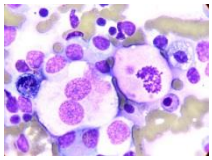


Dr Giorgio Cancedda Medico Veterinario
Ord. Prov. CA n°250
Socio SICIV - Società Italiana di Citologia Veterinaria
Consulenza in Patologia clinica, citologia, istopatologia
Via Veneto n° 8 cap 09013 Carbonia (CI)
P IVA 03900190921
cell 39.3283539041
e-mail cancedda.gio@tiscali.it - canceddavet@gmail.com PEC: giorgio.cancedda@pec.ordineveterinaricagliari.it

gestione e spedizione campioni istologici e citologici

Considerazioni preanalitiche:

Tutti i pezzi anatomici sia di natura escissionale (masse di varia natura) che incisionale (punch, losanga, tru-cut) avviati all' istopatologia hanno necessità di essere adeguatamente e prontamente fissati dopo l' asportazione chirurgica a causa dei fenomeni autolitici a cui vanno inevitabilmente incontro, evitando tempi morti o ritardi che possono determinare alterazioni irreversibili non più rimediabili dal patologo. A tal fine si raccomanda di immergere al più presto i campioni in adeguata quantità di formalina tamponata al 10% che deve essere preferibilmente in rapporto 10:1 rispetto alla quantità di tessuto da fissare. La velocità di penetrazione della soluzione di fissaggio è a temperatura ambiente non superiore a 1 mm/h per cui una adeguata fissazione si può raggiungere abbastanza rapidamente per le piccole biopsie mentre per i pezzi che eccedano i 3 cm ci sarà necessità di eseguire delle incisioni incomplete per permettere alla formalina di fissare il tessuto anche in profondità prima che lo stesso vada incontro a fenomeni di autolisi nelle sue parti centrali. Di tutta evidenza come debbano essere utilizzati contenitori capienti ed elevate quantità di formalina, stoccate in appositi locali ben ventilati e mai sottoposti ad elevate temperature.

La bocca dei contenitori deve essere sufficientemente ampia, tale da permettere l' inserimento dei pezzi senza forzature, quando fissati tendono ad indurirsi notevolmente, talvolta costringendo l' operatore a tagliare o rompere i flaconi per evitare di danneggiare la biopsia prima del trimming.

Esempio:

tutte le procedure inopportune o evitabili irritano il patologo (nel vero senso della parola), dilatano i tempi di lavorazione ed espongono a vapori tossici che non sempre le cappe riescono a limitare adeguatamente.

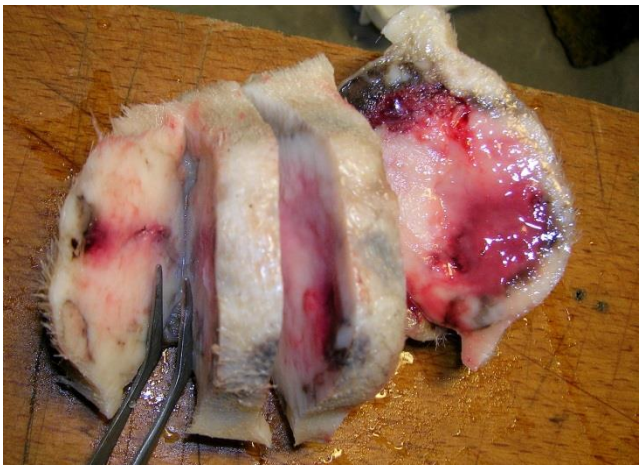
I pezzi istologici non vanno mai congelati, tuttavia in particolari situazioni è possibile trovarsi di fronte a cadaveri o pezzi anatomici che sono stati sottoposti a congelamento con successiva richiesta di indagine IP, in questi casi è buona norma prendere contatto con il patologo e concertare con lo stesso una strategia che varierà in base alla presentazione eventuale, che varierà a seconda si tratti di pezzo anatomico o di cadavere, il suggerimento di massima sarà uno scongelamento lento in ambiente refrigerato a 4-8°C con contestuale immersione in formalina tamponata per diversi giorni. Generalmente tali istologici sono portatori di artefatti di cui però si tiene adeguatamente conto, ma è sempre meglio una istopatologia su congelato che non fare nulla.

