



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in
Tecniche di Laboratorio Biomedico

**METODICA DI COLORAZIONE
CITOLOGICA DEI LIQUIDI BIOLOGICI
PRE-CITOCENTRIFUGAZIONE**

Relatore:

Dott. Raffaele Sabbatini

Tesi di Laurea di:

Alice Catalano

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

1. SCOPO DELLA TESI	2
2. INTRODUZIONE	2
3. MODALITA' DI RACCOLTA DEI LIQUIDI BIOLOGICI	4
3.1 TORACENTESI.....	4
3.2 PARACENTESI	5
3.3 PERICARDIOCENTESI.....	6
3.4 URINE	7
4. MATERIALI E METODI	8
4.1 CATEGORIZZAZIONE CITOLOGICA.....	9
4.2 PROCEDURA ALLESTIMENTO CAMPIONI.....	10
4.3 I COLORANTI.....	12
4.3.1 BLU DI TOLUIDINA	12
4.3.2 EMATOSSILINA DI GILL.....	12
4.3.3 MAY-GRUNWALD GIEMSA	13
4.3.4 ROSSO NUCLEO	14
4.4 COLORAZIONE CITOLOGICA STANDARD	14
4.5 IMMUNOCITOCHIMICA	16
5. RISULTATI OTTENUTI.....	18
5.1 CAMPIONI CITOLOGICI ANALIZZATI	19
6. DISCUSSIONE.....	35
7. CONCLUSIONE	37
8. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	38
9. RINGRAZIAMENTI	40

1. SCOPO DELLA TESI

Il nostro obiettivo è stato quello di predisporre una tecnica rapida di allestimento dei liquidi biologici per esame citologico che consenta di ottenere un primo orientamento diagnostico.

La tecnica che abbiamo elaborato consiste nell'eseguire una colorazione citologica sul campione appena prelevato prima che questo venga citocentrifugato e fissato.

La tecnica sviluppata consente di eseguire sullo stesso preparato citologico le tecniche ancillari riducendo notevolmente i tempi di refertazione.

2. INTRODUZIONE

La citologia è la branca della biologia che studia la cellula dal punto di vista morfologico e funzionale [1].

Gli approcci della citologia sono sia a livello microscopico che molecolare.

Attraverso lo studio morfologico del nucleo e del citoplasma cellulare integrato da indagini di biologia biomolecolare e di immunocitochimica è possibile ottenere la diagnosi di malattia; la branca che si occupa di tale diagnostica viene definita citopatologia.

La citodiagnostica può avere diverse applicazioni:

- In un primo inquadramento di condizioni accertate, ma di natura ancora da determinare, quindi per discriminare tra patologie neoplastiche e non neoplastiche
- Indagini di follow-up per il monitoraggio di pazienti affetti da una specifica patologia
- Esami di screening di popolazione apparentemente sana.

La citologia può essere di diversi tipi: aspirativa, eseguita con una puntura con ago sottile effettuata su organi o lesioni superficiali o profonde sotto monitoraggio radiologico (TAC o eco-guidata); esfoliativa, consiste nella raccolta delle cellule che si sfaldano naturalmente, come le urine, può essere normale, un processo che avviene in continuazione oppure provocata, ovvero cellule asportate dalla superficie di una mucosa o di una lesione (brushing, washing, scraping) [2].

Inoltre, la citopatologia si occupa dell'analisi di versamenti endocavitari, ossia una raccolta di liquido in una cavità dovuti a cause patologiche come infiammazioni, stati reattivi, neoplasie, ma non sempre sono patologiche le cellule che lo costituiscono. Prevalentemente sono versamenti pleurici, pericardici e peritoneali, liquidi che si accumulano nelle rispettive cavità, rivestite da cellule mesoteliali.

I versamenti vengono classificati in trasudati ed essudati. I trasudati sono causati da un aumento della pressione venosa e/o ipoproteinemia; gli essudati, invece, sono causati da un'umentata permeabilità dei capillari sanguigni e linfatici [3].

La processazione dei liquidi biologici nel laboratorio di citopatologia prevede le seguenti fasi:

- Accettazione del campione
- Citocentrifugazione
- Fissazione in alcol 95°
- Colorazione sec. Papanicolaou
- Montaggio del vetrino coprioggetto con balsamo
- Osservazione al microscopio del preparato
- Eventuali indagini ancillari
- Refertazione

3. MODALITA' DI RACCOLTA DEI LIQUIDI BIOLOGICI

3.1 TORACENTESI

Il liquido pleurico si forma tra i foglietti parietale e viscerale che costituiscono la pleura.

La toracentesi consiste nel prelievo parziale o totale del liquido accumulatosi in questo spazio.

Tale manovra viene condotta introducendo un ago sottile, in anestesia locale e sotto guida ecografica, nella cavità toracica attraverso uno spazio intercostale, con il paziente seduto e piegato in avanti.

All'ago viene raccordato un piccolo tubo, il quale drena il liquido facendo in modo che si raccolga in uno specifico contenitore.

Questa procedura può essere controindicata in pazienti che hanno patologie della coagulazione del sangue, scompenso cardiaco e dilatazione della parte destra del cuore o che soffrono di malattie polmonari croniche [4].

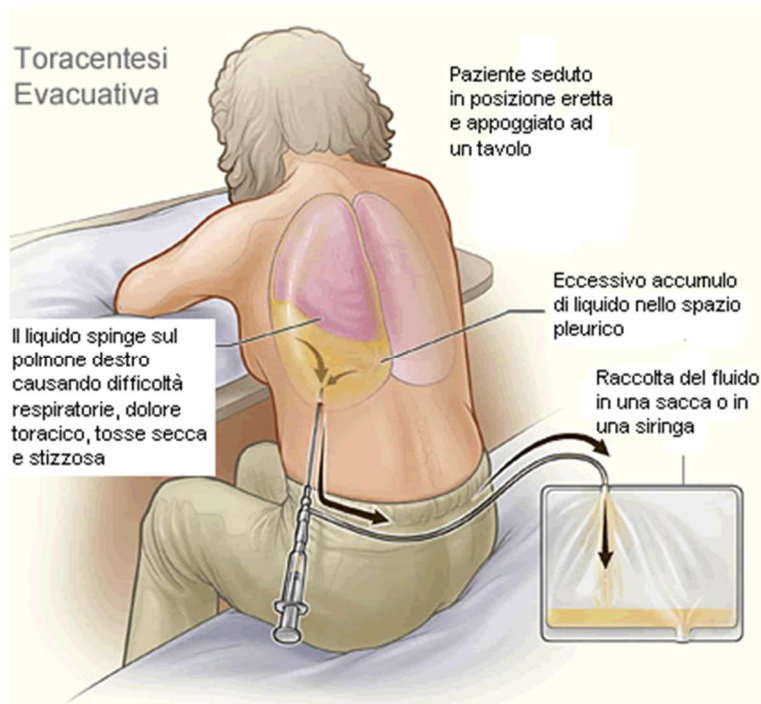


Fig. 1: Toracentesi

3.2 PARACENTESI

Consiste nel prelievo di liquido (ascitico) dalla cavità peritoneale per mezzo di una piccola incisione chirurgica o di una puntura praticata attraverso la parete addominale in condizioni di sterilità.

La procedura si esegue con il paziente sdraiato sulla schiena o su un fianco e viene condotta introducendo, sotto guida ecografica, un ago cannula sottile nella cavità peritoneale [5].

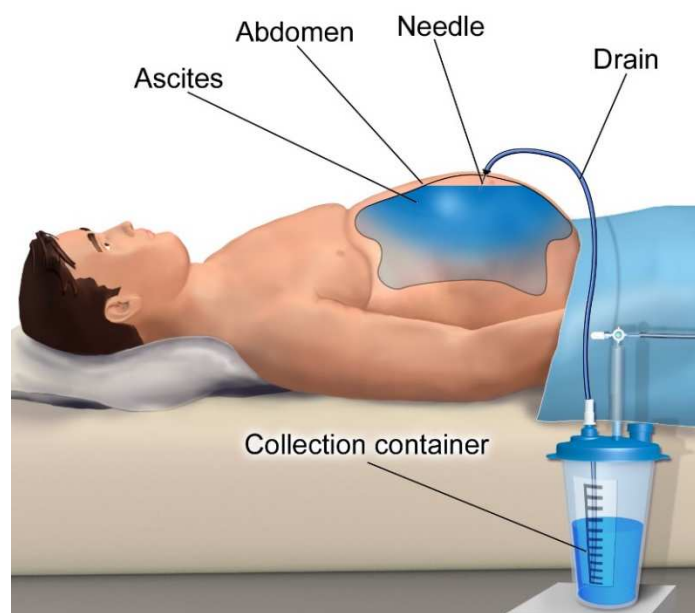


Fig. 2: Paracentesi

Il liquido drenato, come nel caso della toracentesi, viene raccolto in un apposito contenitore.

Dalla toracentesi e dalla paracentesi si possono raccogliere notevoli quantità di liquido biologico; non tutto il materiale ottenuto viene mandato in laboratorio per l'esame citologico poiché per questo è sufficiente una provetta di 5 ml.

Nei campioni ematici è opportuno usare delle provette contenenti un anticoagulante (EDTA), mentre per i campioni non ematici viene usata una provetta comune.

Il liquido da esaminare deve pervenire nel laboratorio di citologia subito dopo il prelievo quando possibile, altrimenti questo può essere conservato in frigorifero a +4°C per non più di 24 ore.

3.3 PERICARDIOCENTESI

La pericardiocentesi è una procedura invasiva che consiste nell'aspirazione del liquido che si forma tra le due membrane che costituiscono il pericardio.

È una tecnica che viene eseguita ove sia possibile effettuare un continuo monitoraggio cardiaco e della pressione arteriosa.

Il materiale viene prelevato con un ago, generalmente inserito nell'angolo costosternale, ovvero tra la parte terminale dello sterno e l'inserzione a questo dell'ultima costa.

La procedura viene effettuata in anestesia locale e sotto guida ecografica [6].

