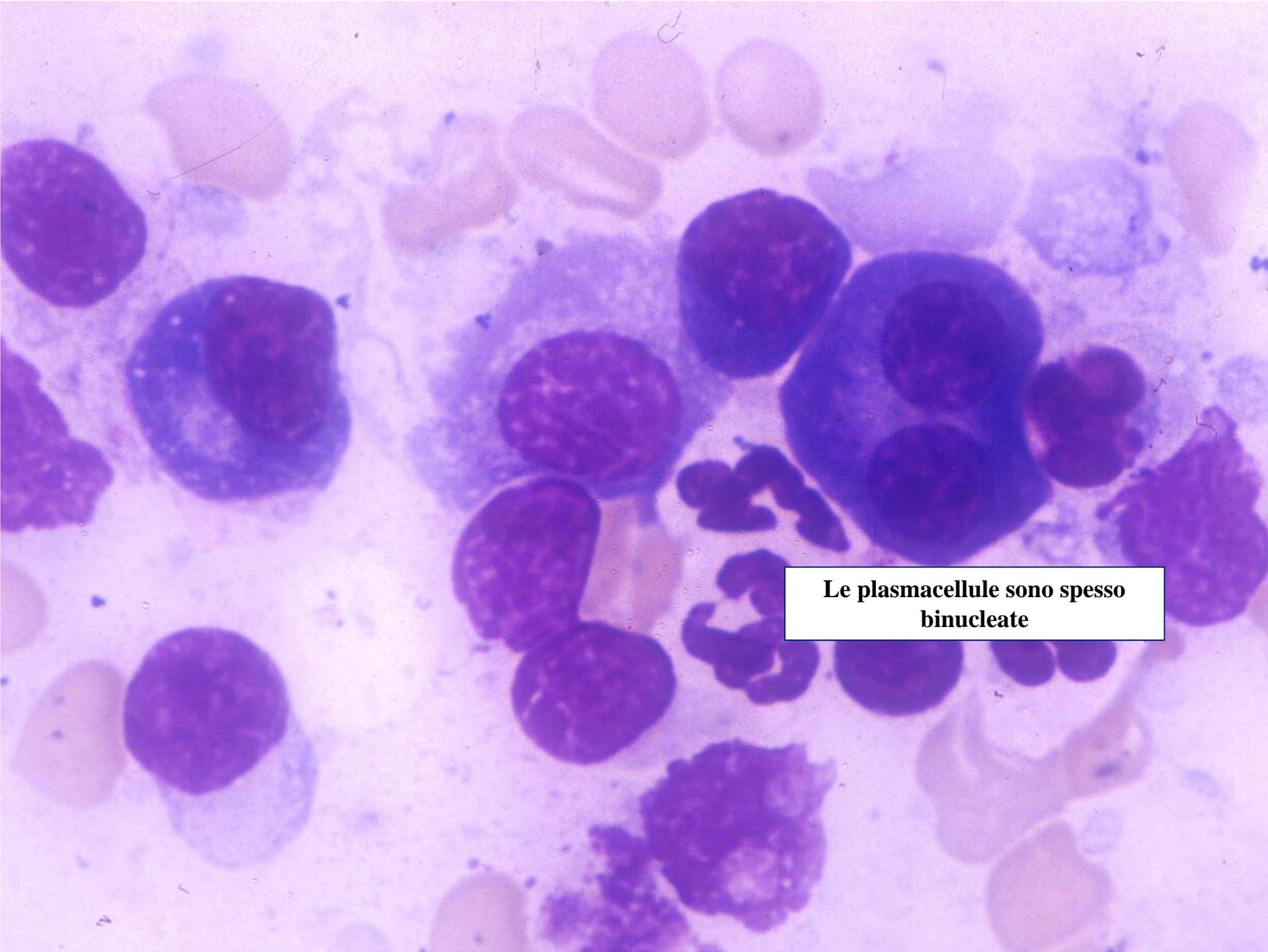
Leishmania



Linfociti e plasmacellule



**Segno di flogosi cronica.
Non associati a particolari eziologie**

A microscopic image showing a field of plasma cells. The cells are characterized by their large, eccentric nuclei and abundant, deeply basophilic cytoplasm. Many of the cells are binucleated, with two distinct nuclei visible within a single cell. The background is a light purple color, typical of a Giemsa or Wright stain. A white text box with a black border is overlaid on the right side of the image, containing the text "Le plasmacellule sono spesso binucleate".

Le plasmacellule sono spesso binucleate

Altre cellule infiammatorie

Mastociti

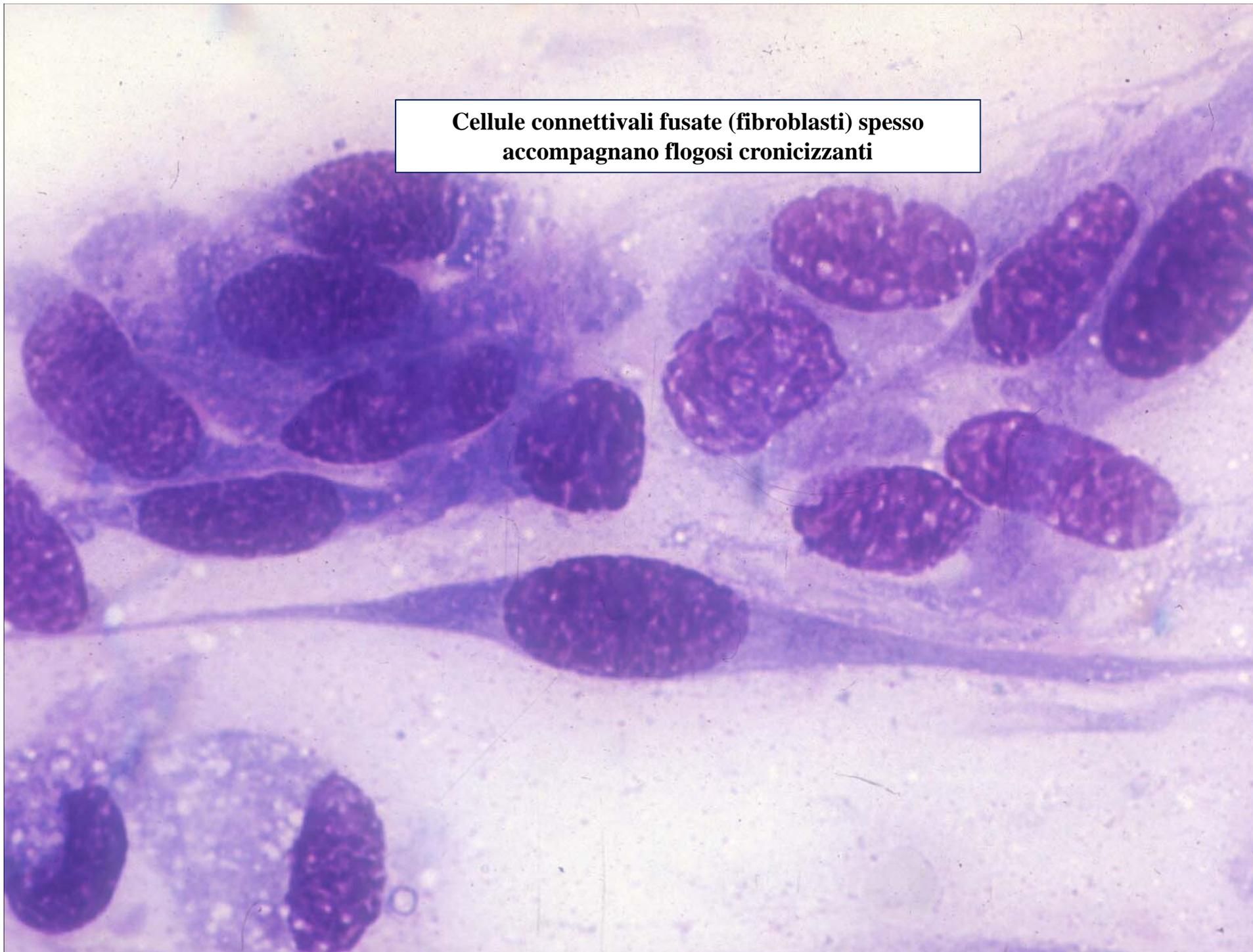
Occasionalmente presenti nelle flogosi.

Spesso associati a eosinofili.

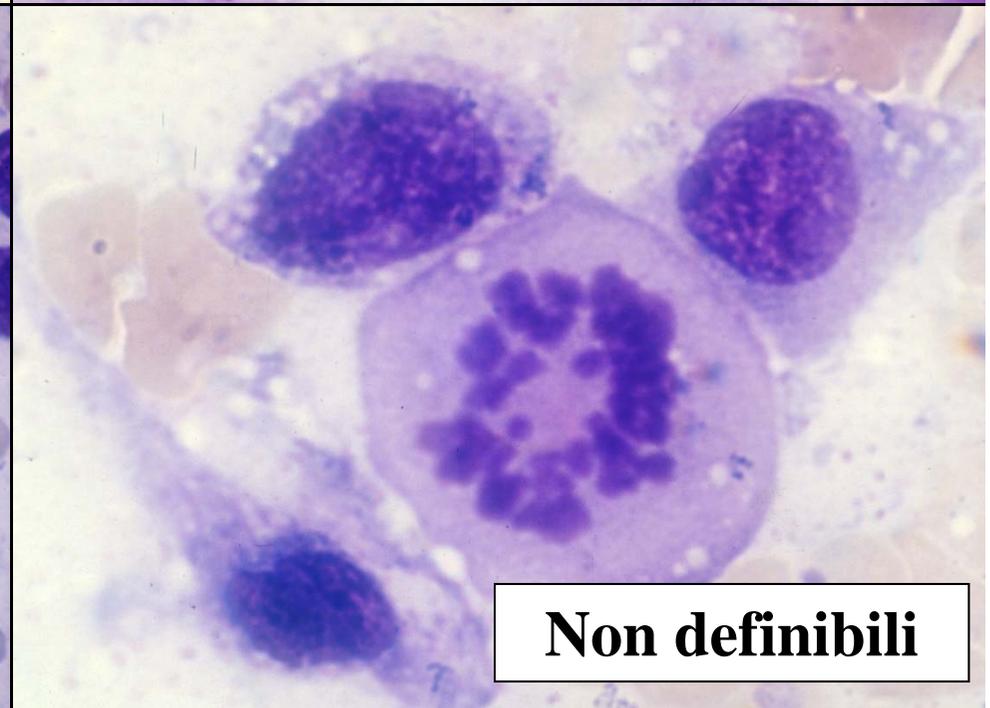
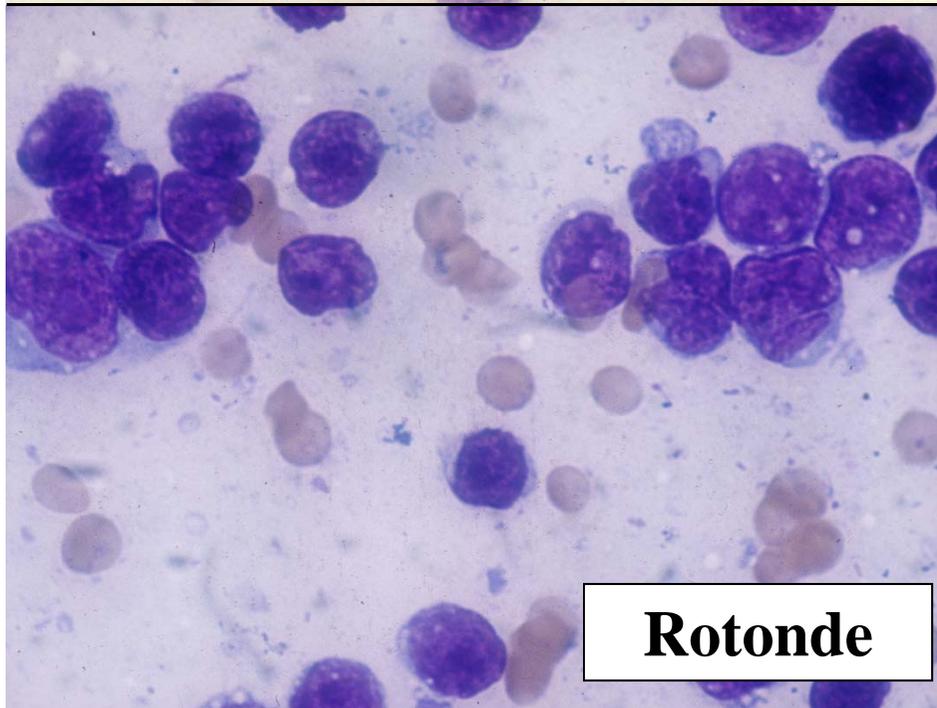
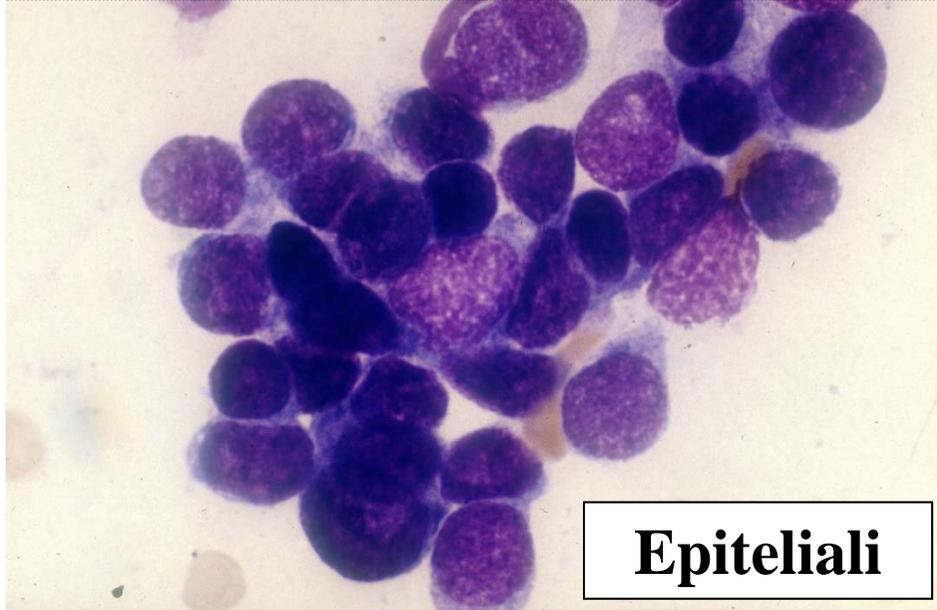
Espressione di fenomeni allergici