Come non si fa:

Neoformazioni non sezionate ed immerse in quantità insufficienti di fissativo, con evidenti fenomeni autolitici centrali

Evitare contenitori inadeguati rispetto la massa da fissare

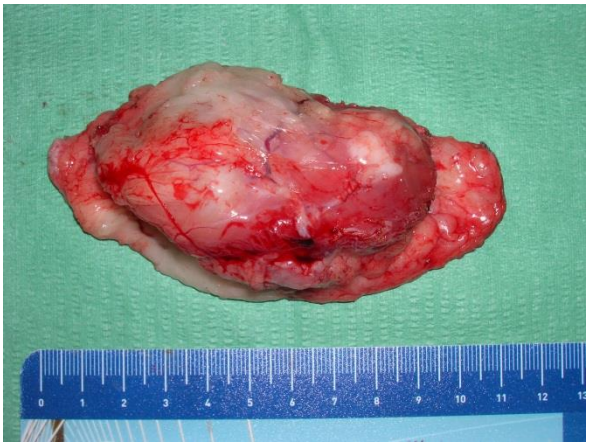
Evitare i contenitori di vetro per il rischio si frantumino (o prima o poi)



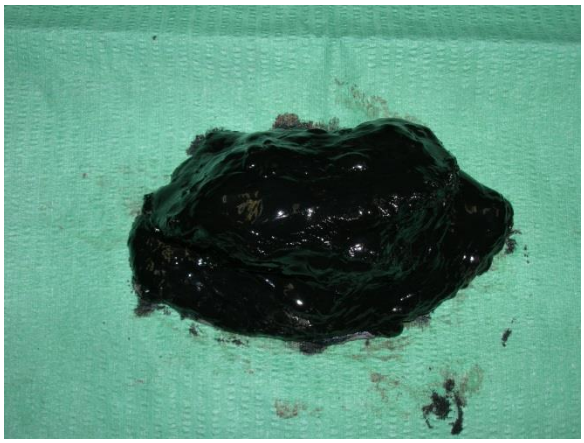
E’ opportuno eseguire tagli incompleti a distanza di 2 cm max rispettando la superficie di escissione chirurgica per mantenere integra la struttura complessiva e permettere una corretta valutazione dei margini.

A tale scopo è utilissimo nel post chirurgico marcare i margini di escissione con inchiostro di china o tempere istologiche apposite spennellando la superficie preventivamente asciugata e lasciando asciugare almeno mezz’ ora prima di immergere i pezzi nel fissativo, tale processo potrebbe avvenire in ambiente fresco o in frigorifero ma anche a temperatura ambiente tali tempistiche non influiscono significativamente sulla fissazione. Da queste considerazioni sono escluse le biopsie degli organi viscerali (fegato, polmone, milza, pancreas, intestino ecc..).

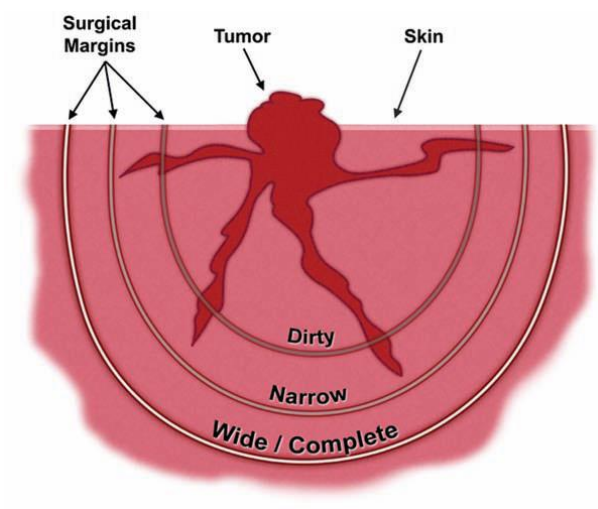
Es: massa sarcomatosa appena escissa, versione fronte/retro.