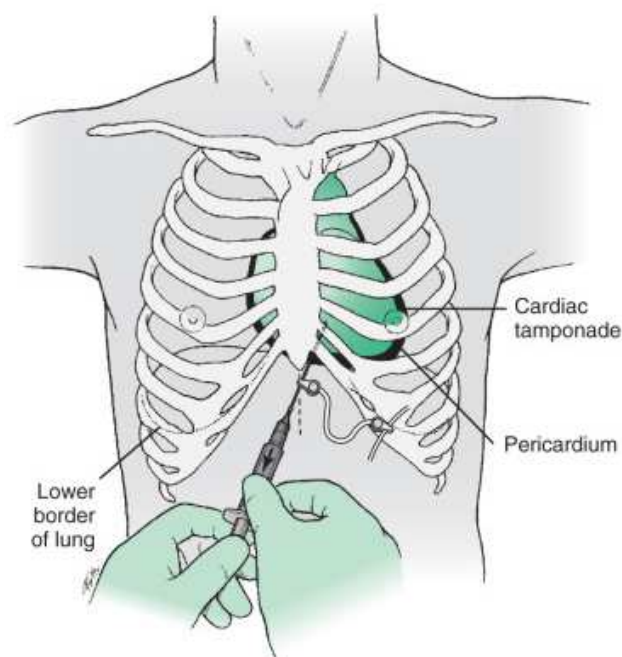


Fig. 3: Pericardiocentesi

Anche per il liquido pericardico valgono le stesse raccomandazioni citate precedentemente riguardanti le modalità di conservazione affinché le cellule non presentino modificazioni citonucleari dovute a citolisi da errata conservazione che potrebbero influire sulla corretta interpretazione morfologica degli elementi cellulari e rendere difficoltosa la diagnosi.

3.4 URINE

Le urine fanno parte della citologia esfoliativa spontanea, ovvero l'analisi delle cellule che naturalmente si sfaldano e si raccolgono in essa.

In laboratorio arrivano 3 campioni di urine, in 3 differenti provette *falcon* da 50 ml, raccolte in 3 giorni diversi, successivi o alternati.

Le provette fornite ai pazienti contengono un liquido fissativo (circa 30 ml), a base metanolica di colore verde che non altera l'assorbimento del colorante impiegato nella successiva processazione, che avviene secondo le seguenti fasi:

1. I campioni vengono centrifugati a 3000 rpm per 5 minuti;
2. Dopo aver eliminato il surnatante i pellet ottenuti vengono uniti in unica provetta;
3. L'omogeneizzazione avviene mediante l'utilizzo del vortex.

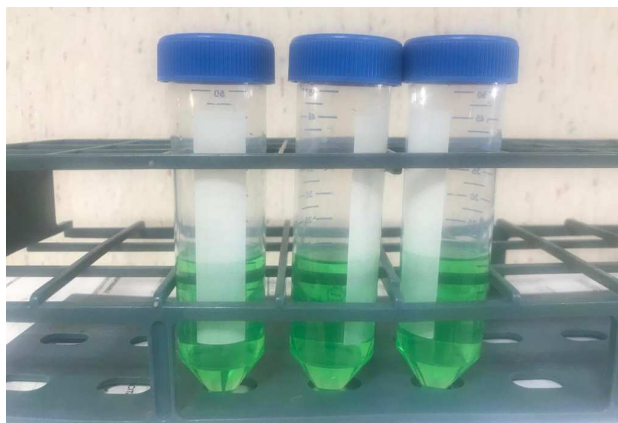


Fig. 4: Urine

4. MATERIALI E METODI

In questo studio sono stati presi in considerazione 13 pazienti di sesso sia maschile che femminile, con età compresa fra i 50 e i 90 anni, i cui liquidi biologici sono pervenuti al laboratorio di citopatologia della SOD di Anatomia Patologica della Azienda Ospedaliera Universitaria (AOU) Ospedali Riuniti Ancona.

I campioni analizzati, precedentemente diagnosticati, sia positivi, per presenza di cellule neoplastiche, che negativi, comprendevano versamenti endocavitari come: liquido pericardico, pleurico o peritoneale e campioni di urine.

NUMERO	SESSO	ANNI	CAMPIONE	DIAGNOSI
1	MASCHIO	58	LIQUIDO PERICARDICO	C4
2	MASCHIO	84	LIQUIDO PLEURICO	C2
3	MASCHIO	51	LIQUIDO PLEURICO	C5
4	FEMMINA	70	LIQUIDO PERICARDICO	C2
5	FEMMINA	60	LIQUIDO PERITONEALE	C5
6	FEMMINA	66	LIQUIDO PLEURICO	C5
7	FEMMINA	78	LIQUIDO PERITONEALE	C5
8	MASCHIO	59	LIQUIDO PLEURICO	C5
9	MASCHIO	91	LIQUIDO PERICARDICO	C5
10	FEMMINA	64	LIQUIDO PLEURICO	C5
11	UOMO	87	URINE	C4
12	DONNA	84	LIQUIDO PERICARDICO	C2
13	DONNA	59	LIQUIDO PERITONEALE	C2

Tabella 1: Descrizione casi clinici con corrispondenti categorie diagnostiche

4.1 CATEGORIZZAZIONE CITOLOGICA

In citopatologia per la refertazione dei liquidi biologici viene utilizzata la “categorizzazione in classi” da C1 a C5, per definire le cellule prive di atipie, quelle sospette e quelle neoplastiche:

- C1: campione inadeguato, quadro citologico non sufficiente per definire la diagnosi;
- C2: campione negativo, assenza di cellule con atipie citonucleari;
- C3: quadro citologico dubbio di normalità, indica sospetto di lesione probabilmente benigna;
- C4: quadro citologico dubbio di malignità, indica sospetto di lesione probabilmente maligna;
- C5: campione positivo per cellule neoplastiche.

Tutti i campioni ottenuti devono essere valutati dal punto di vista dell’adeguatezza e della rappresentatività prima di procedere alle indagini ancillari successive

4.2 PROCEDURA ALLESTIMENTO CAMPIONI

Per lo sviluppo di una metodica ottimale abbiamo deciso di eseguire prove sia con diverse diluizioni (1:1 e 1:2 - campione : colorante), sia testando differenti coloranti, nel particolare: Blu di Toluidina, Ematossilina di Gill, May-Grunwald, Giemsa e Rosso Nucleo (Nuclear Fast Red). Per ogni campione biologico sono stati effettuati due vetrini per ciascuna prova.

La metodica consiste nelle seguenti fasi:

1. Accettazione del campione
2. Prelevare 250 µl dal campione di interesse mediante l'utilizzo di una pasteur monouso
3. Aggiungere ai 250 µl presenti in una provetta sterile senza preservanti, 500 µl di colorante
4. Omogeneizzare e lasciare ad agire per 30 secondi
5. Preparare i vetrini con il rispettivo codice del paziente nei cytofunnel
6. Posizionare i vetrini nel cytofunnel e porre la soluzione preparata precedentemente nei pozzetti del cytofunnel, con attenzione a non prendere la carta assorbente
7. Eliminare le bolle se presenti
8. Citocentrifugare a 2000 rpm per 3 minuti, in modo tale da concentrare le cellule in due spot
9. Fissare in alcol 95% per 5 minuti
10. Disidratare: 1 minuto in alcol assoluto
11. Passaggio rapido in xilene e montaggio del vetrino coprioggetto con balsamo.

È molto importante appena terminata la citocentrifugazione rimuovere i vetrini dal cytofunnel e metterli a fissare per evitare la formazione di artefatti da essiccamento (lisi cellulare), che possono determinare alterazioni citomorfologiche e di conseguenza compromettere la diagnosi citopatologica.



Fig. 5



Fig. 5 - 6: Cytospin 4 della azienda Thermoscientific



Fig. 6



4.3 I COLORANTI

4.3.1 BLU DI TOLUIDINA

Il blu di toluidina noto anche come TBO o tolonio cloruro (INN) è un colorante basico. I nuclei si colorano di blu scuro/viola ed il citoplasma di blu chiaro.

Questo colorante si può comportare come colorante ortocromatico (dando un colore azzurro) o metacromatico (dando un colore rosso-violetto) in modo dipendente dal pH e dalla natura chimica della sostanza da colorare.

La metacromasia è il fenomeno fisico chimico per cui colorando un campione istologico, alcuni elementi del tessuto assumono una colorazione differente da quella del colorante.

Questo fenomeno è dovuto dal legame con molecole polianioniche come i glucosaminoaglicani da cui si formano dei multimeri che forniscono questa colorazione rossastra.

Il cambiamento di colore e quindi il differente range di luce riflessa è dovuto proprio alla formazione di agglomerati molecolari di colorante che assorbono la luce a più alta frequenza (blu) rispetto a quando il colorante si trova in soluzione in forma monomerica [7].

4.3.2 EMATOSSILINA DI GILL

L'Ematossilina di Gill è utilizzata come colorazione citologica progressiva, ovvero che il campione a differenza della regressiva non viene sovracolorato e successivamente decolorato.

Queste soluzioni di ematossilina sono prodotte a partire da ematossilina semiossidata, trattata con un mordente di alluminio e utilizzata con glicoli.

Il complesso alluminio-emateina (con carica positiva) si combina con i gruppi di fosfati del DNA nucleare (con carica negativa) e assume la caratteristica colorazione blu viola dell'ematossilina. Per l'efficacia come colorante, l'ematossilina deve essere ossidata in emateina, che viene poi combinata con un mordente di ferro metallico per aumentare la selettività della colorazione per la cromatina.

Si ritiene che la colorazione si verifichi a causa di positività chelati di alluminio-ematino carichi che si combinano con il gruppo negativo di acido fosforico presente nel DNA [8].

4.3.3 MAY-GRUNWALD E GIEMSA

La May-Grunwald Giemsa è una colorazione differenziale e generalmente si usano insieme per i vetrini fissati all'aria utilizzati soprattutto in ematologia. In particolare, in citologia viene utilizzata per il liquor per osservare i dettagli nucleari dei linfociti, per apposizioni di linfonodi, per la morfologia dei linfociti e per l'esame del muco nasale per le reiniti allergiche. È un colorante costituito da due miscele: la May-Grunwald costituita da una soluzione di blu di metilene e di eosina in alcool metilico, il quale funge da fissatore; la Giemsa corrispondente ad una soluzione di glicerina ed alcool metilico di eosina e blu di metilene. La prima miscela colora soprattutto le strutture acidofile e le granulazioni neutrofile dei leucociti, mentre la seconda colora i nuclei e le strutture azzurofile.