**Cellule connettivali fusate (fibroblasti) spesso
accompagnano flogosi cronicizzanti**

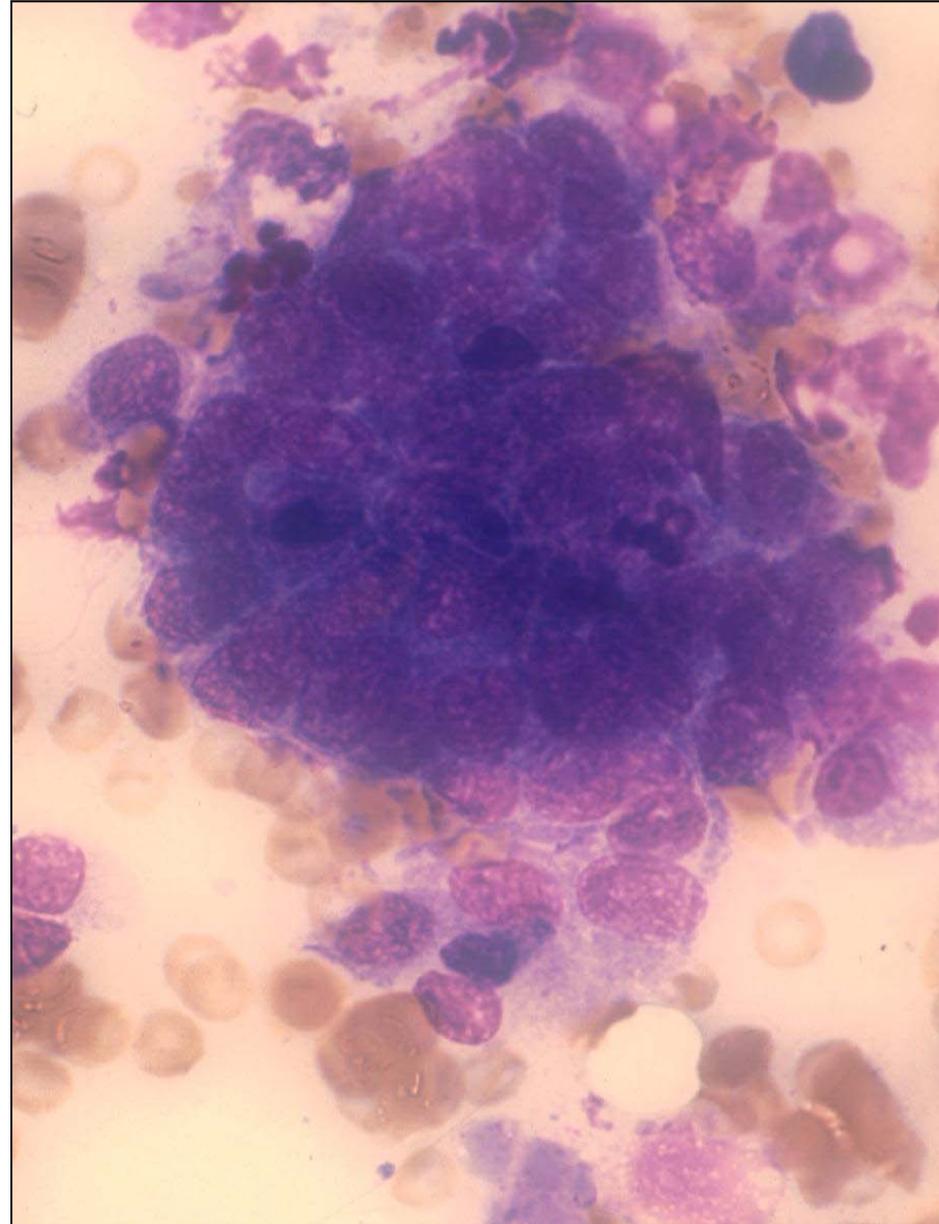


Cellule neoplastiche



Tumori epiteliali

- 1- Cellularità (+/++/+++)
- 2- Coesività
- 3- Cellule rotonde
- 4- Nucleo rotondo (spesso)
- 5- Margini indistinti fra le cellule del gruppo
- 6- Subclassificazione (spesso possibile)



Tumori a cellule fusate

1- Cellularità (+)

2- Singole

3- Fusate

4- Nucleo allungato

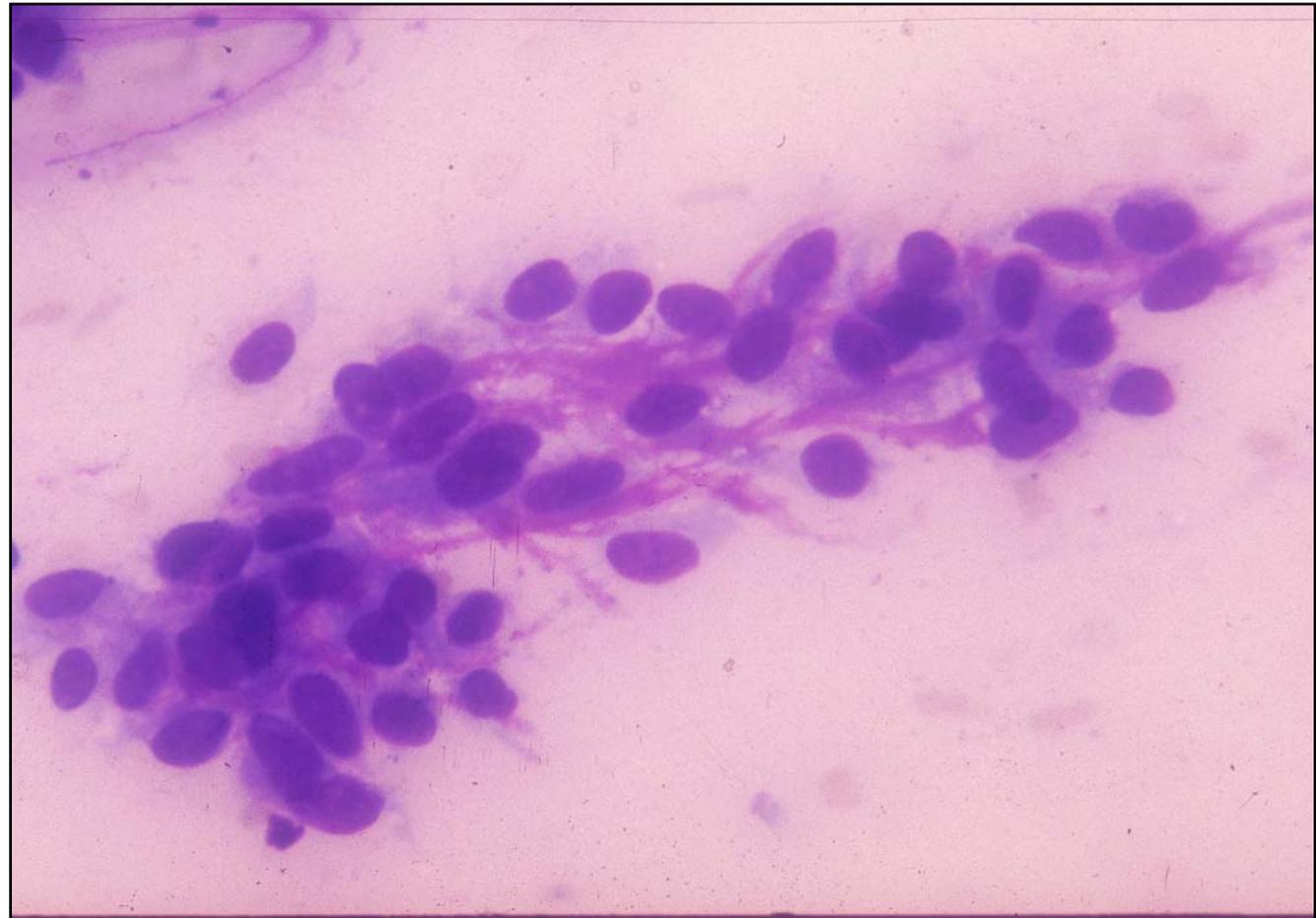
5- Margini

indistinti

6- Sostanza

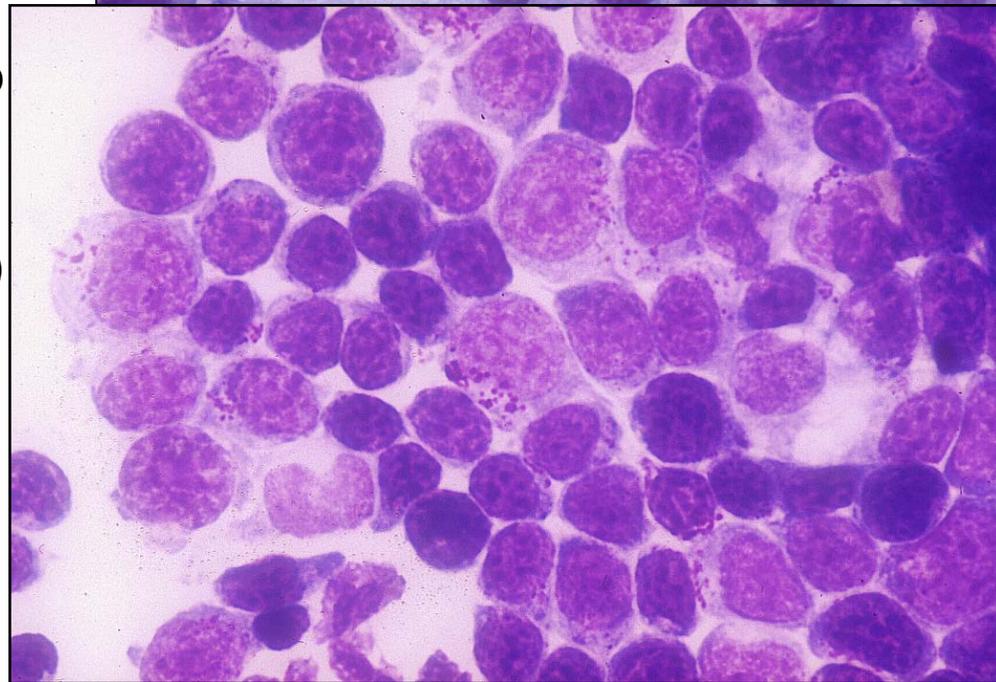
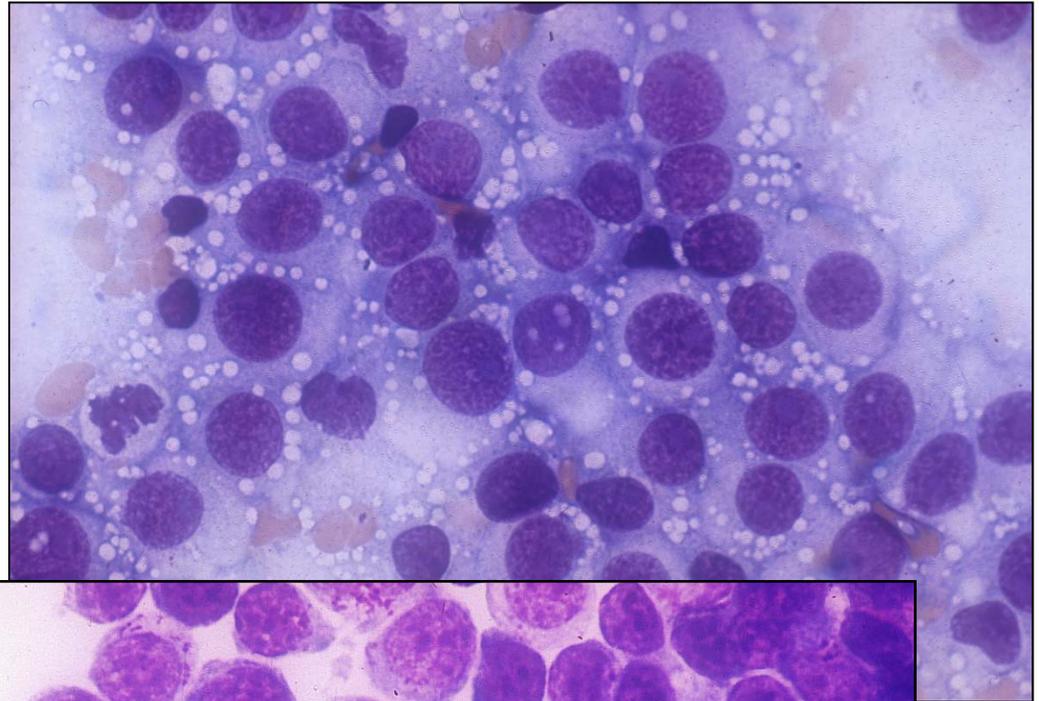
fondamentale

7- Subclassificazione (non comune)

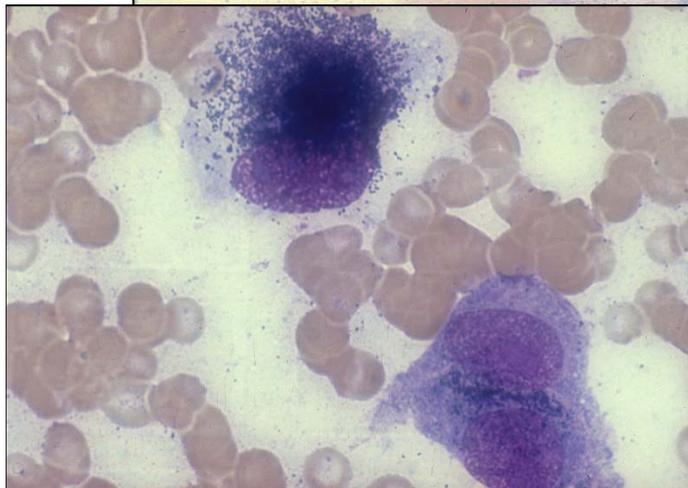
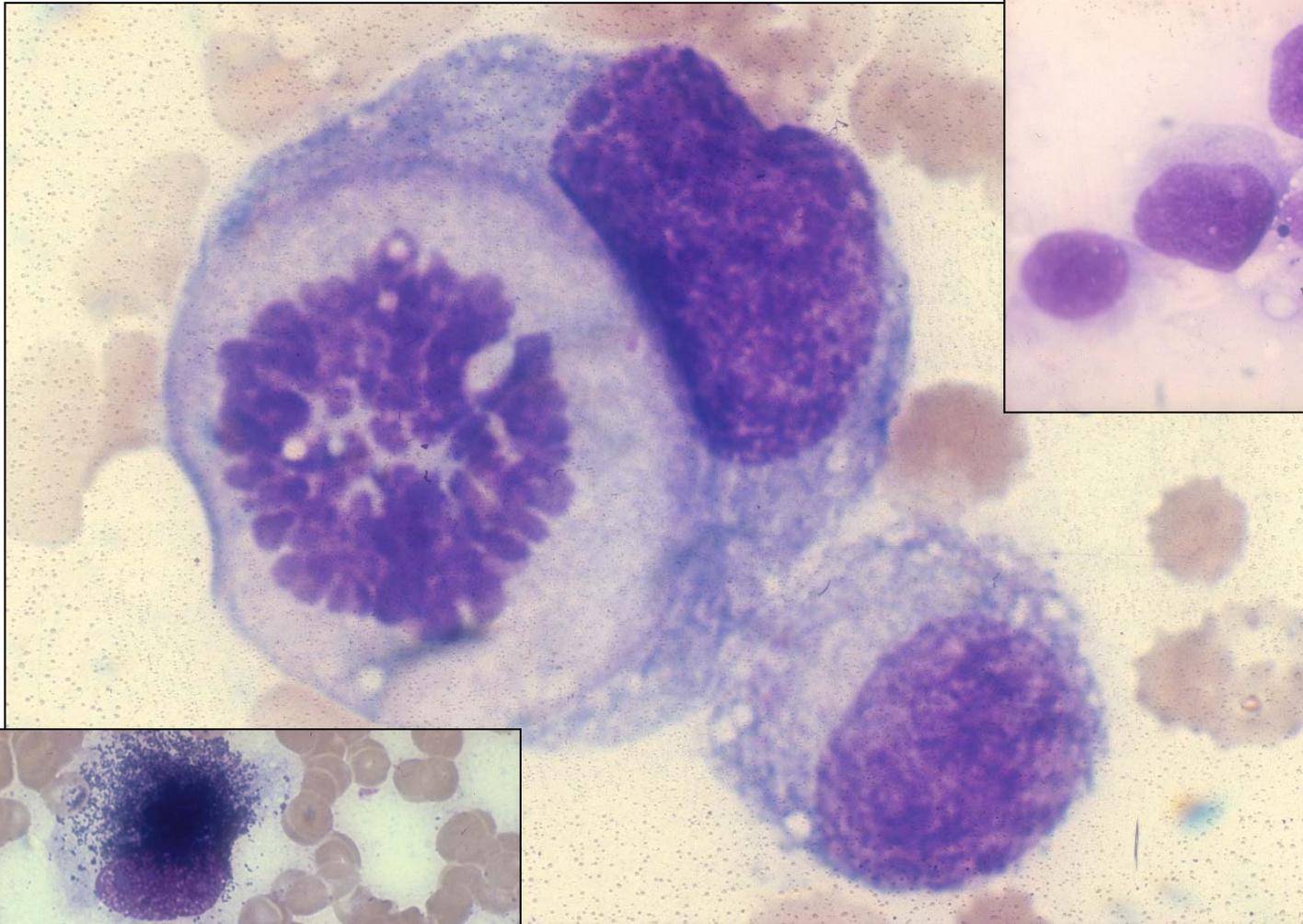


Tumori a cellule rotonde

- 1- Cellularità buona
- 2- Cellule singole (tappeto)
- 3- Cellule rotonde
- 4- Nucleo rotondo
- 5- Margini distinti
- 6- Criteri di malignità (poco utili)
- 7- Subclassificazione (facile)



Tumori a cellule “non definibili”



Si parla di «neoplasie indifferenziate».