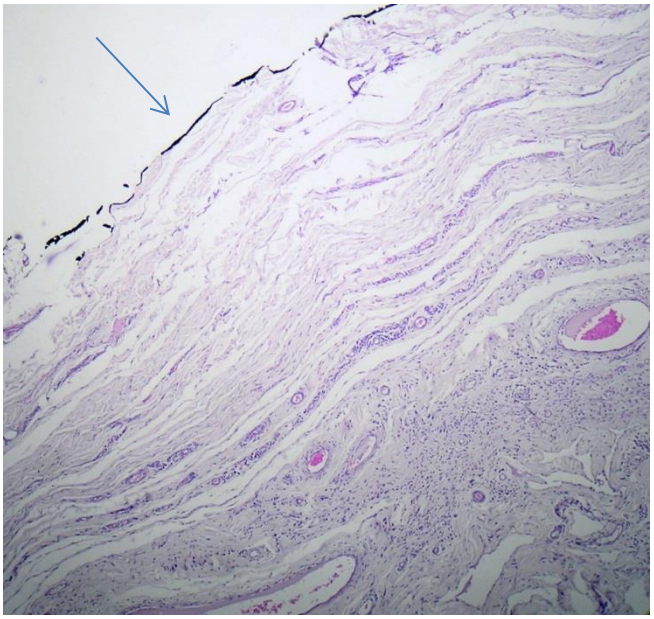


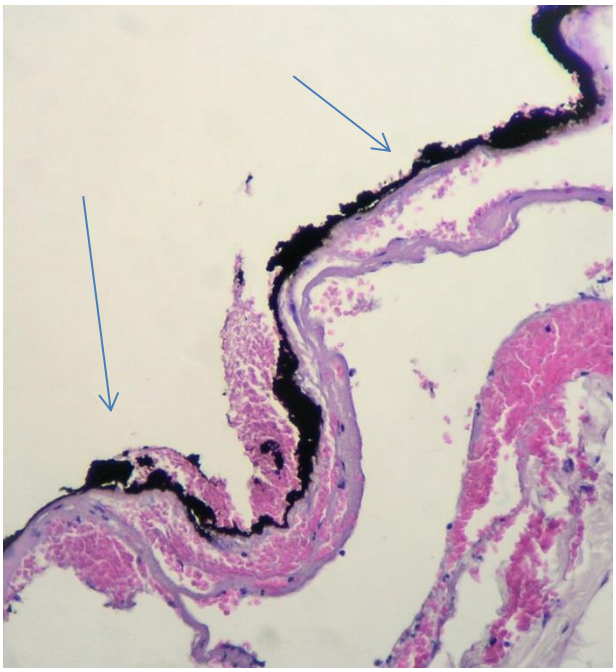
Inchiostramento del piano di escissione e taglio incompleto sulla superficie cutanea per permettere la fissazione adeguata in profondità.



Tale procedura permette di snellire il lavoro del patologo e stabilire con maggiore precisione in sede istopatologica la radicalità dell' escissione.