4.3.4 ROSSO NUCLEO

Il Rosso Nucleo o Nuclear Fast Red è un colorante anionico usato in combinazione con un sale di alluminio come mordente. A differenza dell'ematossilina, è una procedura di colorazione rapida che richiede un solo passaggio [9].

4.4 COLORAZIONE CITOLOGICA STANDARD

La principale colorazione citologica di campioni fissati in alcol è la Papanicolaou. È una miscela di ematossilina che colora i nuclei in blu-viola, di EA50^[2,1] che colora i citoplasmici, di rosa se eosinofili e blu se acidofili e di soluzione Orange G che colora di arancione gli elementi cheratinizzanti.

Nel laboratorio di citopatologia diagnostica la metodica attualmente svolta prevede la colorazione di Papanicolaou modificata, in quanto non prevede l'utilizzo dell'Orange G.

Questa prevede le seguenti fasi:

1. Accettazione del campione
2. Citocentrifugare a 1500 rpm per 8 minuti
3. Fissare in alcol 95% per circa 10 minuti
4. Colorazione di Papanicolaou mod., nel coloratore semiautomatico¹:
 - 4.1 Alcol 50%
 - 4.2 H₂O distillata
 - 4.3 Ematossilina di Gill (1° colorante)
 - 4.4 2 passaggi in acqua corrente

¹ Circa 1 minuto/ 1,5 minuto per ogni vaschetta per un totale di 32 minuti.

4.5 2 passaggi in alcol 50%

4.6 1 passaggio in alcol 95%

4.7 EA50² (2° colorante)

4.8 Disidratazione attraverso: alcol 50%, 95% (2 passaggi), 100% (4 passaggi)

5. Chiarificazione in xilene e montaggio del vetrino coprioggetto con balsamo.

Dall'accettazione del campione al termine della colorazione si impiegano circa 75 minuti.



Fig. 7: Coloratore semiautomatico Bioptica ³



Fig. 8.1: Cytofunnel



Fig. 8.2: Cytofunnel

² EA50 : soluzione di verde luce, bruno di Bismark, eosina con aggiunta di acido fosforico e carbonato di litio.

³ Coloratore semiautomatico Bioptica i600.

4.5 IMMUNOCITOCHIMICA

L'immunocitochimica è una metodica che consente di individuare specifiche molecole o strutture intra ed extracellulari e si basa sul principio di coniugazione antigene-anticorpo rilevato con sistemi enzimatici e fluorescenti che rendono visibile l'avvenuta reazione al microscopio.

Quando il citopatologo ritiene di utilizzare l'immunocitochimica per formulare una diagnosi più dettagliata, i vetrini oggetto di indagine, vengono sottoposti a reidratazione previo smontaggio del copri oggetto [10].

Essa consiste nelle seguenti fasi:

1. Passaggio in xilene per 5 minuti per togliere il balsamo, altrimenti l'immunoreazione non avviene
2. Alcol assoluto 100% per 2 minuti
3. Alcol 95% per 2 minuti
4. Acqua corrente per 5 minuti

A questo punto i vetrini vengono processati per l'analisi immunocitochimica utilizzando specifici anticorpi⁴ richiesti dal citopatologo.

Gli anticorpi testati, nel nostro caso, sono:

- Ber-EP4⁵: espresso nella maggior parte delle cellule del corpo, ad eccezione dell'epitelio squamoso e del mesotelio. È utile nella differenziazione del mesotelioma dall'adenocarcinoma [11].

⁴ Gli anticorpi testati sono gli stessi che sono stati studiati nel campione originale.

⁵ Ber-EP4: molecola di adesione cellulare epiteliale.

- Calretinina⁶: positiva nelle cellule mesoteliali attivate e nei mesoteliomi, negativa in caso di adenocarcinoma [10].
- CK-19⁷: espresso nei carcinomi epiteliali di tipo ghiandolare [12].
- TTF-1⁸: positivo nel carcinoma pleurico e negativo nel mesotelioma [13].
- CK-7⁷: espressa negli epiteli che rivestono le cavità degli organi interni, nei dotti, nei vasi sanguigni e nelle ghiandole [14].
- AE1AE3: pan-citocheratina, rileva CK-1, 8, 10, 14, 16, 19, ma non rileva CK-17 o CK-18. Differenti pretrattamenti per AE1 e AE3. Positivo nel mesotelioma.
- PAX8⁹: fattore di trascrizione espresso nei carcinomi follicolari della tiroide[15].

L'esecuzione della metodica di immunocitochimica richiede circa 2 ore.

⁶ Calretinina: proteina legante il calcio, codifica dal gene CALB.

⁷ Citoheratina (7 e 19): proteine dei filamenti intermedi contenenti cheratina localizzate a livello del citoscheletro intracitoplasmatico delle cellule epiteliali.

⁸ TTF-1: fattore di trascrizione tiroidea.

⁹ PAX-8: Paired Box Gene 8.

5. RISULTATI OTTENUTI

Nelle pagine successive sono illustrate le immagini di campioni biologici trattati¹⁰, secondo la nostra metodica, con Blu di toluidina, Ematossilina di Gill e indagini immunocitochimiche.

Abbiamo osservato che i dettagli citonucleari dei campioni biologici colorati con Blu di toluidina sono migliori rispetto a quelli colorati con la sola Ematossilina di Gill, la quale ci ha comunque permesso di evidenziare nel campione 6 le particolari caratteristiche delle cellule “ad anello con castone” di importante rilevanza per una prima definizione diagnostica.

La metodica di Papanicolaou consente di colorare le emazie ed il materiale amorfo presente nel preparato citologico, mentre con la colorazione di Blu di Toluidina questo non avviene in quanto le eventuali emazie presenti sono prive di nucleo e non catturano il colorante, per cui il “fondo” risulta più “pulito”.

Abbiamo ottenuto ottimi risultati con le indagini immunocitochimiche, in quanto i preparati citologici allestiti con la metodica sviluppata sono sovrapponibili ai quelli colorati con la metodica di Papanicolaou standard.

¹⁰ I campioni descritti fanno riferimento ai dati riportati in Tabella 1.