Attenzione: nel cavo orale di cani spesso si tratta di tumori dei melanociti che, nelle forme più comuni e diagnosticabili facilmente, sono caratterizzati da granuli di pigmento nerastro nel citoplasma

Benigno o maligno?

CRITERI DI MALIGNITA'

A- generali

B- nucleari

C- citoplasmatici

***More than 3 nuclear criteria of malignancy in many cells = MALIGNANCY**

***1-3 nuclear criteria of malignancy in some cells = MALIGNANCY, BENIGN NEOPLASIA, HYPERPLASIA with DISPLASIA**

***<1 nuclear criteria of malignancy = BENIGN NEOPLASIA, HYPERPLASIA, but does not rule out MALIGNANCY**

Cowell *et al.*: Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat, 1999

Regola poco efficace!

Criteria di malignità

- Macroцитоси**
- Anisocитоси**
- Macrocariosi**
- Anisocariosi**
- Discariosi**
-
- Generali**
- Nucleari**
-

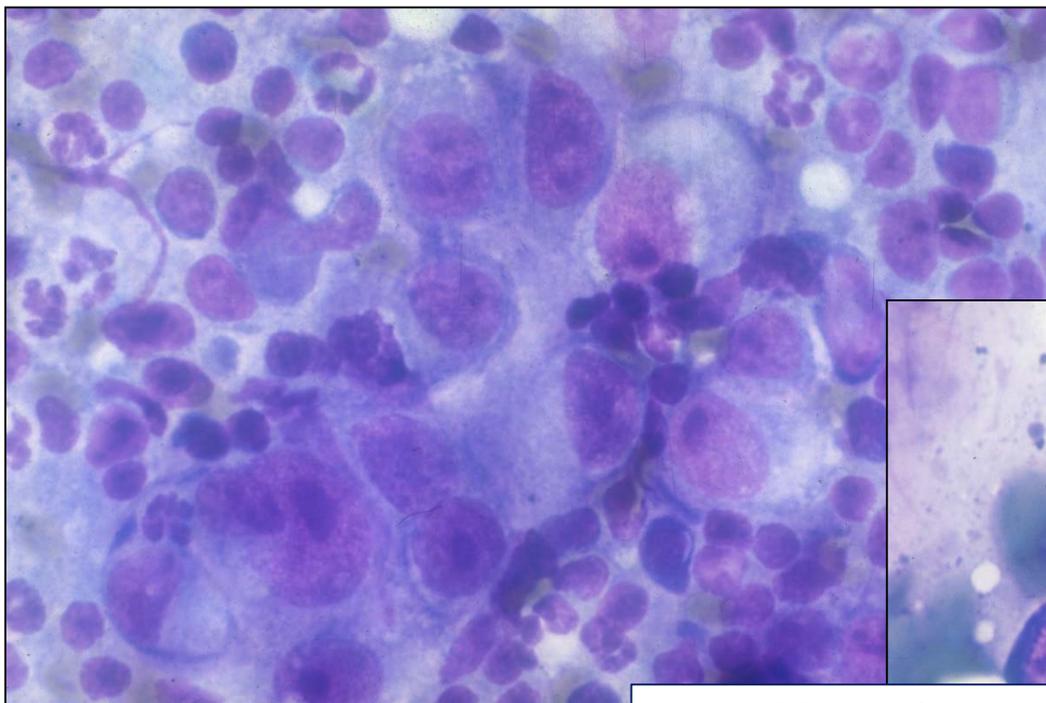
1- Infallibili

2- Buoni

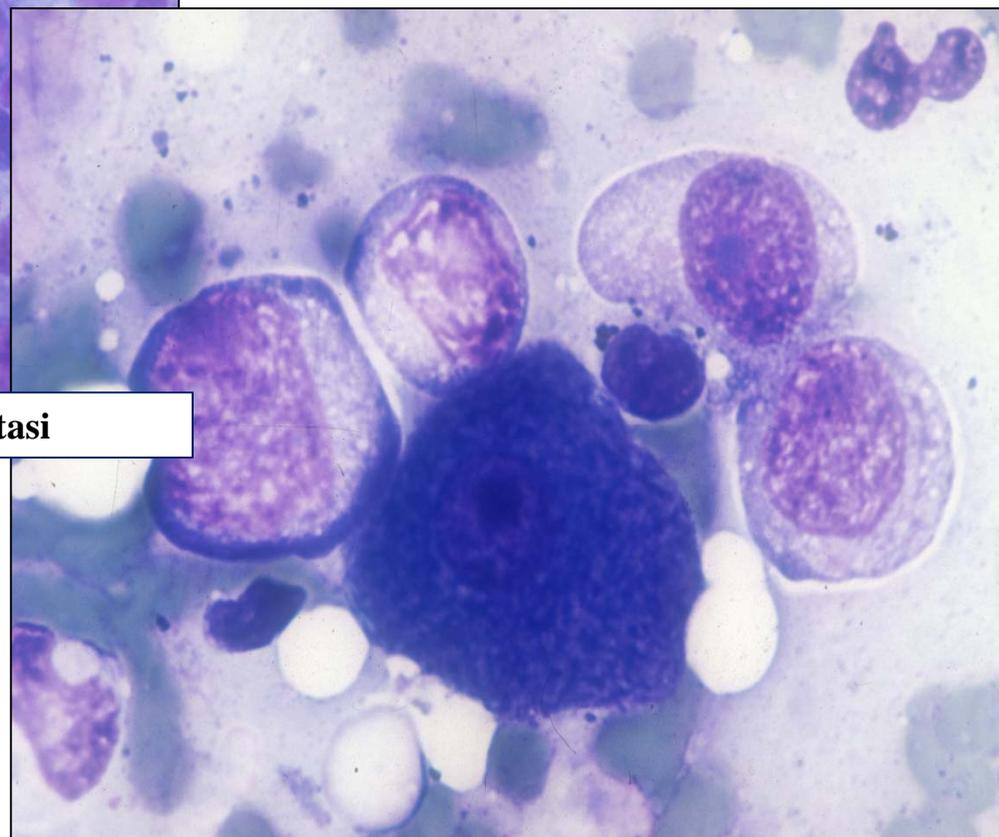
3- Inutili

Criteria di malignità infallibili

Sede anomala



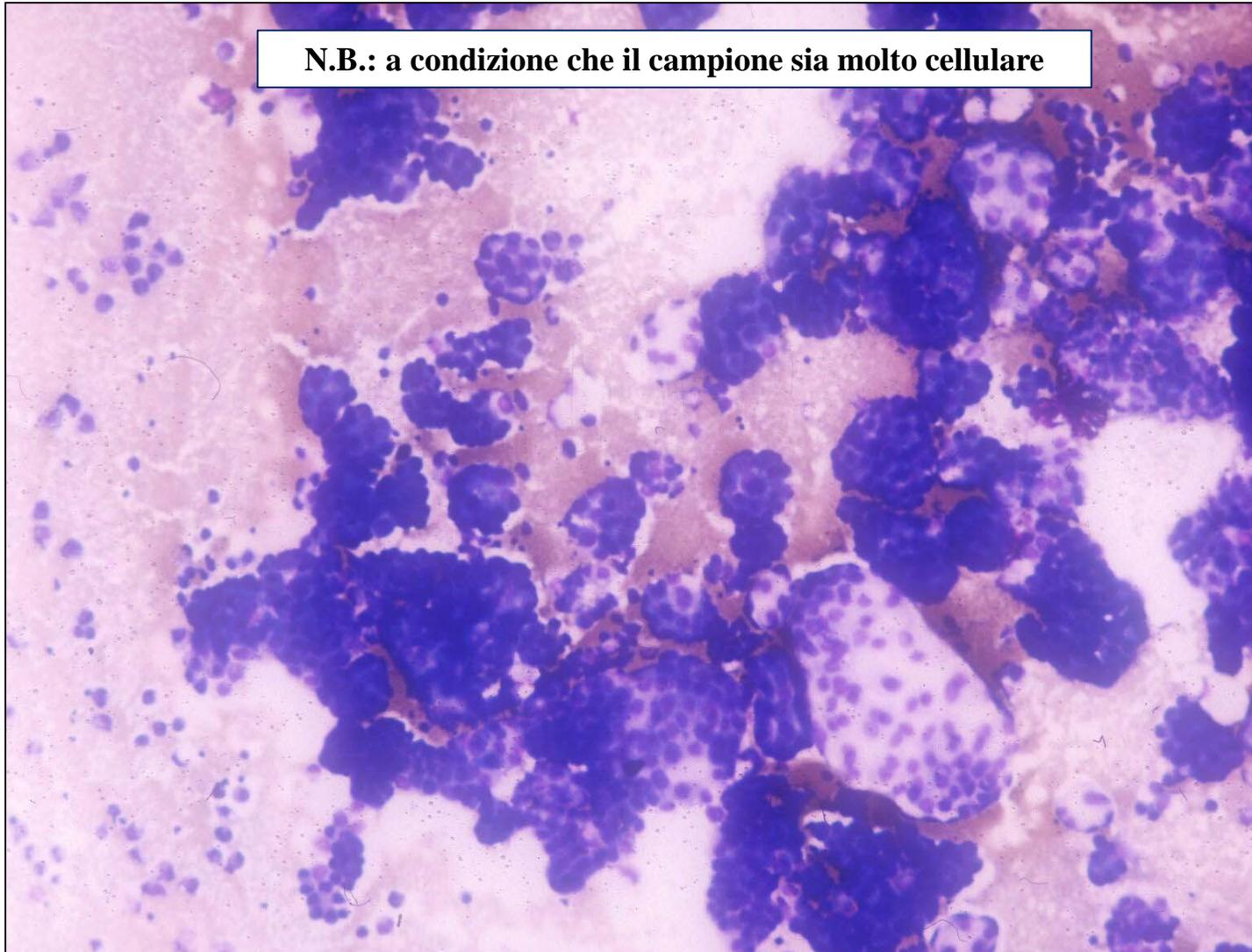
Metastasi



Criteri di malignità infallibili

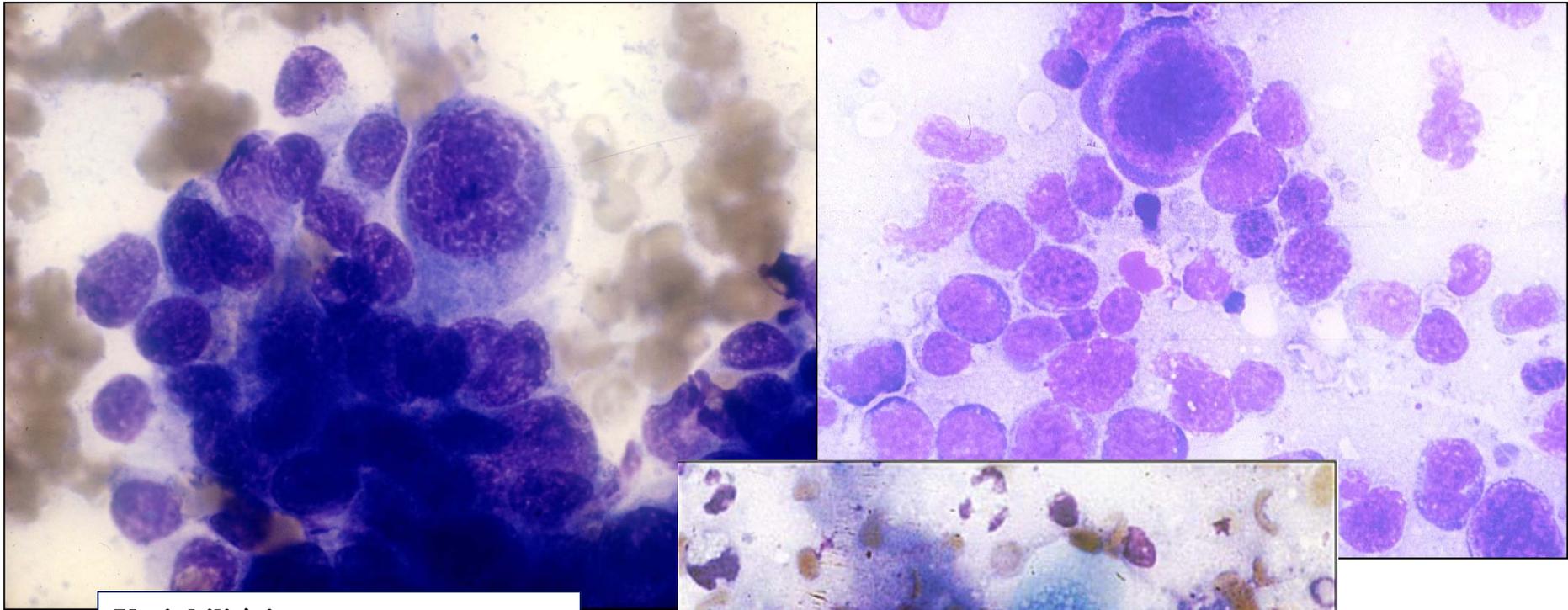
Assenza di flogosi (NB solo nei versamenti!)