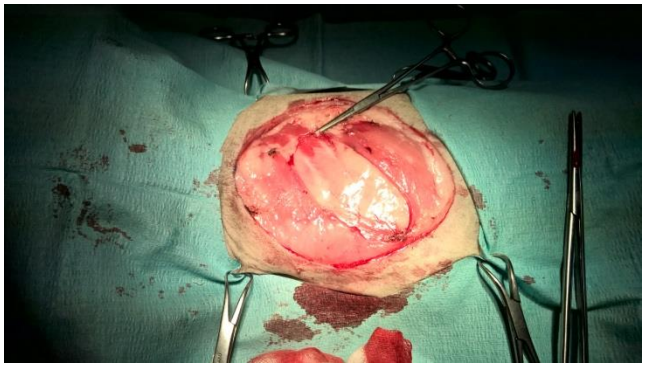


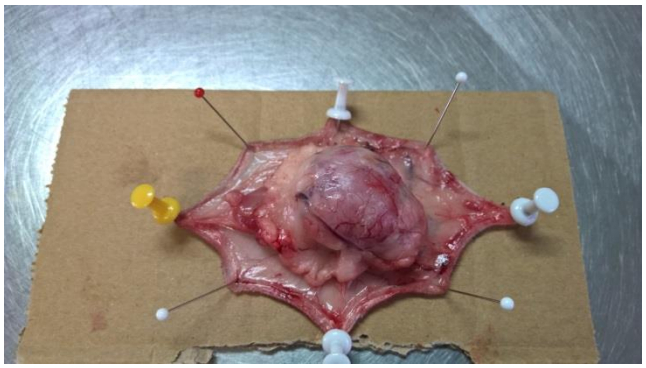




China ink

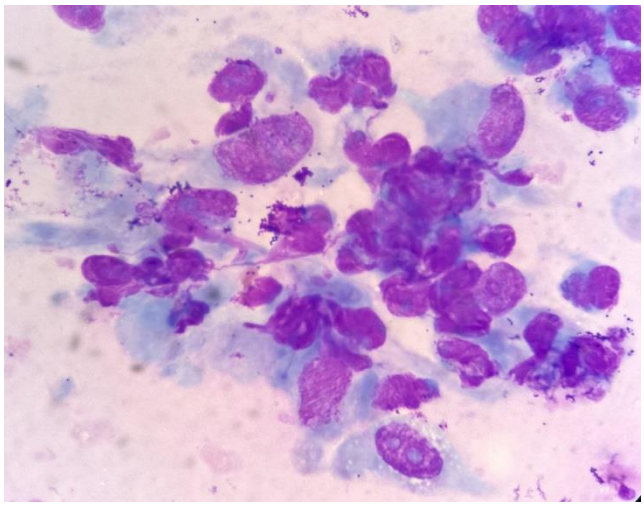
Una o più foto macro prechirurgiche sono in genere bene accette come pure una scheda di segnalamento ben leggibile con adeguata quantità di informazioni cliniche, compresi rilievi analitici, eco, rx, tc ecc corredate di relative refertazioni, se disponibili. Considerati i mezzi tecnologici attualmente a nostra disposizione una o più fotografie con smartphone o digital cam non portano via più di qualche secondo e a volte possono essere illuminanti per il patologo/clinico o in caso di richiesta di altro parere da parte di altro esperto.

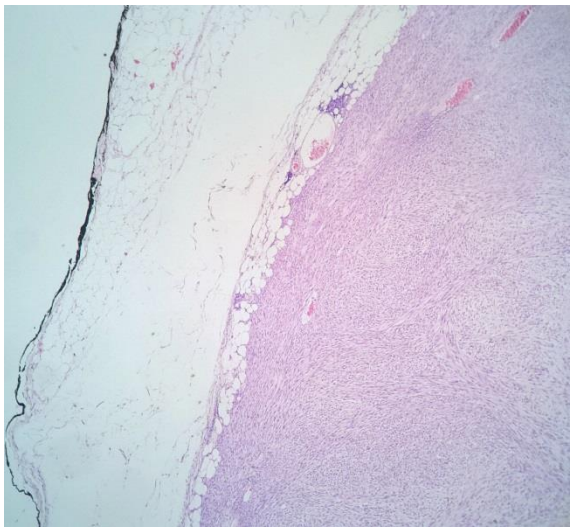




Distendere il campione nella sua condizione originale puntandola con degli spilli o suturandola su una superficie rigida (plastica, cartoncino, legno), permette di snellire il lavoro e prevenire la coartazione e l' arricciamento delle biopsie a causa del diverso grado di retrazione dei vari strati come cute, adipe, muscoli e