5.1 CAMPIONI CITOLOGICI ANALIZZATI

CAMPIONE 3

SESSO	M
ETA'	51
CAMPIONE	LIQUIDO PLEURICO
CATEGORIZZAZIONE CITOLOGICA	C5
ANTICORPI RICERCATI	Ber-EP4 + CK7+

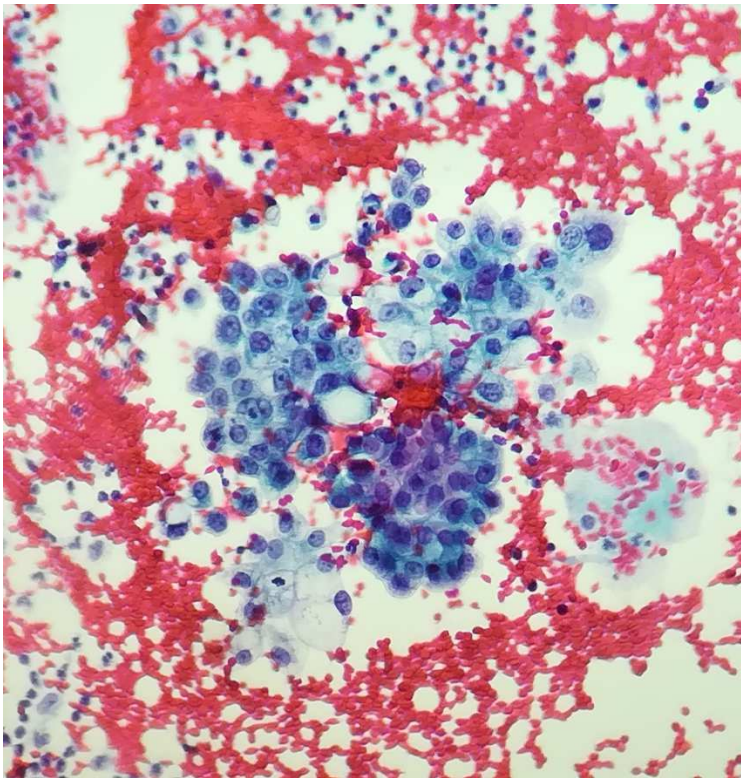


Fig. 9: Colorazione standard di Papanicolaou modificato di liquido pleurico

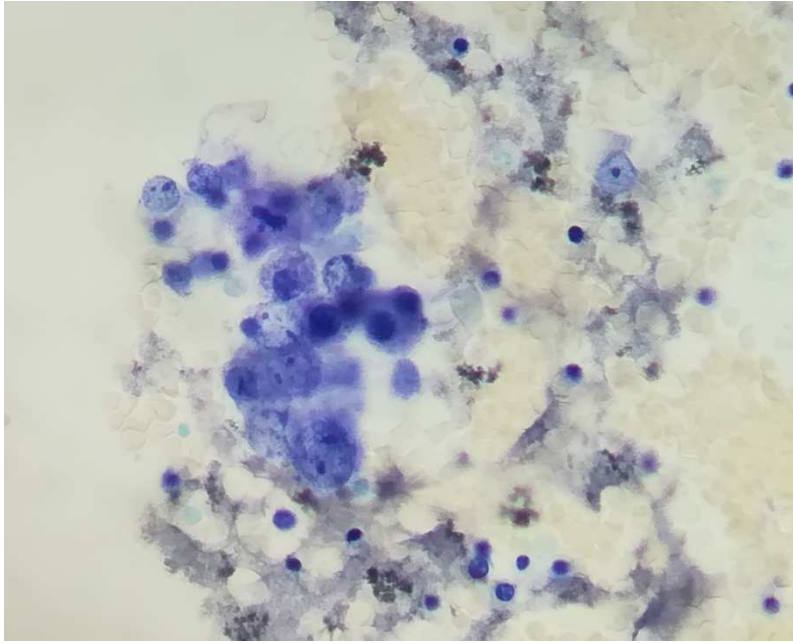


Fig. 10: Colorazione di Blu di Toluidina con il metodo sviluppato

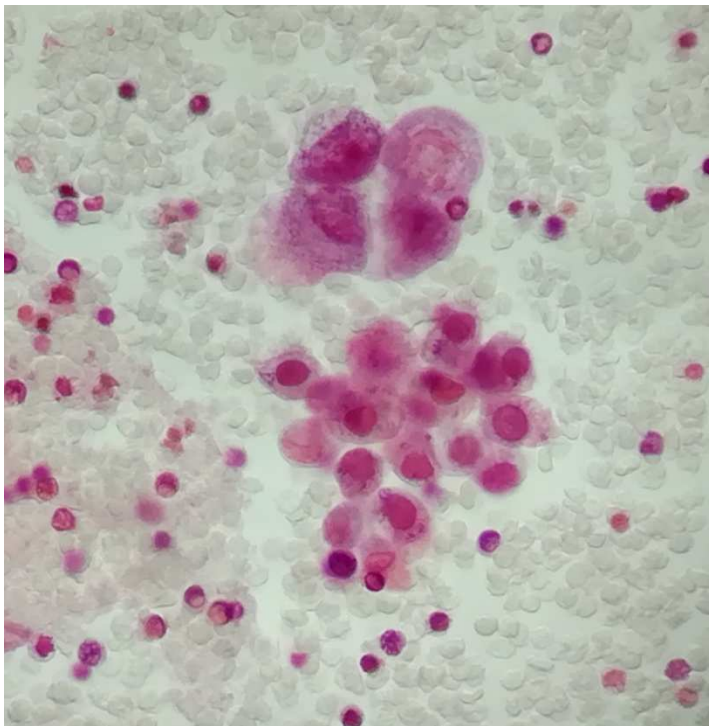


Fig. 11: Colorazione di Ematossilina di Gill con il metodo sviluppato

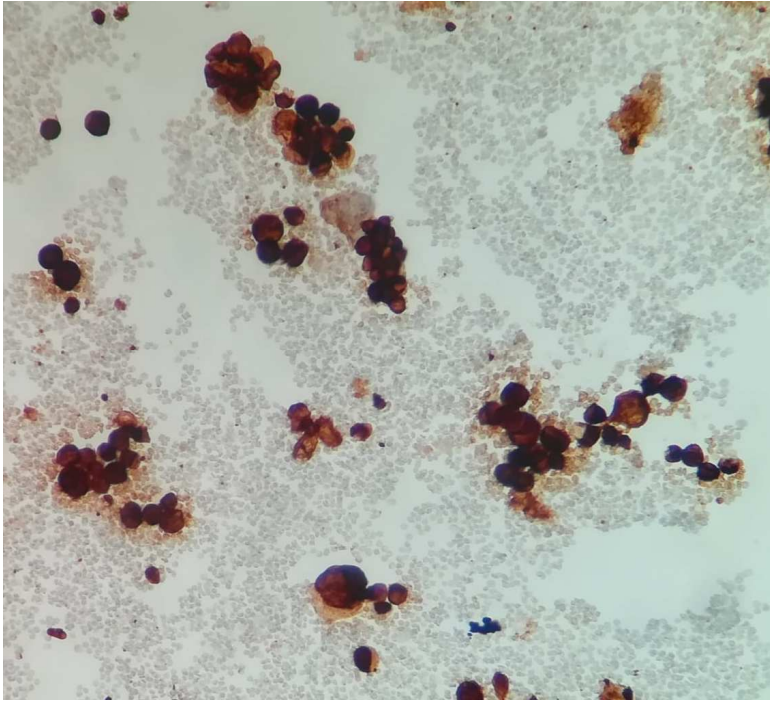


Fig. 12: Immunocitochimica, Ck7 +

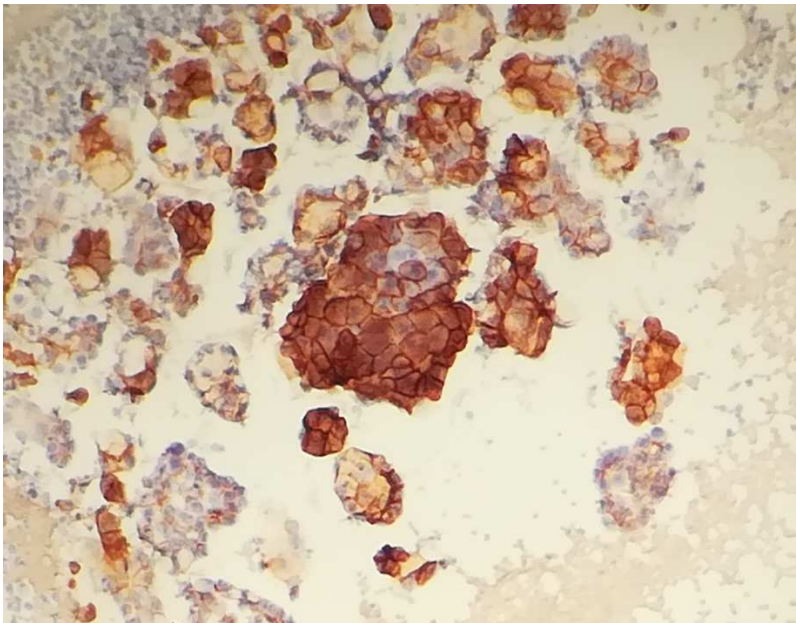


Fig. 13: Immunocitochimica, Ber-EP4 +

CAMPIONE 5

SESSO	F
ETA'	60
CAMPIONE	LIQUIDO PERITONEALE
CATEGORIZZAZIONE CITOLOGICA	C5