N.B.: a condizione che il campione sia molto cellulare



Criteri di malignità buoni

VARIABILITA'...delle cellule



Variabilità in:

-dimensioni

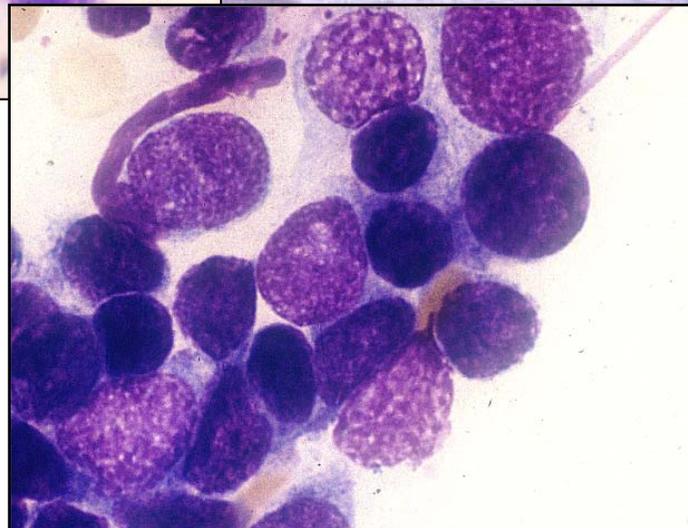
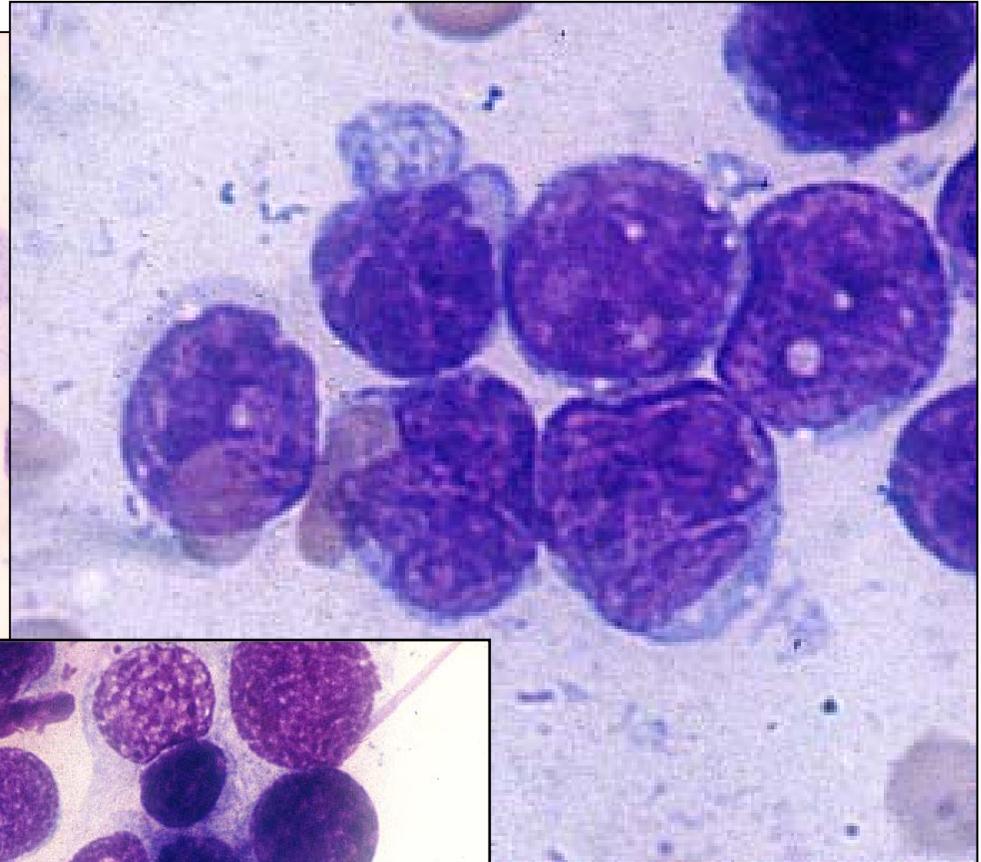
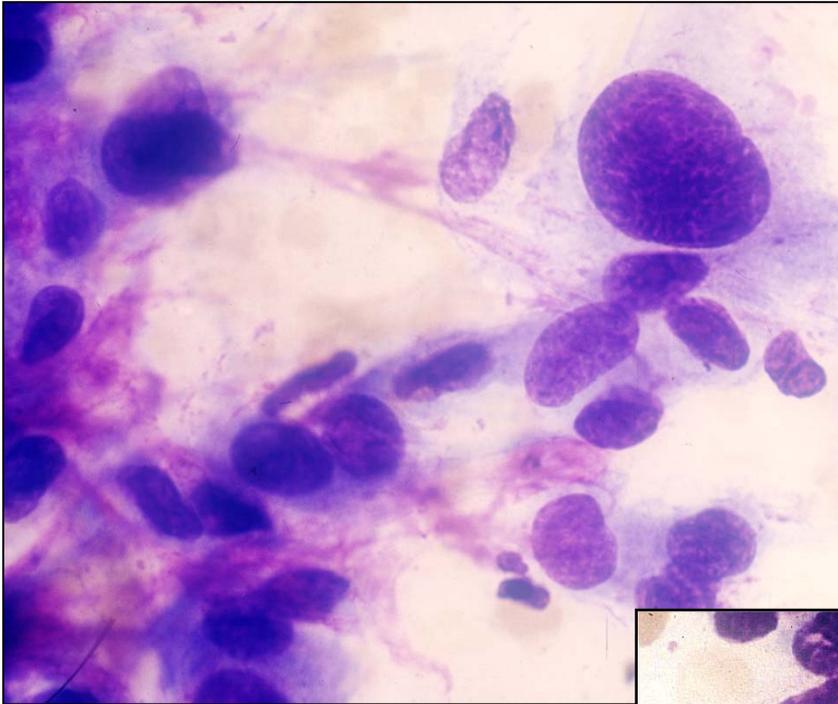
-forma

-rapporto nucleo/citoplasmatico

Inoltre: dimensioni eccessive

Criteri di malignità buoni

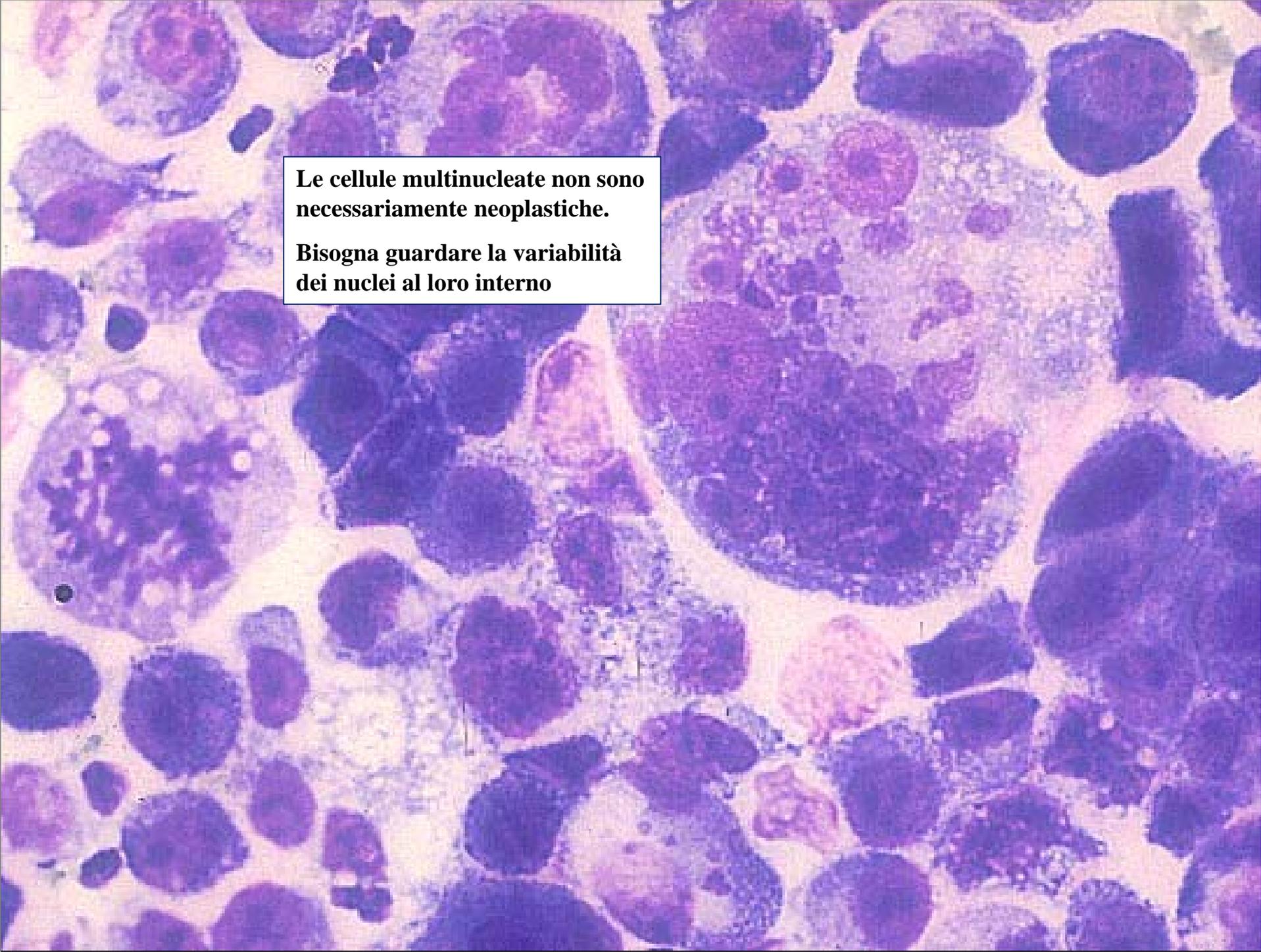
VARIABILITA'...del nucleo



Variabilità in:

-dimensioni

-forma

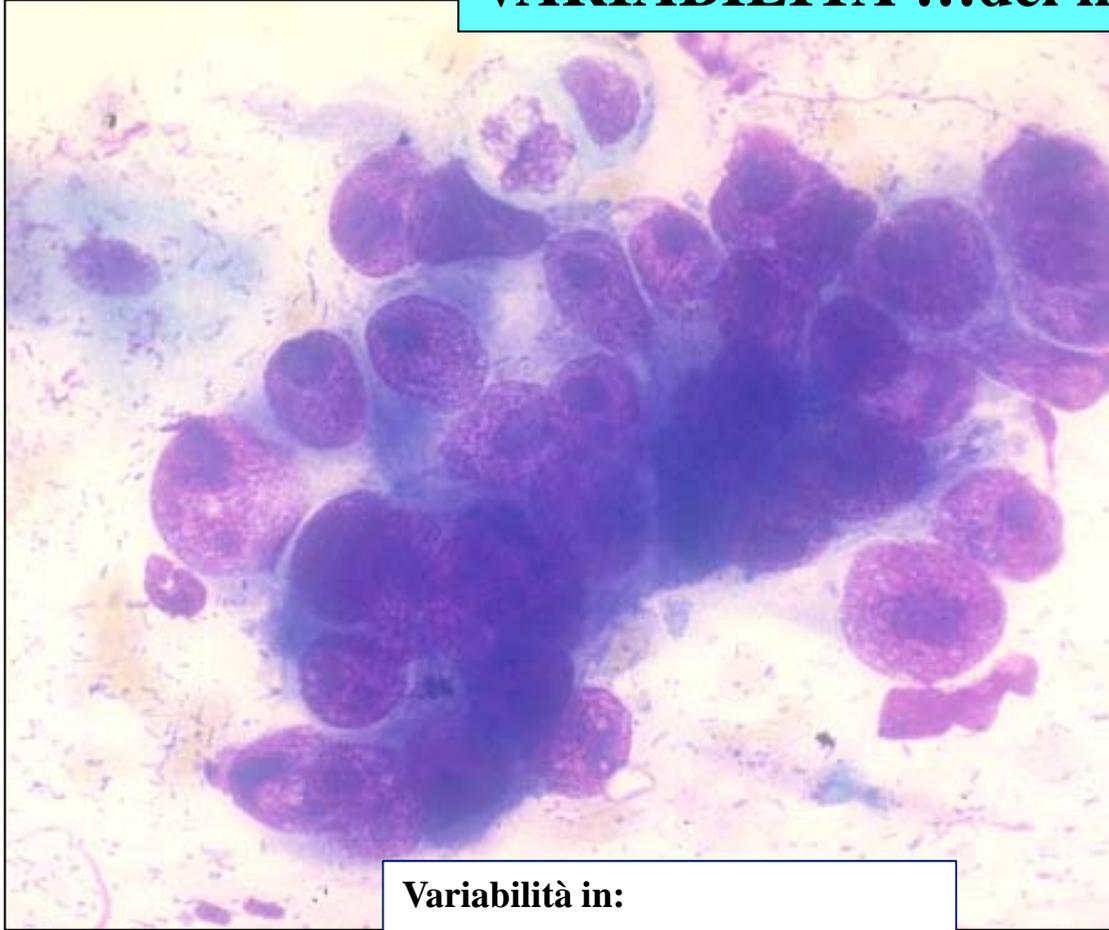


Le cellule multinucleate non sono necessariamente neoplastiche.

Bisogna guardare la variabilità dei nuclei al loro interno

Criteri di malignità buoni

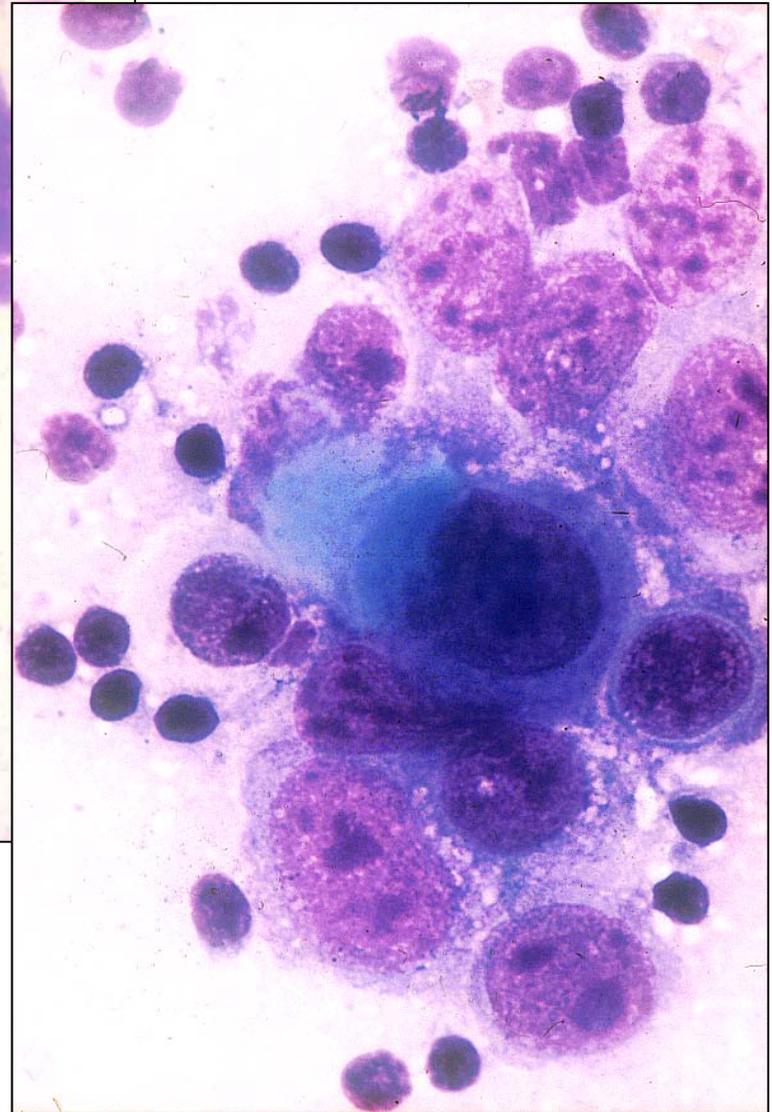
VARIABILITA'...del nucleolo



Variabilità in:

- dimensioni**
- forma**
- numero**

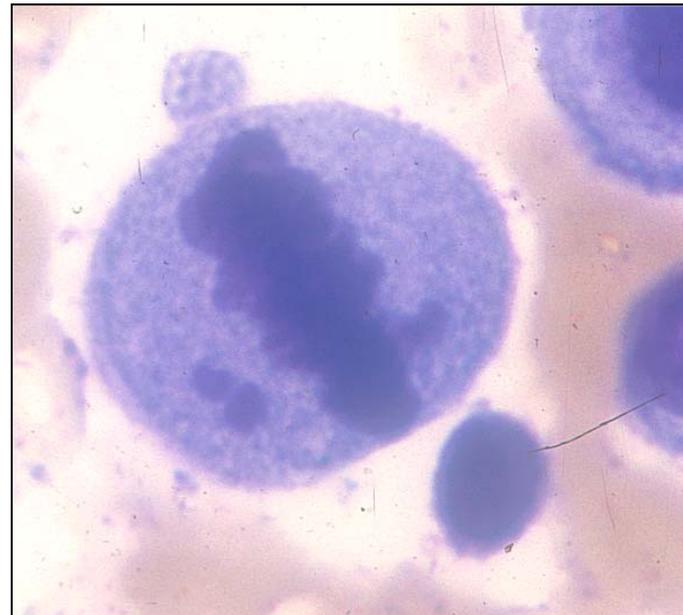
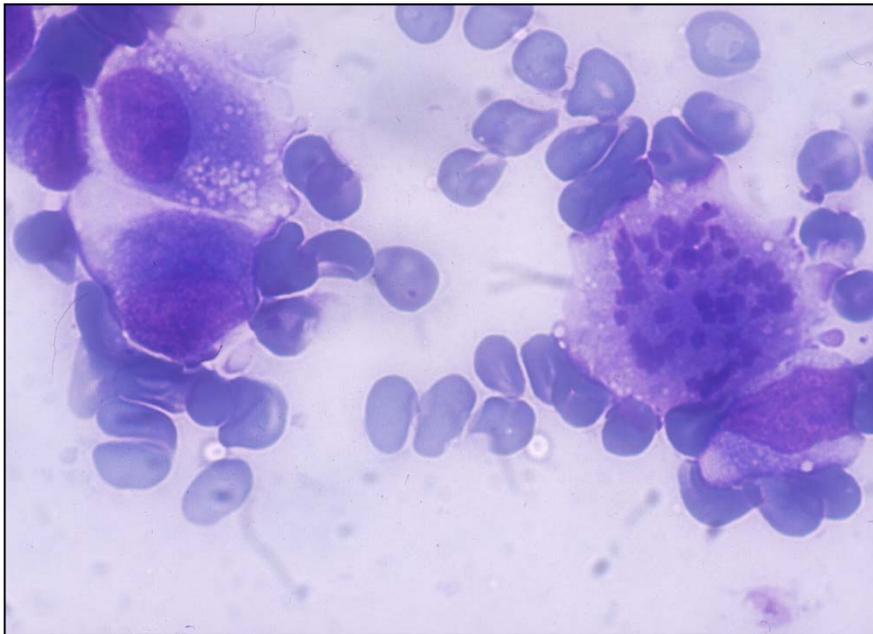
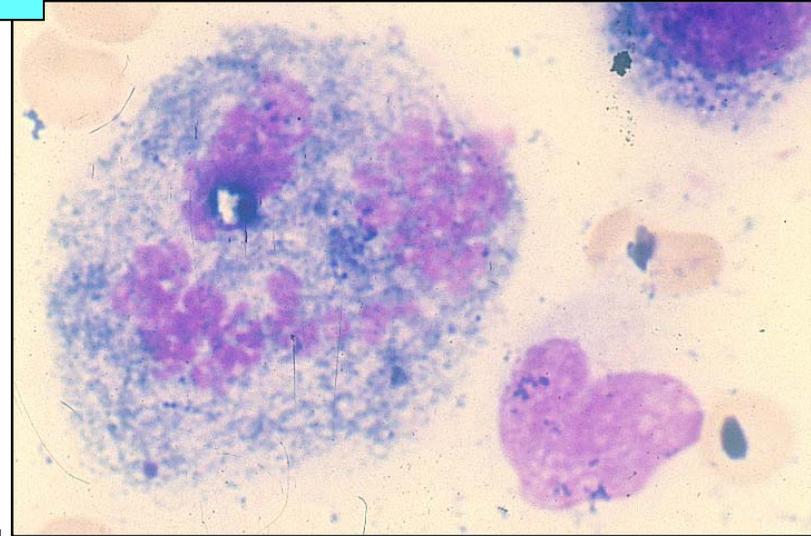
Inoltre: dimensioni eccessive



Criteria di malignità buoni

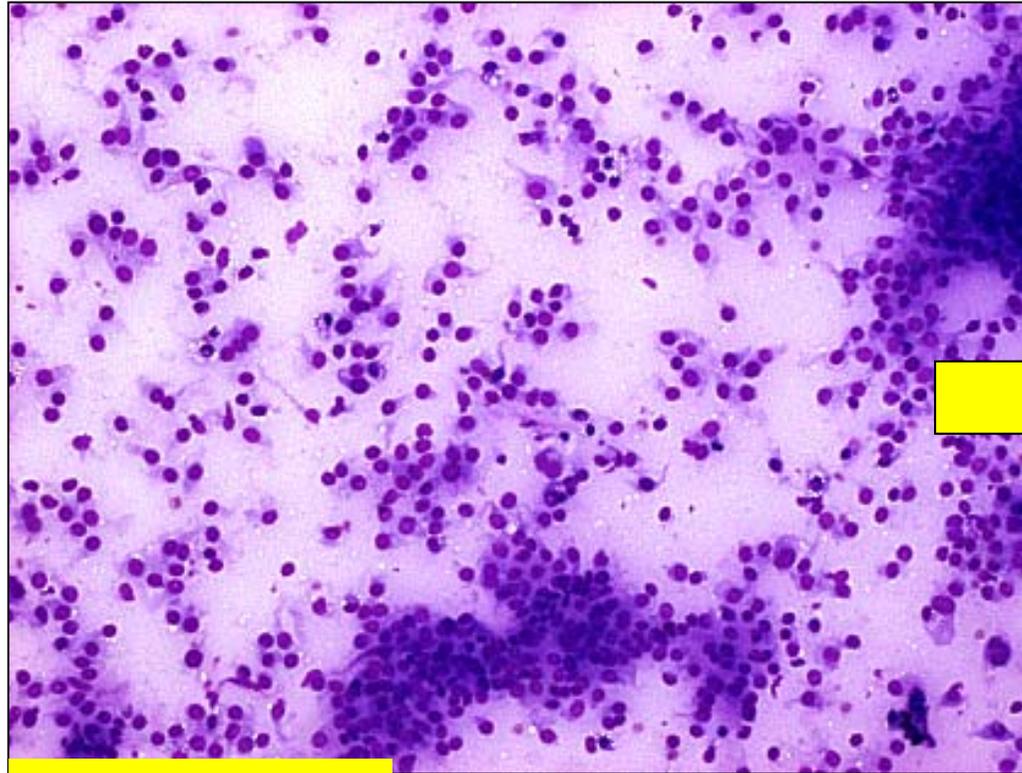
Mitosi (aumentate, anormali)

Le mitosi devono essere «atipiche» (es. a scoppio, tripolari, irregolari...)



Criteria di malignità buoni

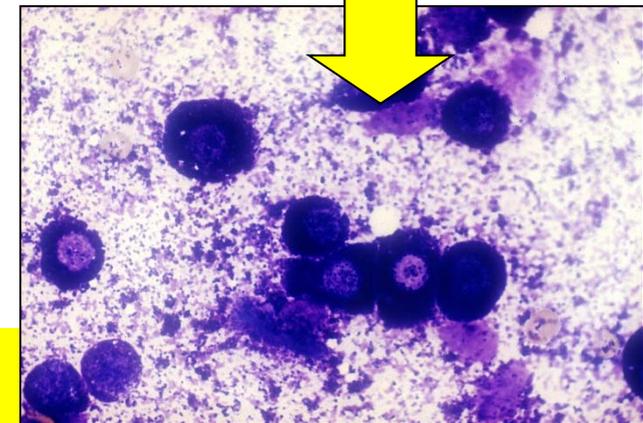
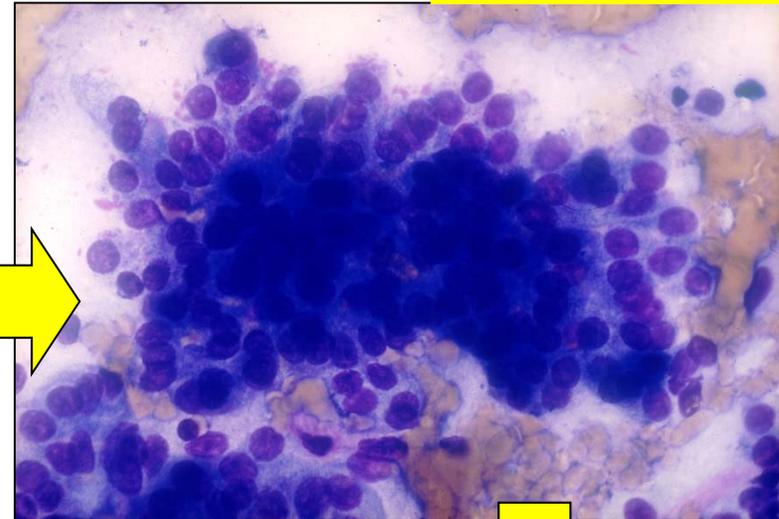
Cellularità



Fusate

La cellularità può essere un segno di malignità nei tumori a cellule fusate. Scarso o nullo il significato negli altri citotipi.