ANTICORPI RICERCATI	Ber-EP4 + CK19 +

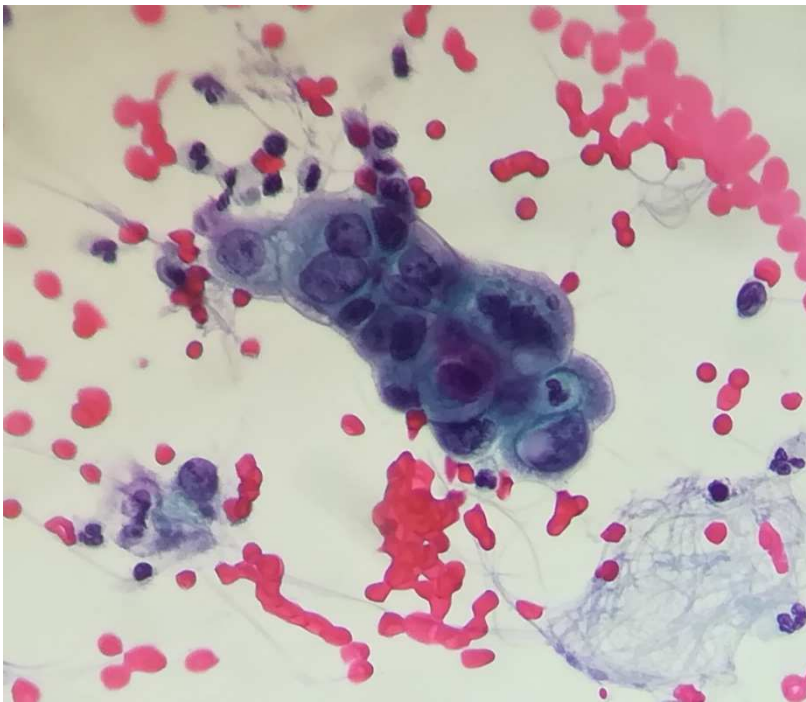


Fig. 14: Colorazione standard di Papanicolaou modificato di liquido peritoneale

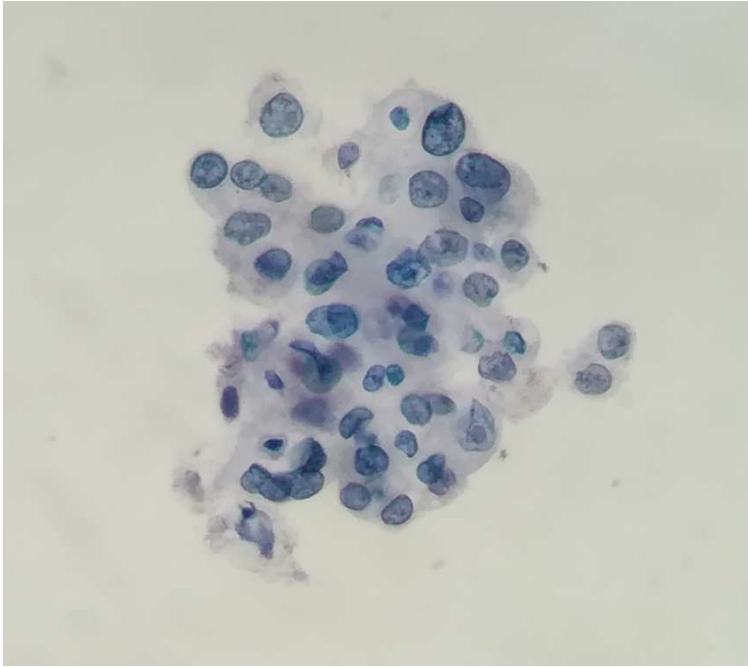


Fig. 15: Colorazione di Blu di Toluidina con il metodo sviluppato



Fig. 16: Colorazione di Blu di Toluidina con il metodo sviluppato

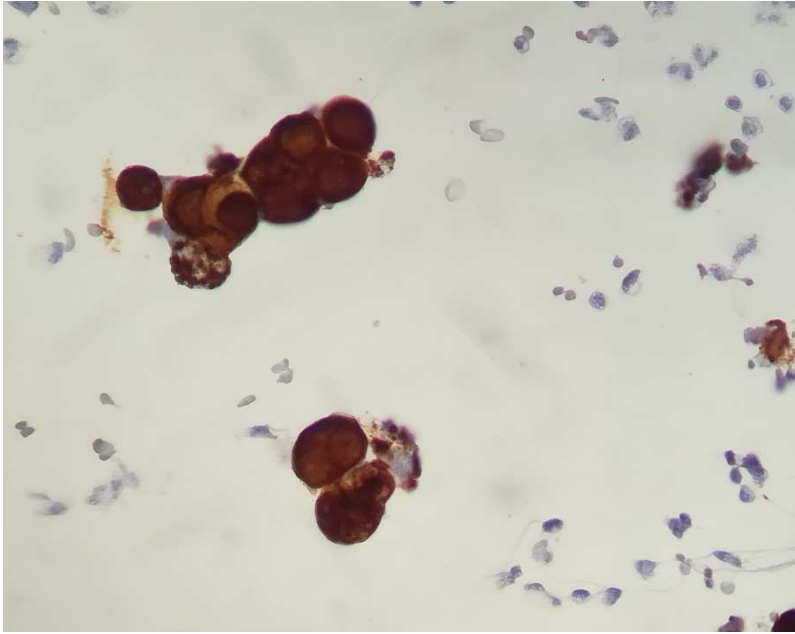


Fig 17: Immunocitochimica, Ck7 +

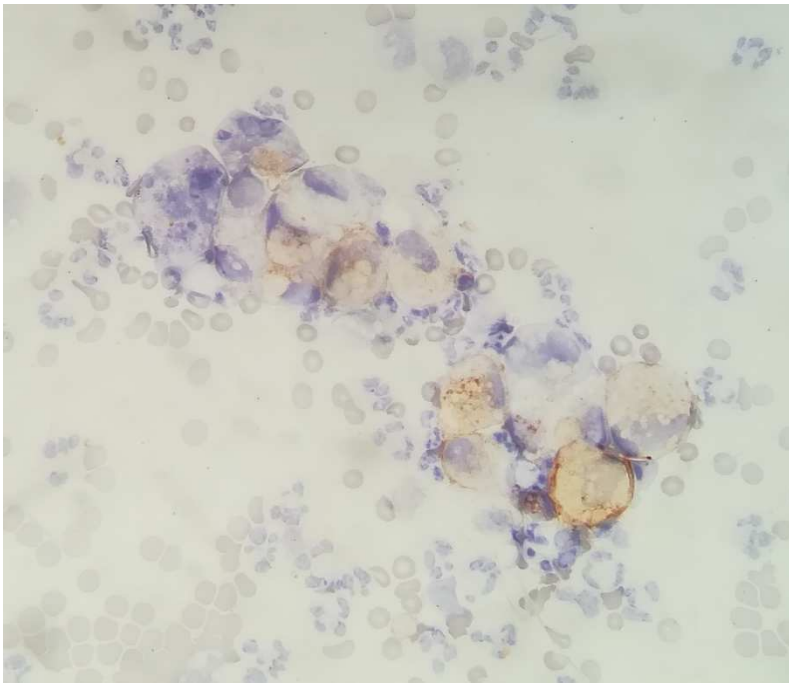


Fig. 18: Immunocitochimica, Ber-EP4 +

CAMPIONE 6

SESSO	F
ETA'	66
CAMPIONE	LIQUIDO PLEURICO
CATEGORIZZAZIONE CITOLOGICA	C5
ANTICORPI RICERCATI	TTF-1 +

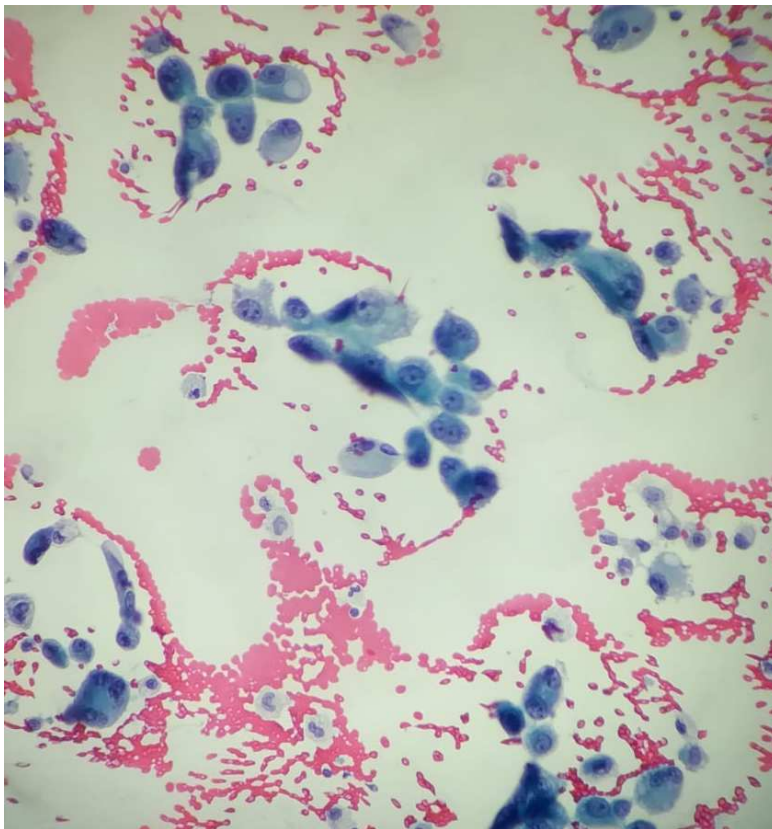


Fig. 19: Colorazione standard di Papanicolaou modificato di liquido pleurico