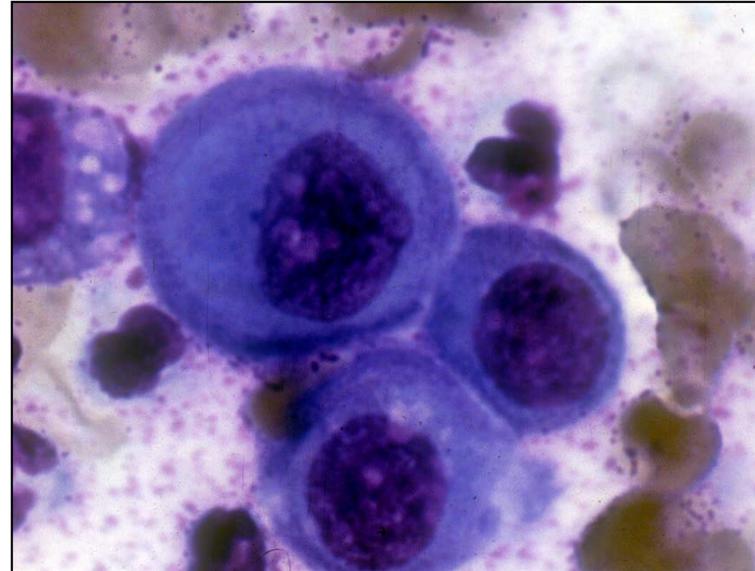
Epitelio



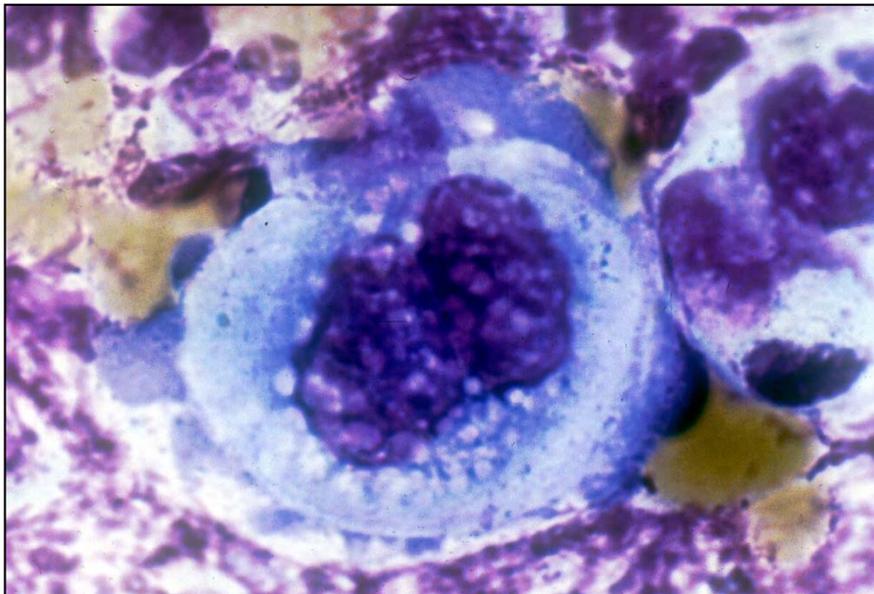
Rotonde

Criteria di malignità inutili

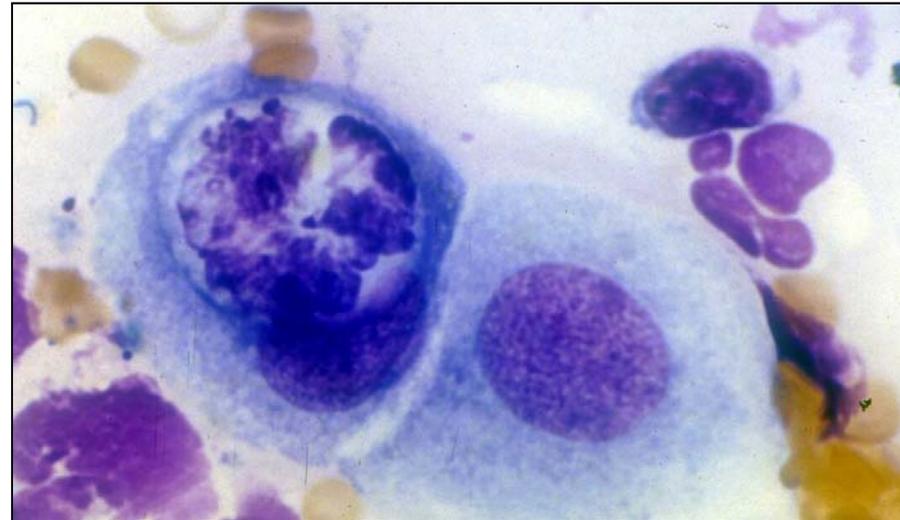
Citoplasma



1- Iperbasofilia

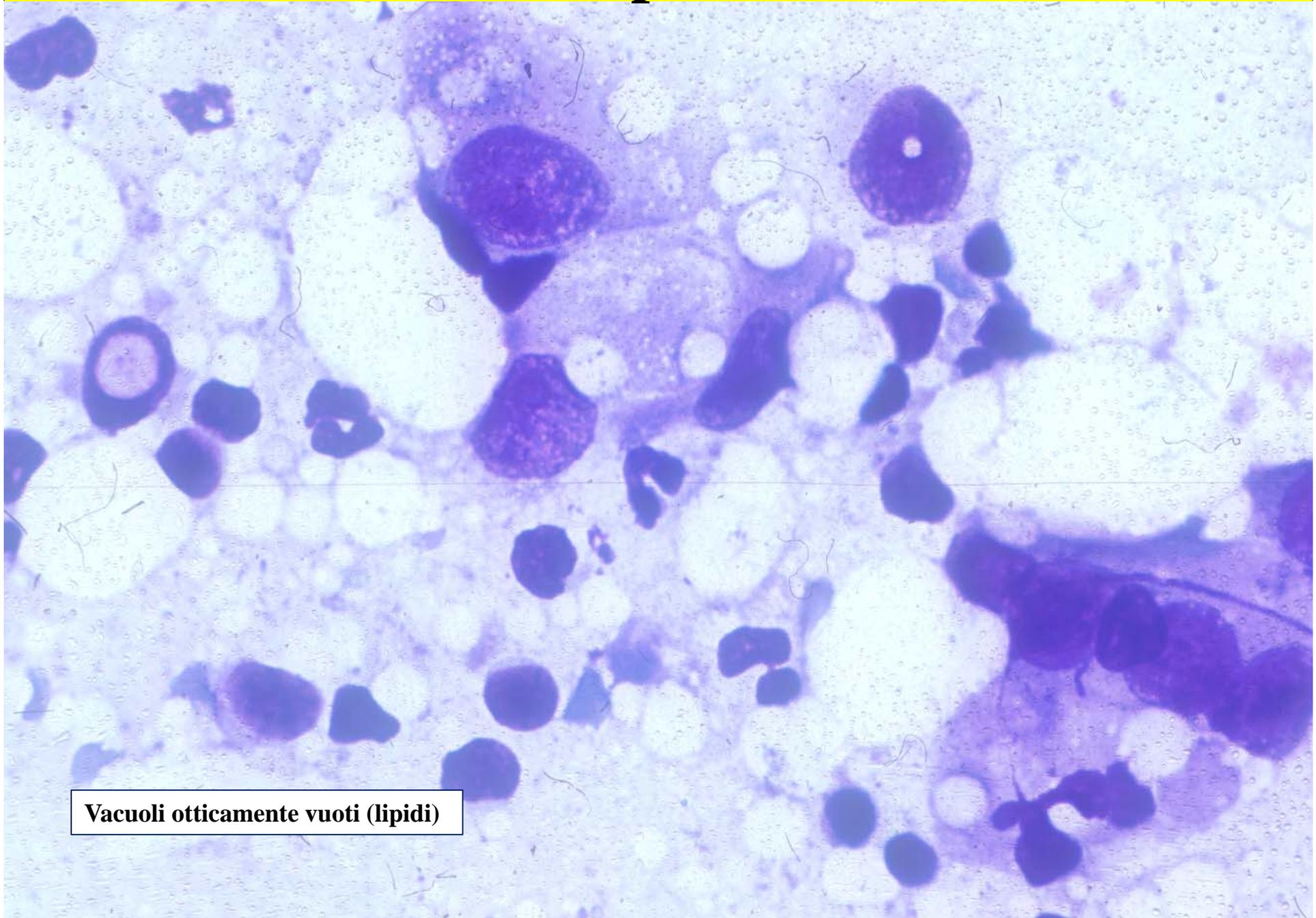


2- Vacuoli

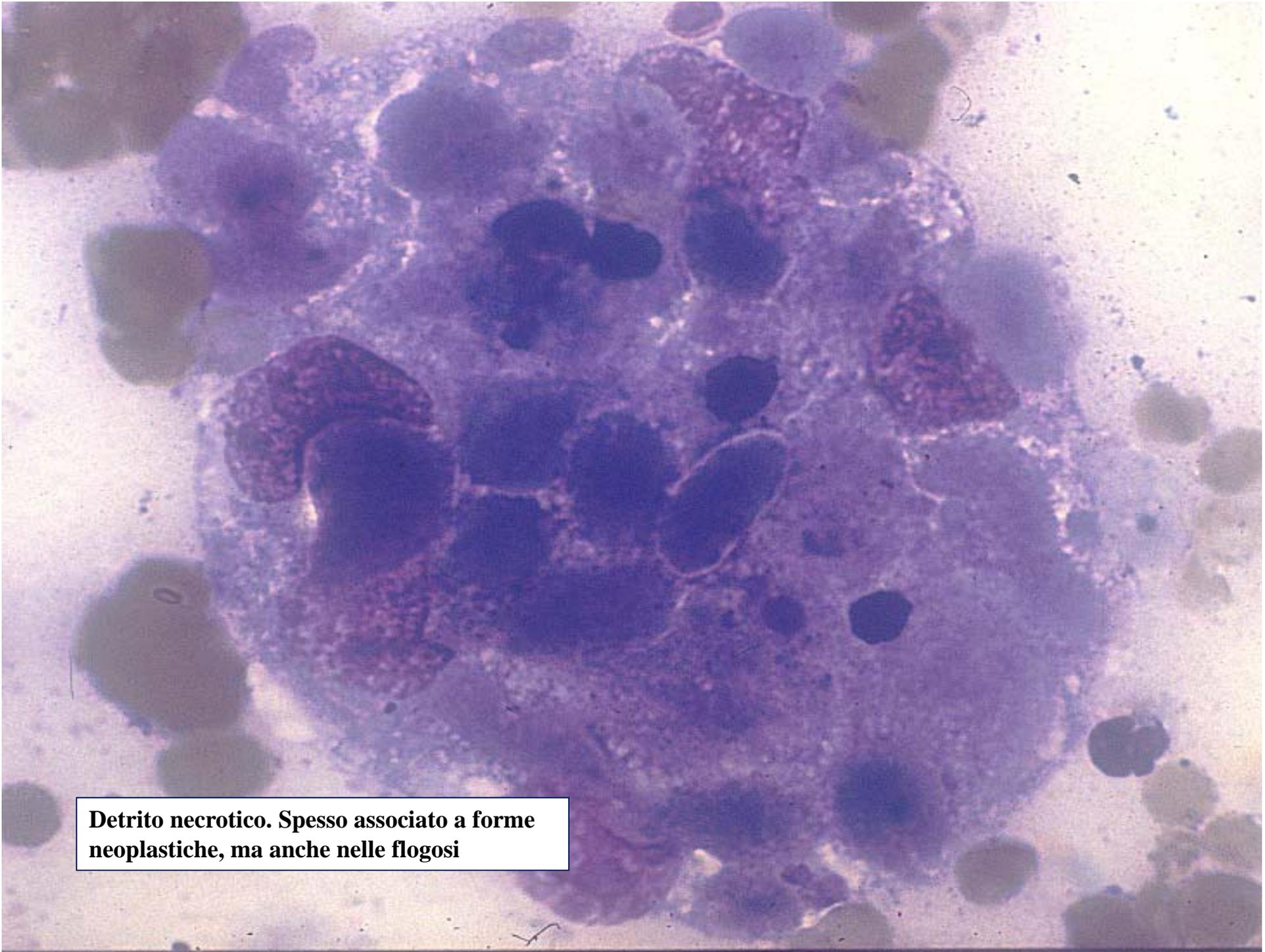


3- Cannibalismo

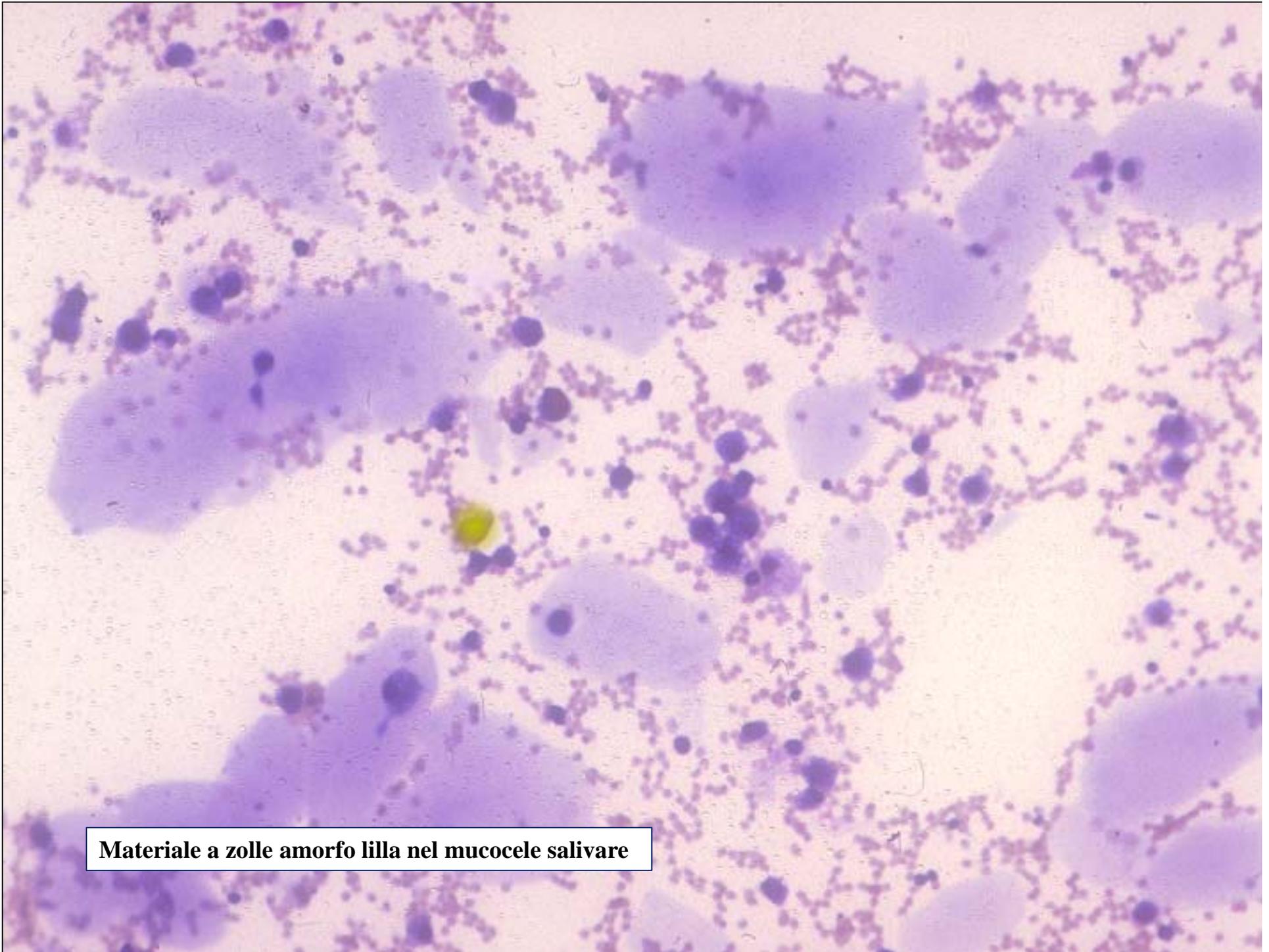
5- Valuta la componente acellulare



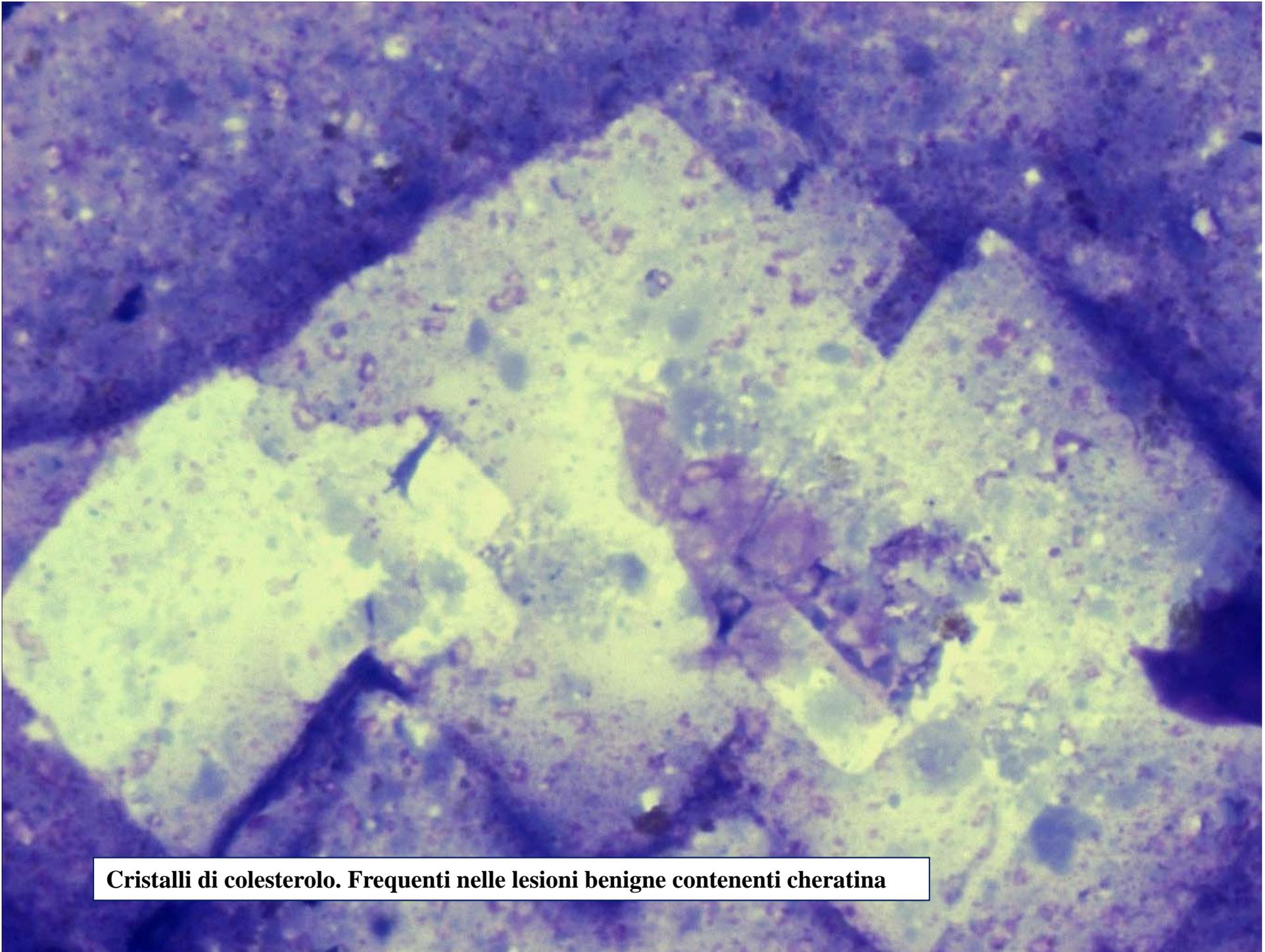
Vacuoli otticamente vuoti (lipidi)



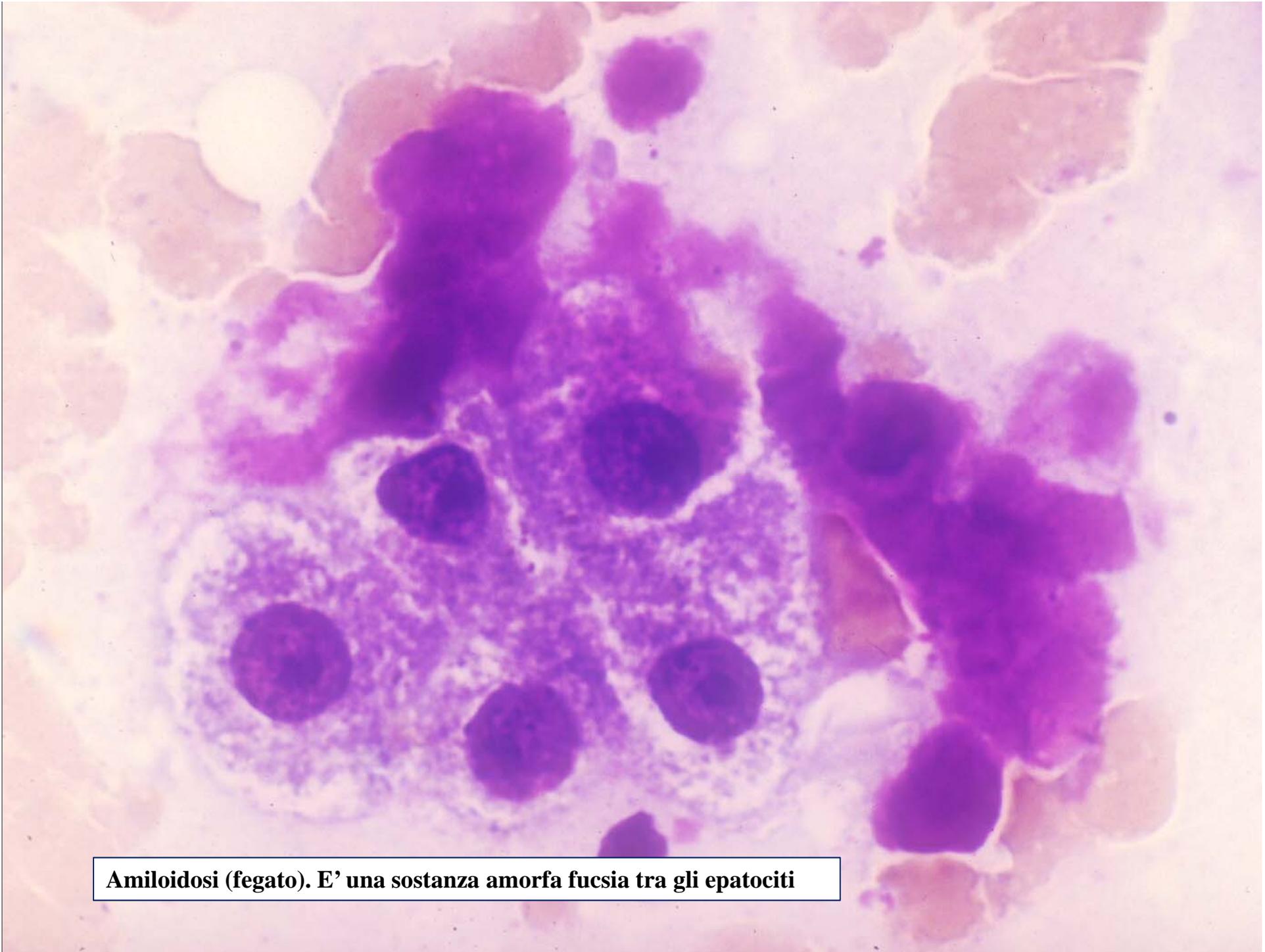
Detrito necrotico. Spesso associato a forme neoplastiche, ma anche nelle flogosi