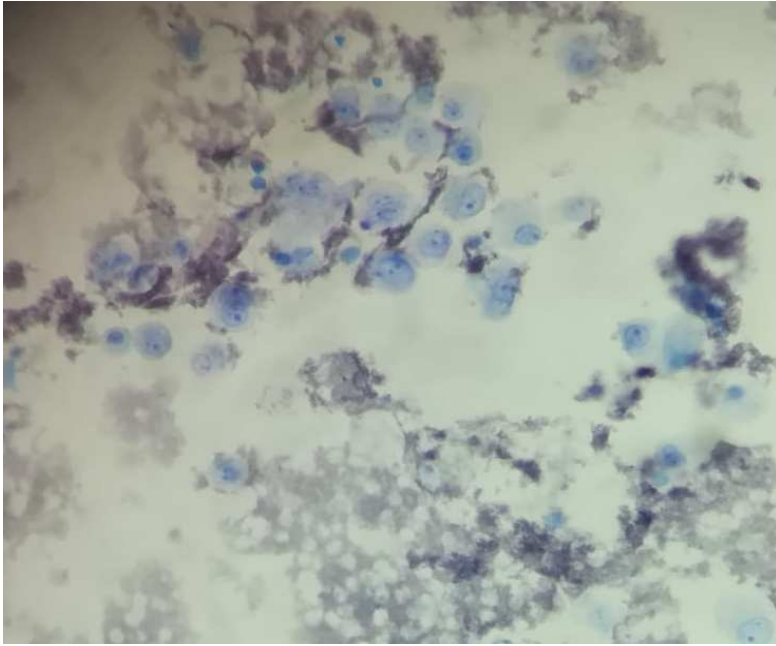


Fig. 20: Colorazione di Blu di Toluidina con il metodo sviluppato

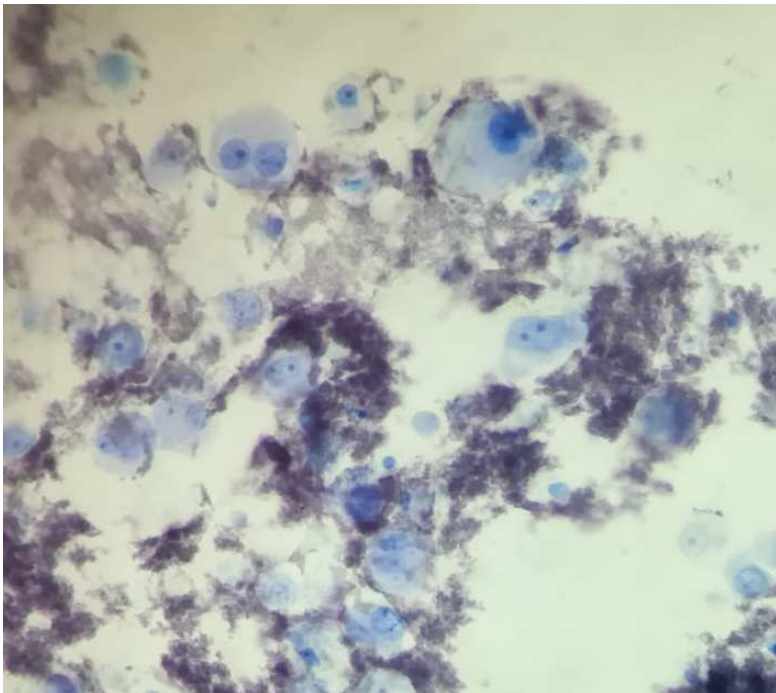


Fig. 21: Colorazione di Blu di Toluidina con il metodo sviluppato

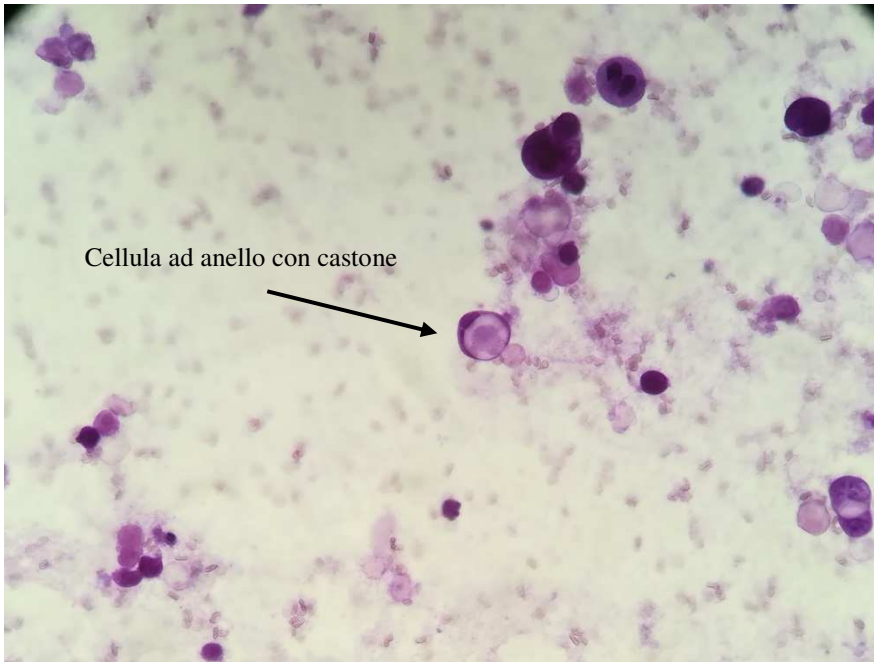


Fig. 22: Colorazione di Ematossilina di Gill con il metodo sviluppato

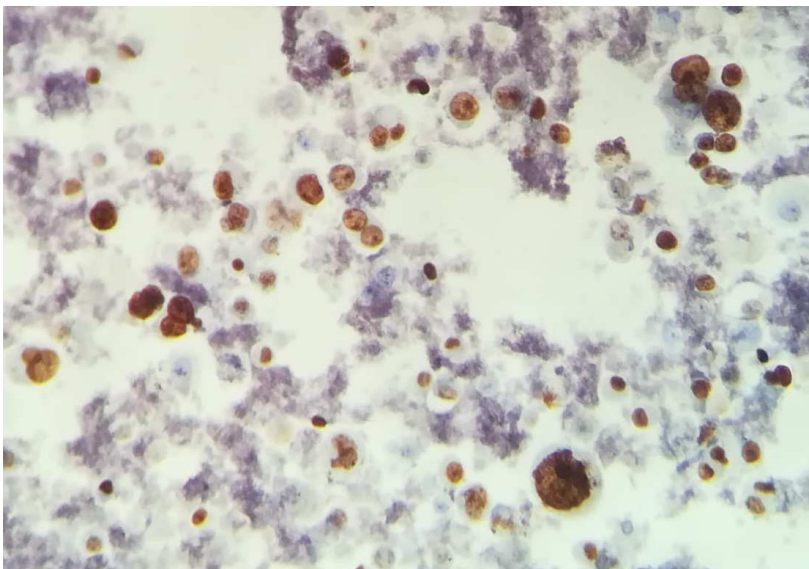


Fig. 23: Immunocitochimica, TTF-1 +

CAMPIONE 7

SESSO	F
ETA'	78
CAMPIONE	LIQUIDO PERITONEALE
CATEGORIZZAZIONE CITOLOGICA	C5
ANTICORPI RICERCATI	PAX8 +

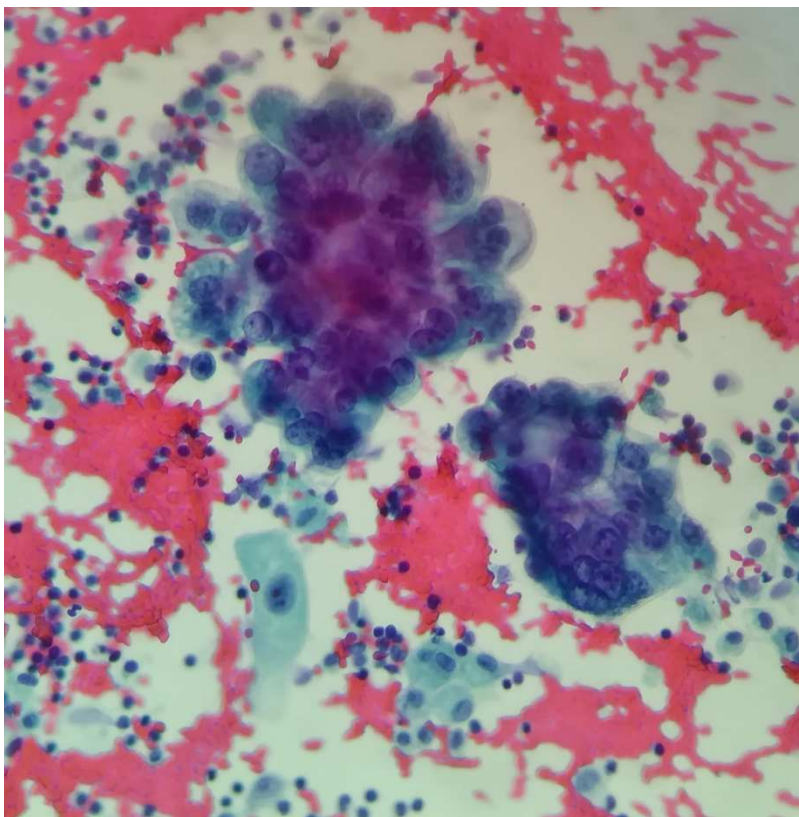


Fig. 24: Colorazione standard di Papanicolaou modificato di liquido peritoneale

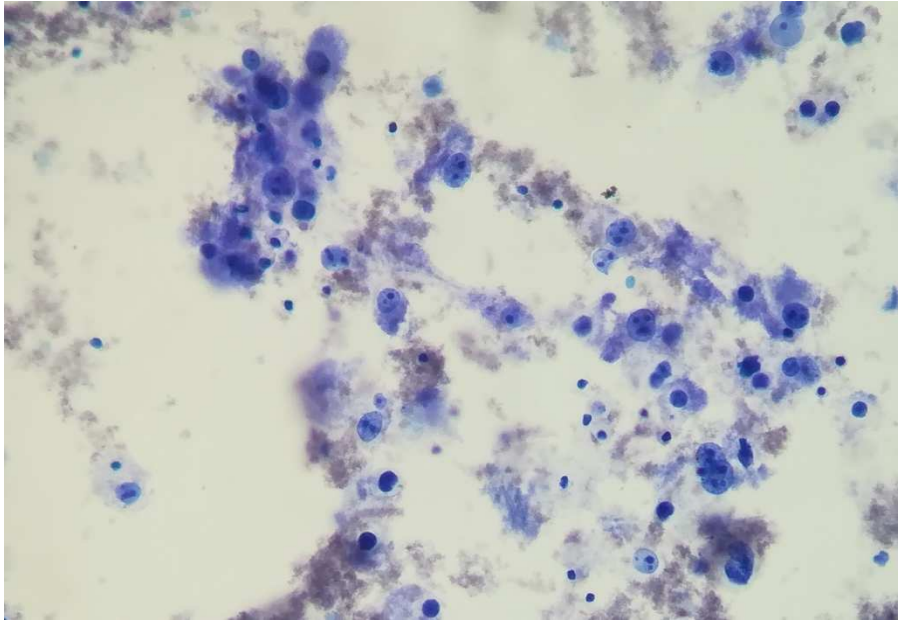


Fig. 25: Colorazione di Blu di Toluidina con il metodo sviluppato

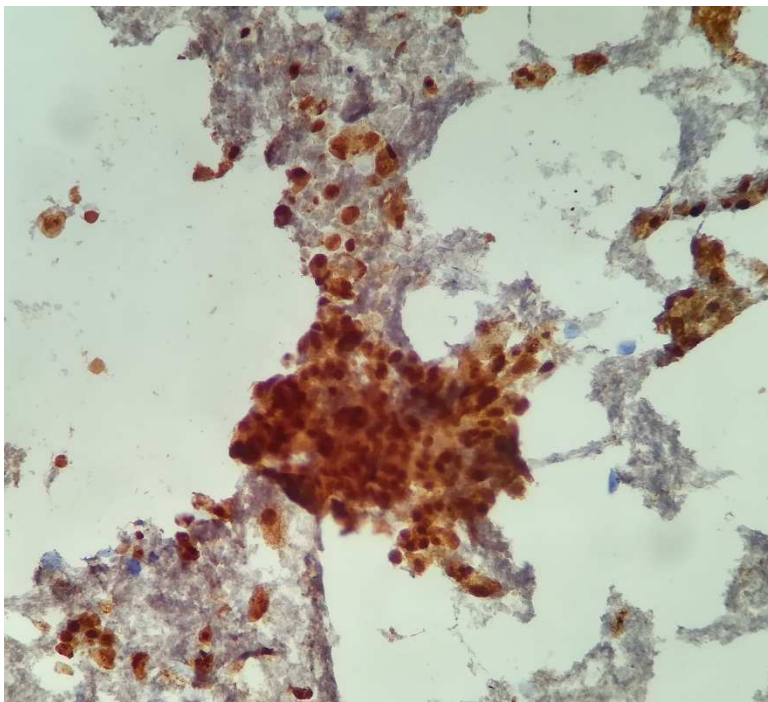


Fig. 26: Immunocitochimica, PAX8 +

CAMPIONE 9

SESSO	M
ETA'	91
CAMPIONE	LIQUIDO PERICARDICO
CATEGORIZZAZIONE CITOLOGICA	C5
ANTICORPI RICERCATI	Ber-EP4 + CALRETININA-

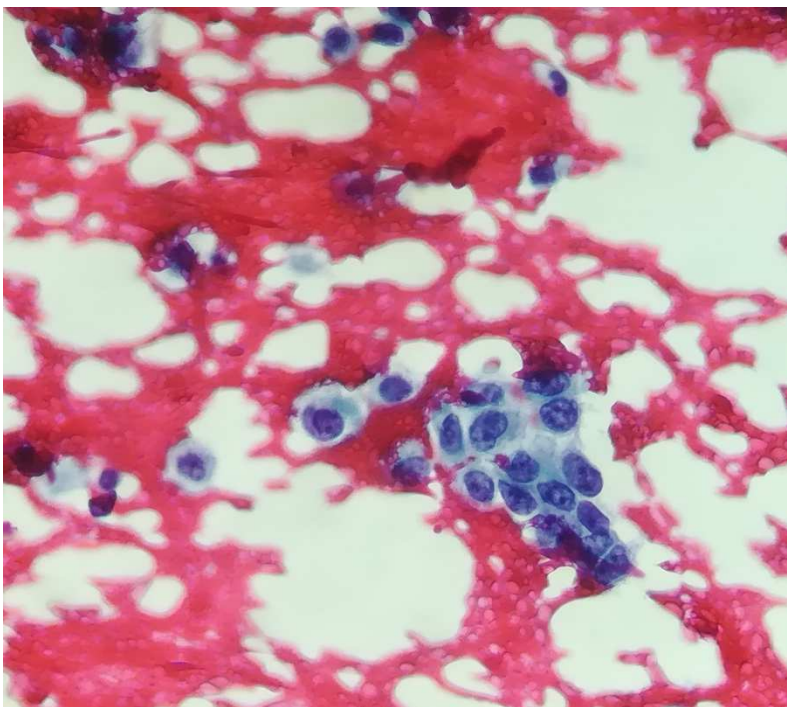


Fig. 27: Colorazione standard di Papanicolaou modificato di liquido pericardico

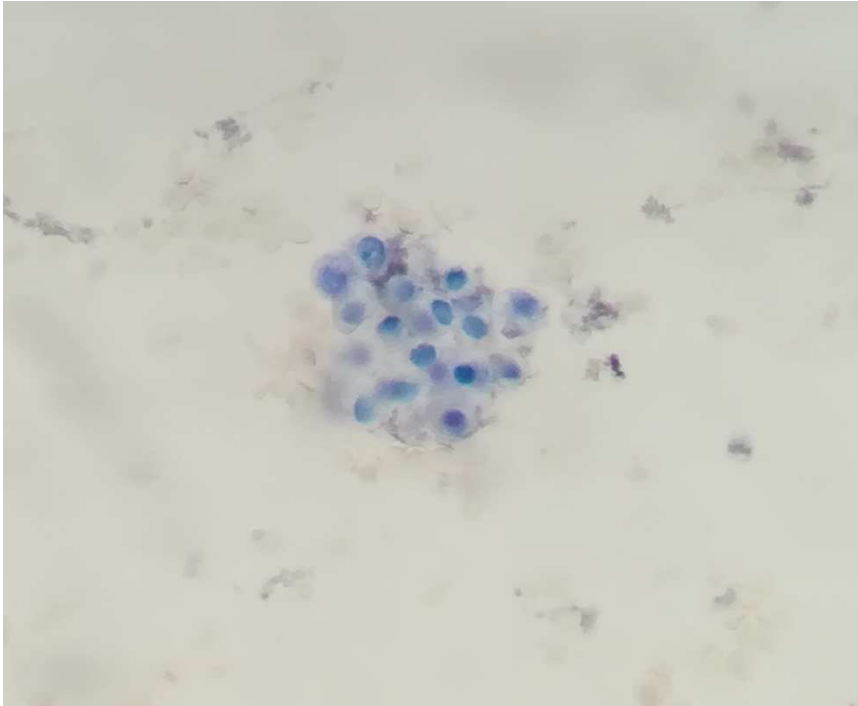


Fig. 28: Colorazione di Blu di Toluidina con il metodo sviluppato

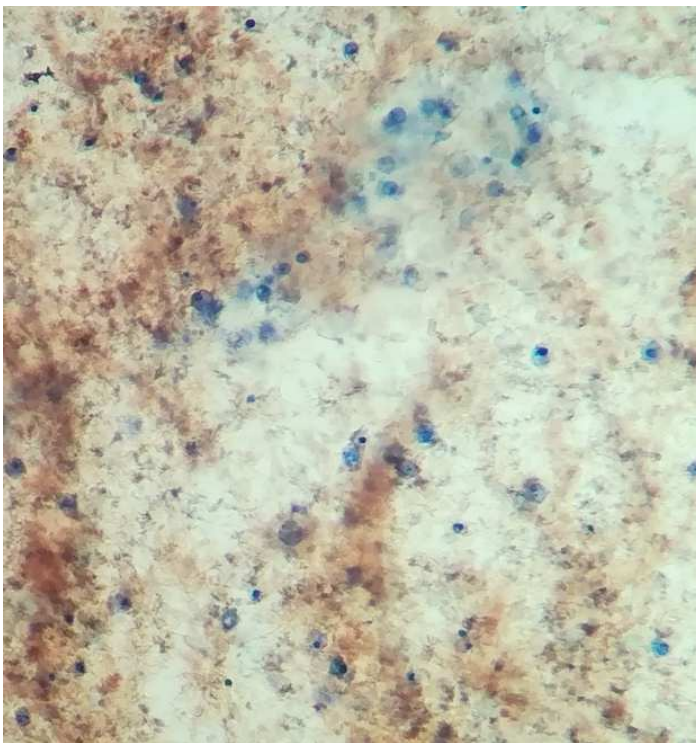


Fig. 29: Colorazione di Blu di Toluidina con il metodo sviluppato

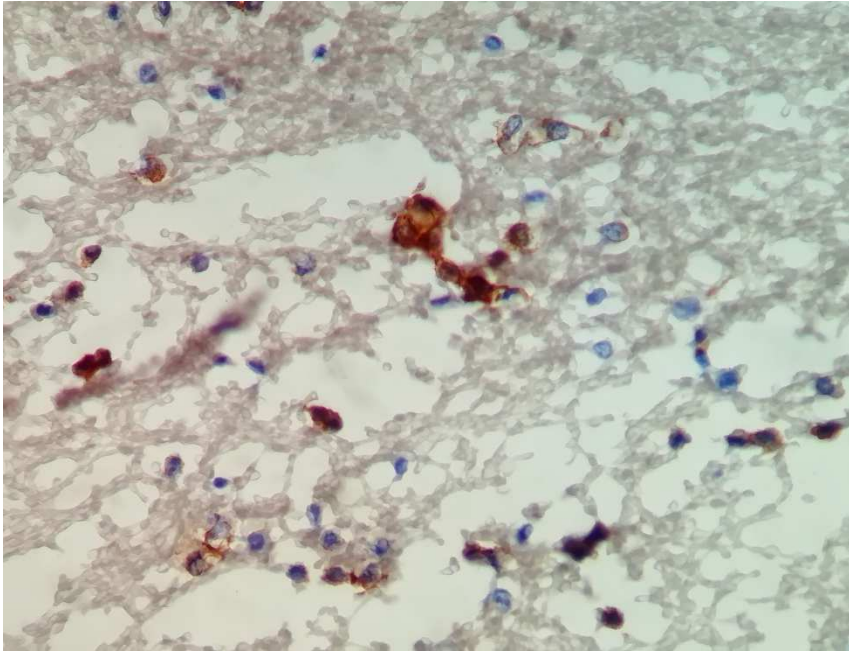


Fig. 30: Immunocitochimica, BerEP4 +

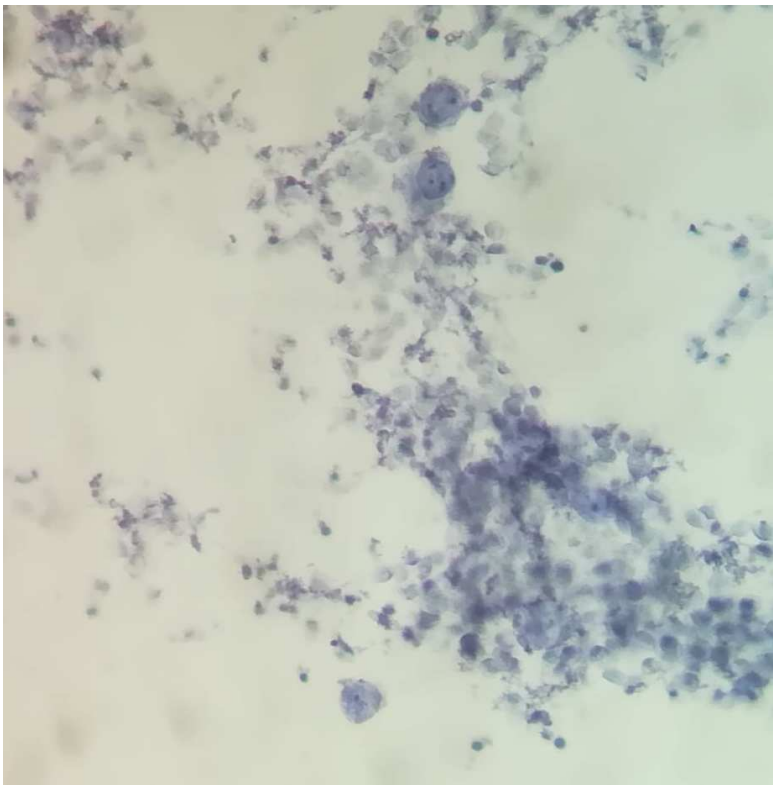


Fig. 31: Immunocitochimica, Calretinina – (nuclei ben evidenti)