Materiale a zolle amorfo lilla nel mucocele salivare

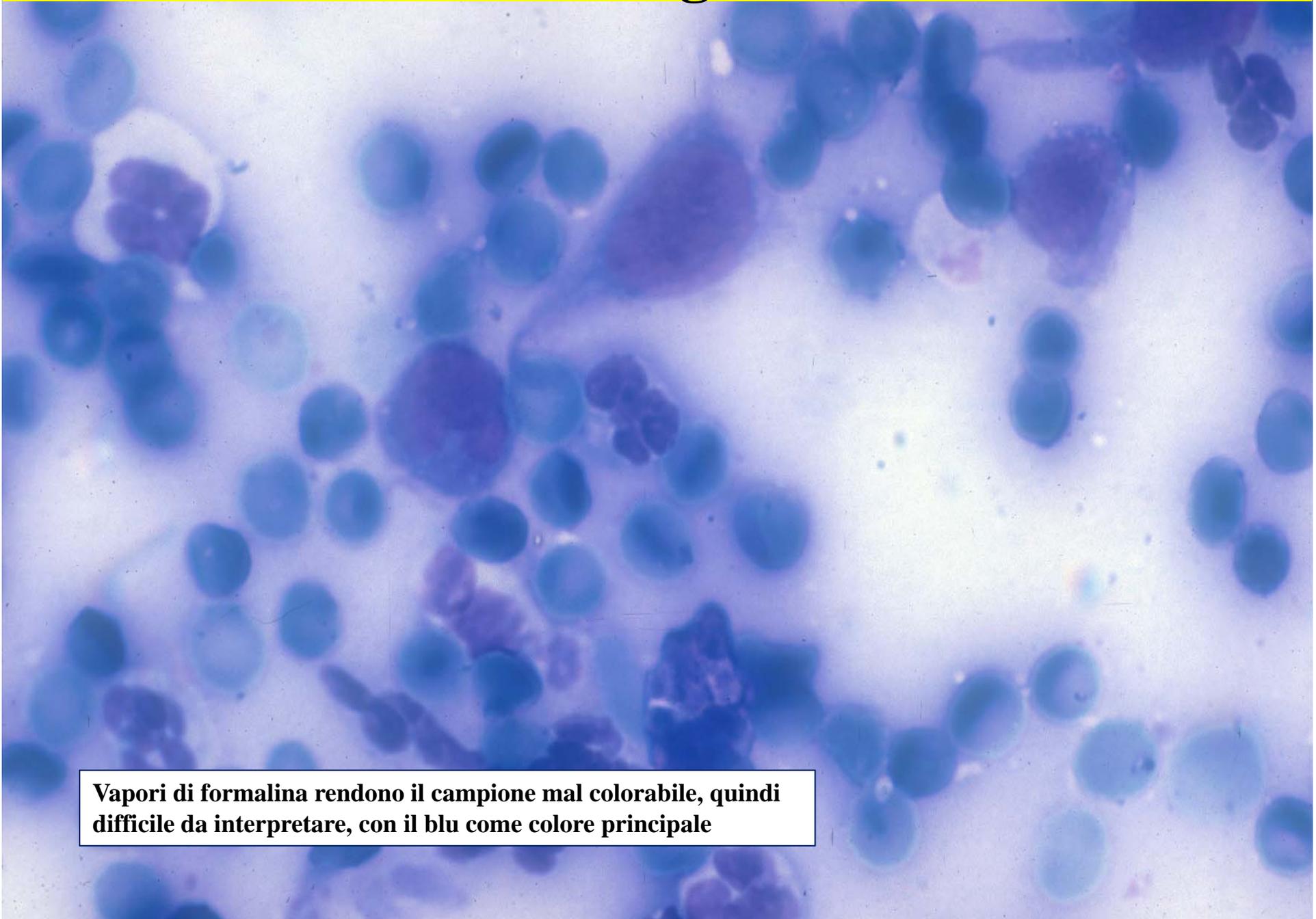


Cristalli di colesterolo. Frequenti nelle lesioni benigne contenenti cheratina

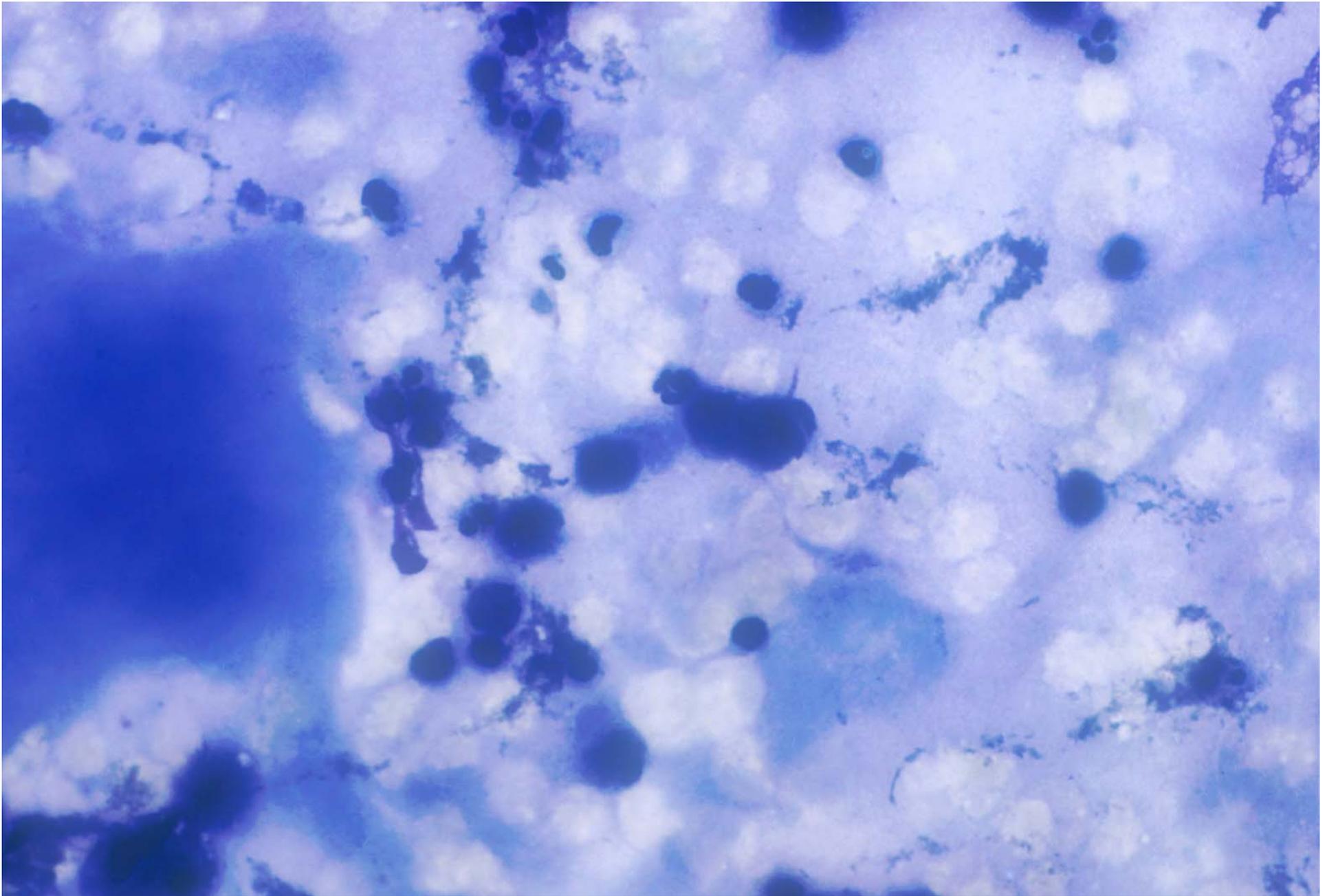


Amiloidosi (fegato). E' una sostanza amorfa fucsia tra gli epatociti

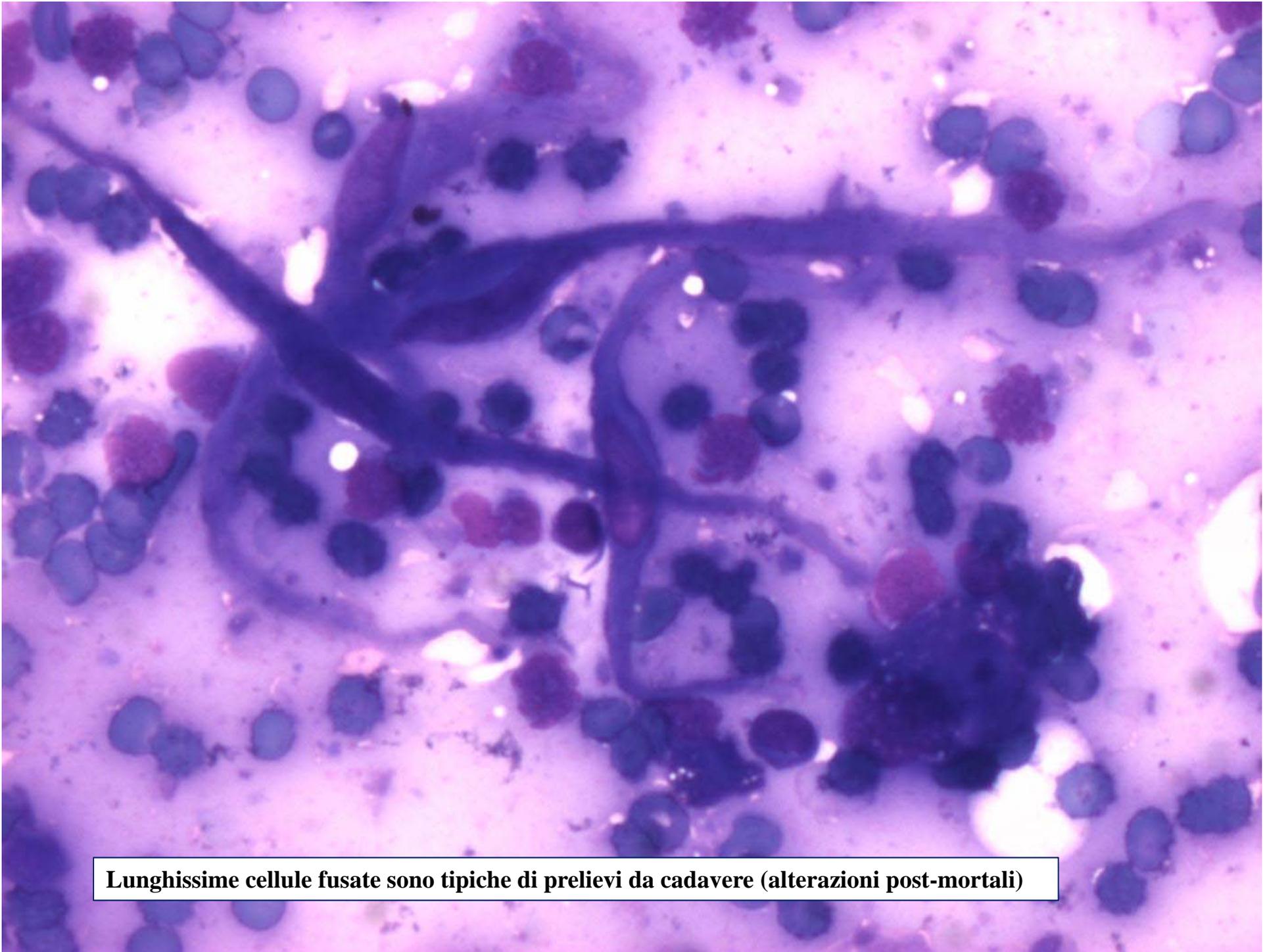
6- Riconosci gli artefatti



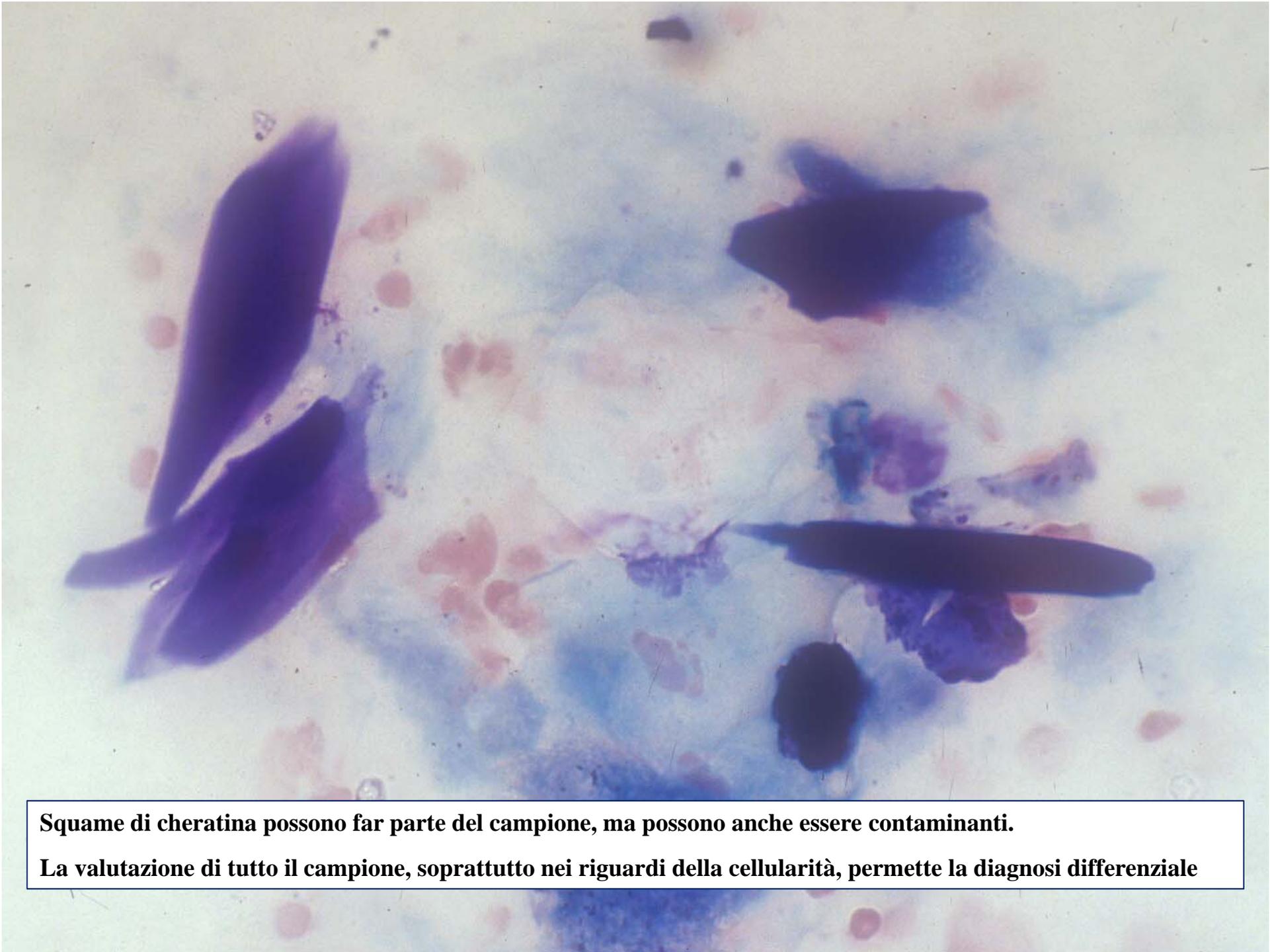
Vapori di formalina rendono il campione mal colorabile, quindi difficile da interpretare, con il blu come colore principale



In vetrini che si asciugano lentamente le cellule sono coartate e «sembrano» linfociti in quanto non si legge il citoplasma. In questo caso sono in realtà macrofagi.

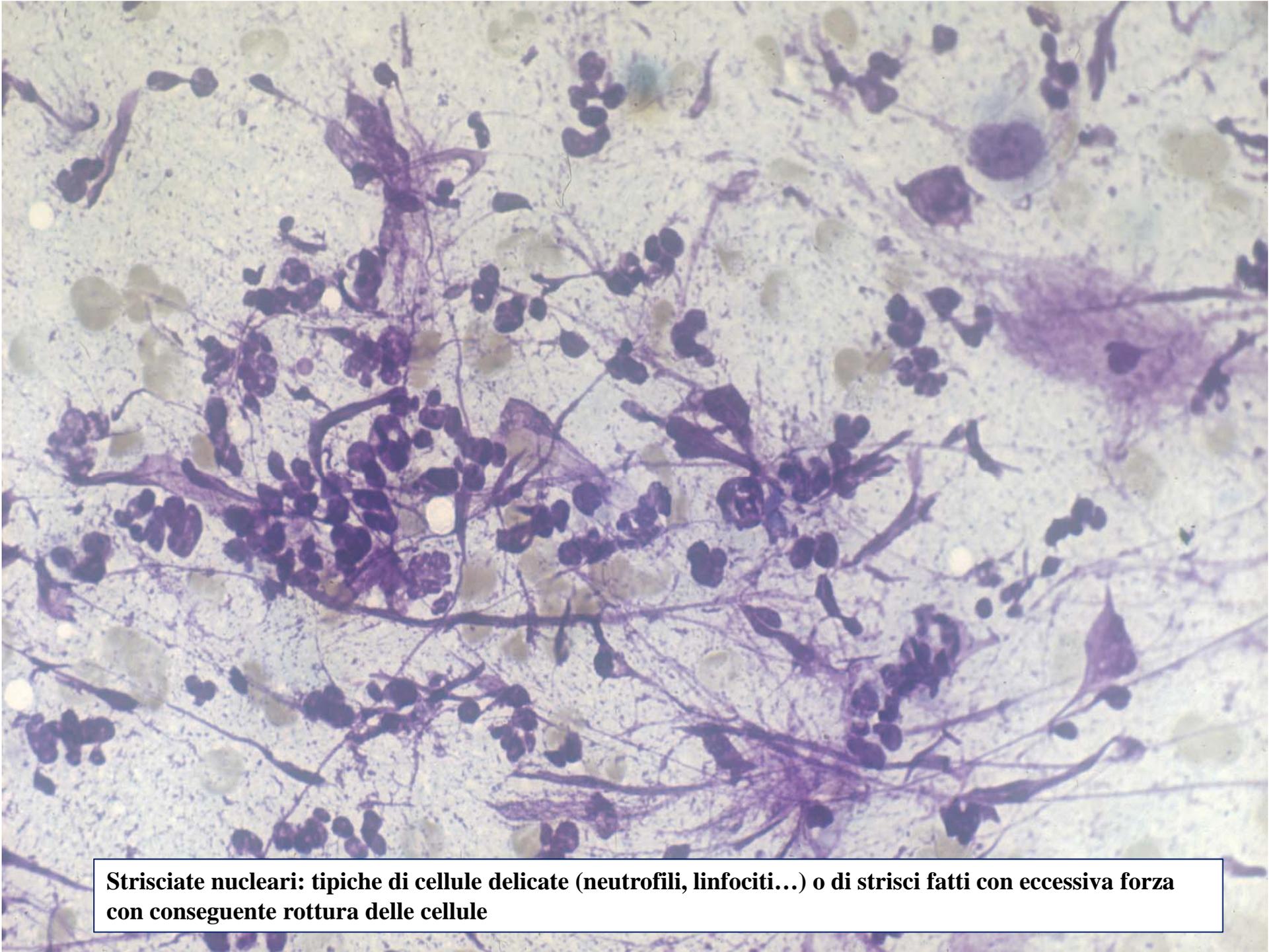


Lunghissime cellule fusate sono tipiche di prelievi da cadavere (alterazioni post-mortali)

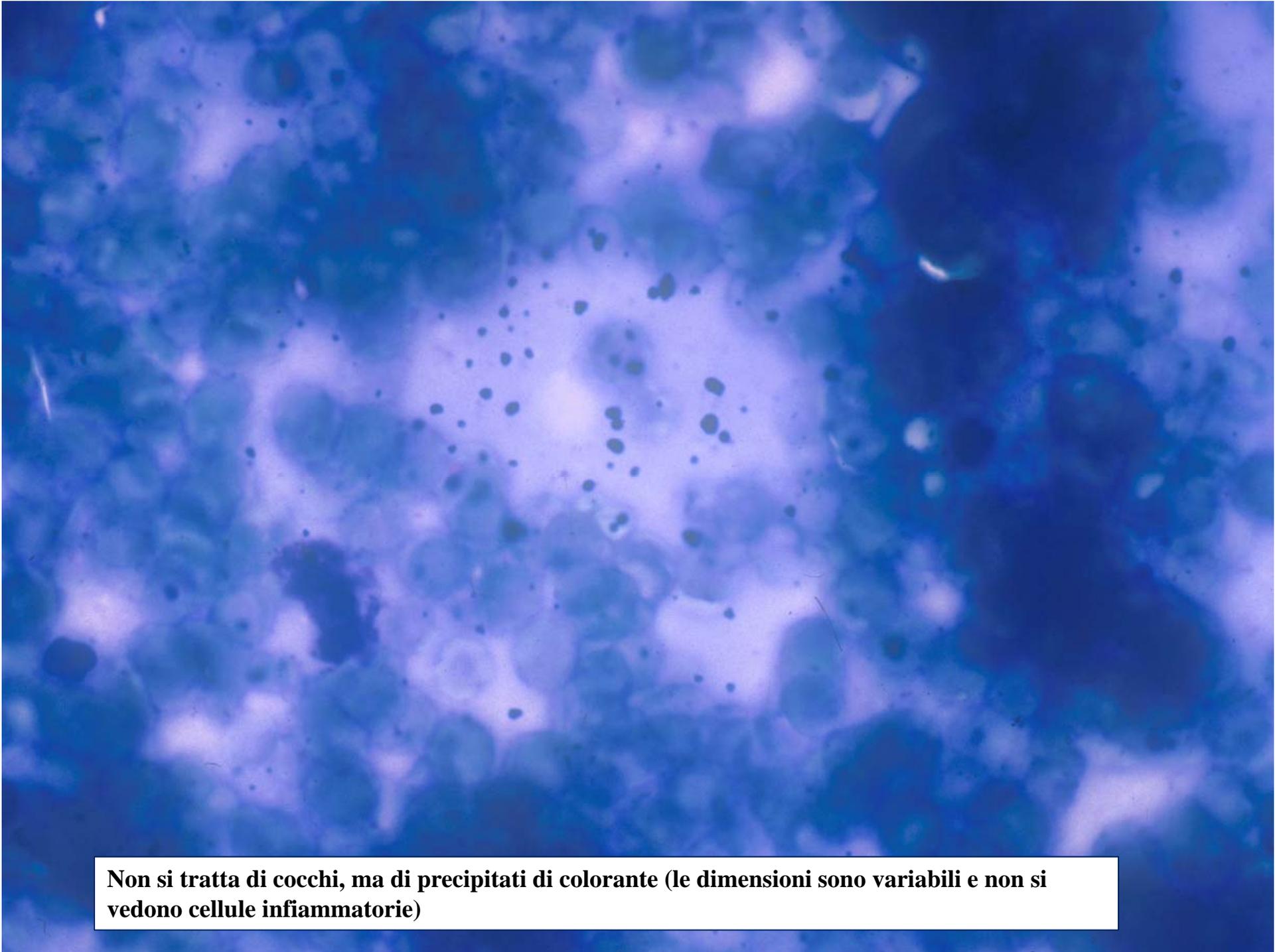


Squame di cheratina possono far parte del campione, ma possono anche essere contaminanti.

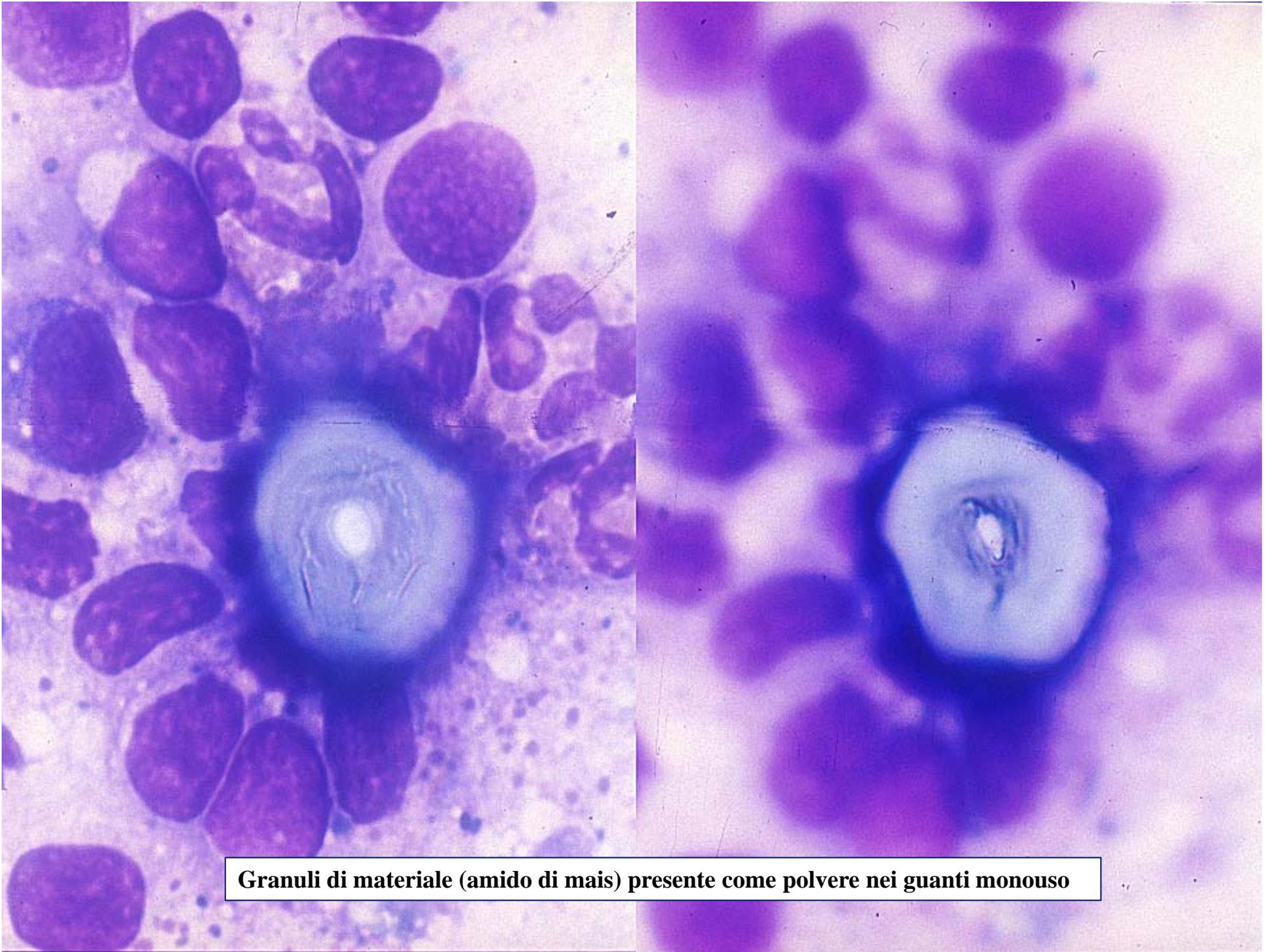
La valutazione di tutto il campione, soprattutto nei riguardi della cellularità, permette la diagnosi differenziale



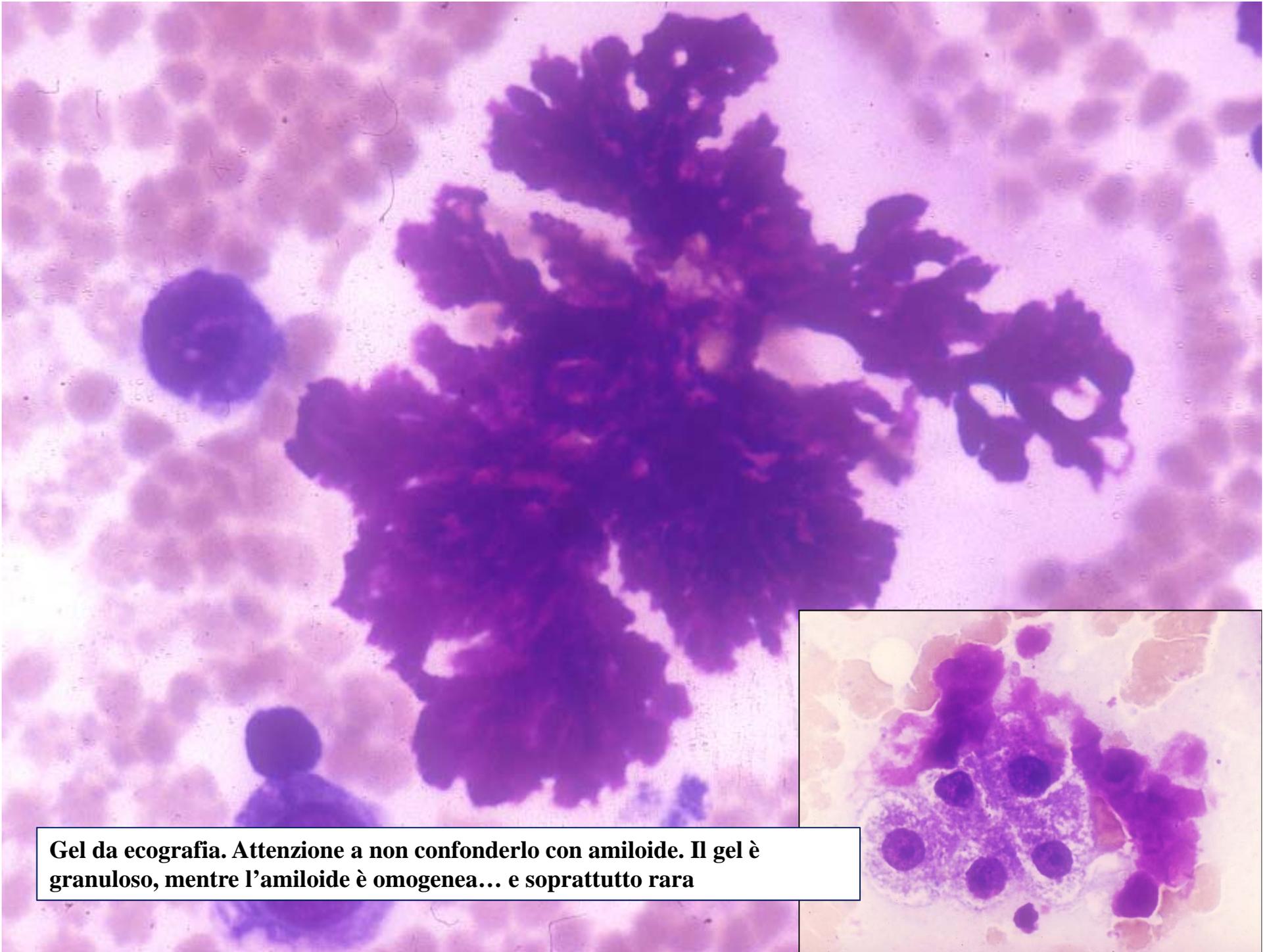
Strisciate nucleari: tipiche di cellule delicate (neutrofili, linfociti...) o di strisci fatti con eccessiva forza con conseguente rottura delle cellule



Non si tratta di cocci, ma di precipitati di colorante (le dimensioni sono variabili e non si vedono cellule infiammatorie)



Granuli di materiale (amido di mais) presente come polvere nei guanti monouso



Gel da ecografia. Attenzione a non confonderlo con amiloide. Il gel è granuloso, mentre l'amiloide è omogenea... e soprattutto rara