CAMPIONE 11

SESSO	M
ETA'	87
CAMPIONE	URINE
CATEGORIZZAZIONE CITOLOGICA	C4
ANTICORPI RICERCATI	/

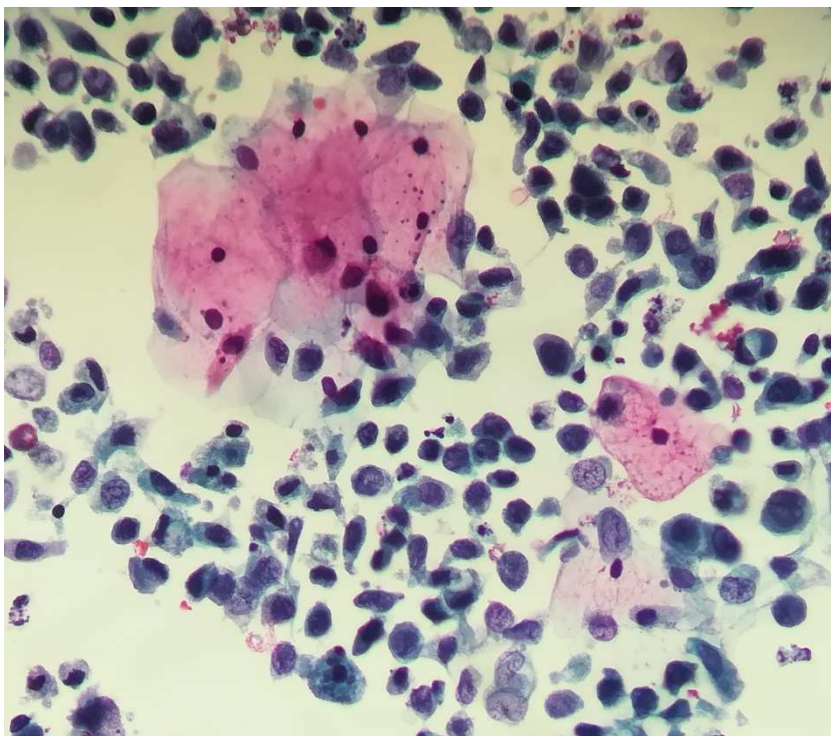


Fig. 32: Colorazione standard di Papanicolaou modificato di urine

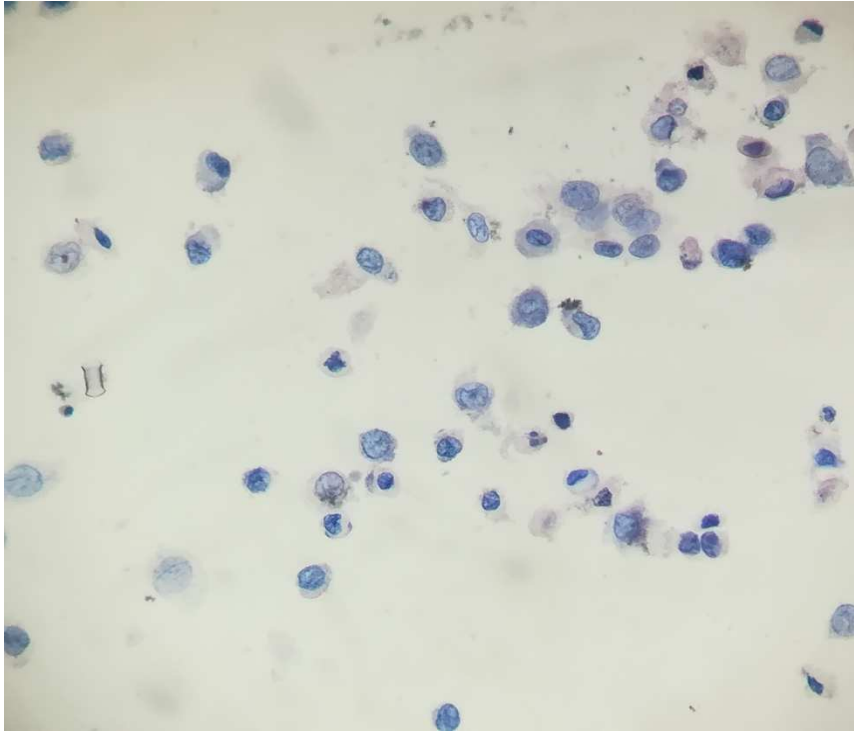


Fig. 33: Colorazione di Blu di Toluidina con il metodo sviluppato

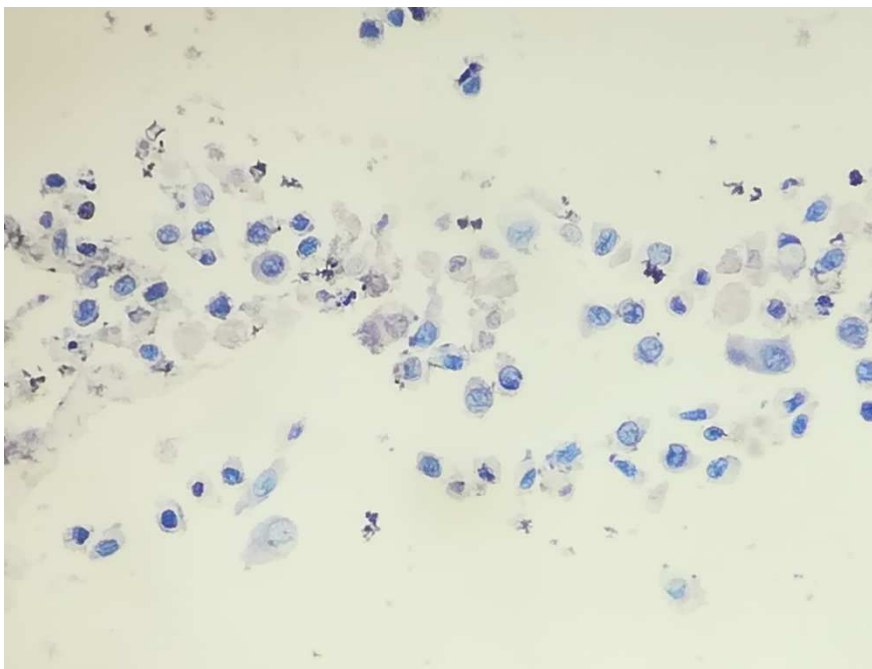


Fig. 34: Colorazione di Blu di Toluidina con il metodo sviluppato

6. DISCUSSIONE

Per mettere appunto una metodica che consentisse il mantenimento dei dettagli citonucleari tali da permettere la più appropriata valutazione diagnostica, sono state condotte diverse prove di laboratorio.

Abbiamo effettuato prove con diluzioni differenti 1:1 e 1:2 (campione : colorante) e con coloranti diversi, quali Blu di Toluidina, Ematossilina di Gill, May-Grunwald, Giemsa e Rosso Nucleo (nuclear fast red).

Abbiamo osservato che la diluzione 1:2, per tutti i coloranti impiegati, è risultata la migliore, in quanto consente una migliore definizione dei caratteri citonucleari all'osservazione microscopica.

Tra i coloranti utilizzati abbiamo ottenuto degli ottimi risultati con il Blu di Toluidina e apprezzabili con l'Ematossilina di Gill.

Gli altri coloranti utilizzati non hanno fornito dei risultati per noi soddisfacenti, poiché all'esame microscopico si perdevano i caratteri citomorfologici, altrimenti importanti per la definizione diagnostica.

Inoltre, nella processazione, sono stati testati due metodi diversi di fissazione: in alcol 95% e lasciando asciugare il vetrino all'aria e dalla nostra osservazione è emerso che il primo metodo di fissazione consente una migliore conservazione dei dettagli citonucleari del campione esaminato.

Un altro aspetto molto importante è la quantità di campione biologico utilizzato per l'esecuzione del citocentrifugato (circa 250 µl), questo infatti consente di utilizzare il restante liquido biologico per ulteriori indagini con tecniche ancillari.

I protocolli di processazione standard utilizzati in laboratorio per la colorazione di routine (Papanicolaou) più la successiva indagine di immunocitochimica, richiedono in totale generalmente circa 3 ore e 15 minuti.

Con la metodica descritta in questo lavoro di tesi si riducono i tempi tecnici di allestimento e colorazione dei campioni biologici da circa 75 minuti a ben 10 minuti fornendo un primo e preciso orientamento diagnostico al patologo, il quale può richiedere sullo stesso vetrino osservato in microscopia ottica indagini immunocitochimiche riducendo notevolmente i tempi diagnostici.

7. CONCLUSIONE

La metodica sperimentata in questo lavoro, ci consente di ridurre notevolmente i tempi di processazione (da 75 minuti per la procedura standard, a 10 minuti con la nostra metodica, con un risparmio di ben 65 minuti); inoltre l'utilizzo del Blu di Toluidina, come unico colorante in grado di evidenziare in maniera molto soddisfacente le caratteristiche citonucleari degli elementi contenuti nei liquidi biologici esaminati, si è rivelato ottimale per fornire al citopatologo un primo orientamento diagnostico.

Il raggiungimento degli obiettivi prefissati all'inizio del presente lavoro ha portato allo sviluppo di un protocollo laboratoristico che potrebbe essere applicato laddove si rende necessaria una diagnosi rapida sia citomorfologica che immunocitochimica.

Sarebbe interessante applicare la stessa procedura sul materiale biologico che rimane all'interno degli aghi utilizzati per il prelievo citologico, mediante agoaspirazione, di noduli mammari, tiroidei, linfonodi e di organi profondi quali fegato, pancreas e polmone.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. **Citologia:** http://www.treccani.it/enciclopedia/citologia_res-5413b691-87e9-11dc-8e9d-0016357eee51_%28Enciclopedia-Italiana%29/
2. Confortini M., *Il ruolo attuale e futuro della citologia:* <https://www.onb.it/wp-content/uploads/2014/03/Ruolo-citologia.pdf>
3. Bongiovanni M., *Citologia dei versamenti:* <https://docplayer.it/31766143-Citologia-dei-versamenti-massimo-bongiovanni-md.html>
4. **Toracentesi:** <https://www.airc.it/cancro/affronta-la-malattia/guida-agli-esami/toracentesi-paracentesi>
5. **Paracentesi** – Articolo di Canova G.S., Nurse24 : <https://www.nurse24.it/studenti/procedure/paracentesi-evacuazione-liquido-ascitico-peritoneale.html>
6. **Pericardiocentesi:** <https://www.albanesi.it/salute/interventi/pericardiocentesi.htm>
7. **Metacromasia:** Bergeron JA; Singer M. Metachromasy: An Experimental and Theoretical Reevaluation. *J Cell Biol*, 1958; 4:433-457
8. **Ematossilina di Gill:** <https://www.proekosrl.com/shop/ematossilina-di-gill/>
9. **Rosso Nucleo:** <https://www.bosterbio.com/nuclear-fast-red-ar0008-boster.html>

10. Boccato P., *Citopatologia diagnostica – volume VIII – trattato italiano di medicina di laboratorio*, Piccin, 2006 – seconda edizione (capitolo 30)

11. **BerEP** - Mayo Clinic Laboratories:
<https://www.mayocliniclabs.com/testcatalog/Clinical+and+Interpretive/70364>

12. **Citocheratina 19**: Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K, *Intermediate-sized filaments of human endothelial cells*, in *J Cell Biol.*, vol. 81, n° 3, 1979, pp. 570–580, DOI:10.1083/jcb.81.3.570, PMC 2110384, PMID 379021

13. **Citocheratina 7**: Entrez Gene: KRT7 keratin 7

14. Nat Pernick, M.D., **Stains TTF1**:
<https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsttf1.html>

15. **PAX8**: Entrez Gene: PAX8 paired box gene 8

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la sezione di Citopatologia Diagnostica della SOD di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Ospedali Riuniti Ancona, per avermi permesso di frequentare i laboratori e di svolgere questo studio per la mia tesi.

In particolare, un ringraziamento al Dott. Raffaele Sabbatini che con la sua professionalità mi ha seguita attentamente durante il lavoro svolto, facendomi conoscere anche gli aspetti meno conosciuti delle attività che si svolgono all'interno del laboratorio di citopatologia.

Inoltre, ringrazio la Dott.ssa Elena Antaldi che pazientemente è stata sempre disponibile e pronta a rispondere ad ogni mio dubbio, la Dott.ssa Doriana Morichetti per la sua disponibilità.

Un ringraziamento ai miei genitori che mi hanno permesso di intraprendere questo percorso e che mi hanno accompagnata fino al traguardo.

A Marco, che mi ha motivata ogni volta, che mi è stato accanto dall'inizio alla fine, insegnandomi anche come affrontare delle situazioni particolari.

A zia Liviana, la mia ancora, il porto sicuro che mi ha permesso di rendere ancora più speciale e perfetta questa giornata.

A tutta la mia famiglia, alle mie amiche Chiara, Silvia, Federica, Marta, Michela, Cristina, Nicole, Valentina e Sabrina.

Infine, ringrazio i miei compagni di classe con i quali ho condiviso il vivo di questa esperienza, momenti belli e brutti, le lunghe giornate piene di risate, in particolare ringrazio Giada, Camilla, Giulia, Matteo, Enrico ed Antonio.

Alice