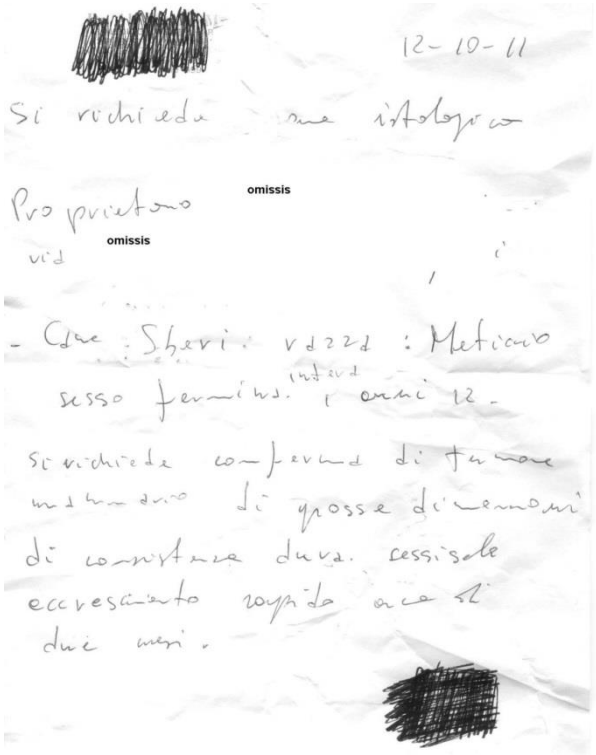
fasce che provocano l' alterazione della stratigrafia originale.





La citologia ad ago sottile in sede di pianificazione dell' intervento è imprescindibile per decidere la dose chirurgica adeguata, es: sarcomi o mastocitomi vs neoplasia benigne o altamente sospette tali.

Lettere di accompagnamento: errori da evitare



Fogli vergati a mano frettolosamente, poco leggibili fonte di errori di interpretazione e trascrizione e recanti informazioni e segnalamento incompleti, tale eventualità costringe il patologo a contattare il veterinario referente, spesso perdendo tempo al telefono per ottenere informazioni utili che si danno erroneamente per scontate o superflue.

Preferibile uno stampato con un impianto di voci standardizzato in maniera da evitare di omettere qualcosa:

Modulo richiesta esame citologico/istologico

Dati ambulatorio/clinica inviante:

Dati Proprietario animale:_____

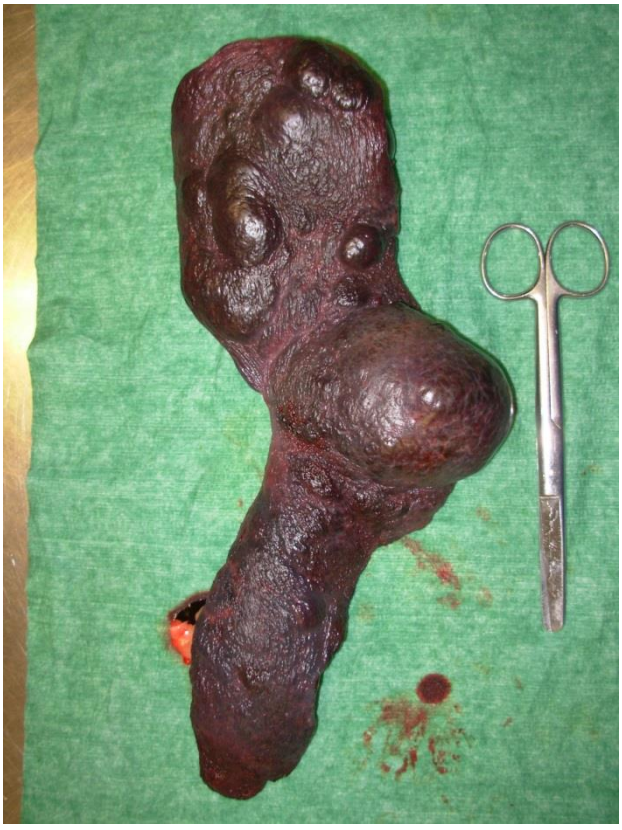
Dati animale: nome: _____specie: _____ Razza_____
_____ sesso e cond. riproduttiva: _____ età:
_____mantello: _____
storia clinica: (quando è comparsa la lesione, terapie effettuate ecc…)
_____
_____
_____
_____
_____
_____
citologico __ biopsia incisionale/punch ___ biopsia escissionale _____
sede del prelievo :
aspetto della lesione/massa : (colore, forma, dimensione, consistenza e adesione ai piani circostanti_____
_____
_____
n.b: ricordare che per le masse neoplastiche o sospette tali, per una valutazione corretta dei margini chirurgici è imprescindibile il marcamento della superficie escissa tramite tempera colorata o china inch, e l' orientamento spaziale della biopsia tramite l' inserimento di punti di riferimento, come spilli a testa colorata o fili da sutura. Per eventuali dubbi per le corrette procedure chiedere informazioni aggiuntive al laboratorio. Ricordare inoltre che è buona norma prima di mettere masse e biopsie in formalina, farne delle apposizioni delicate delle superfici di taglio su due o più vetrini puliti e sgrassati, poiché la citologia concede spesso utili informazioni per integrare l' istopatologia.

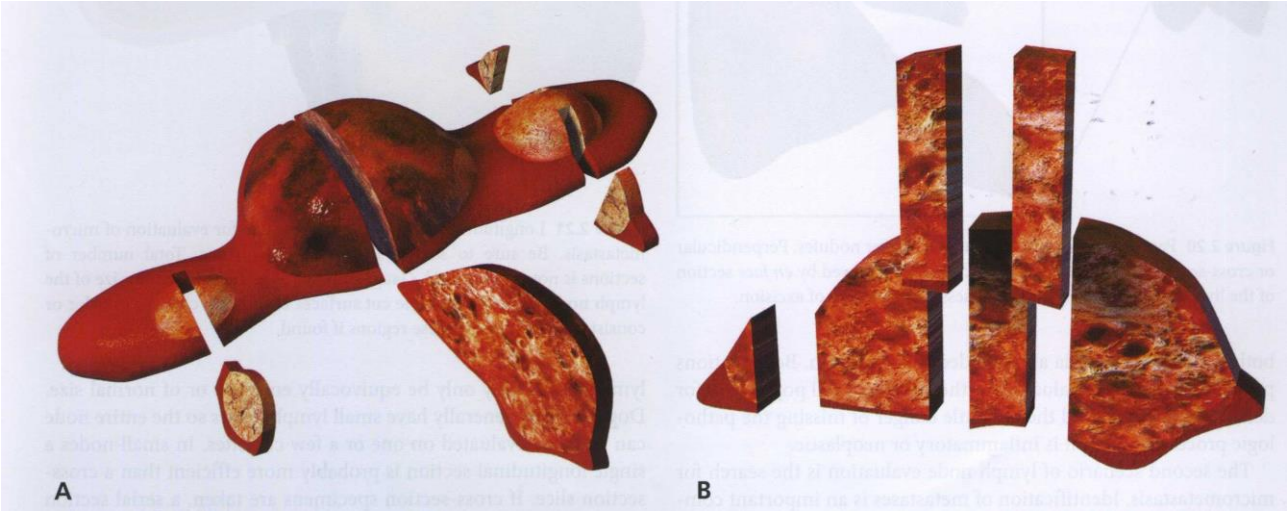
N.B: TUTTI I CAMPI SONO OBBLIGATORI! Le righe non sono lì per figura e vanno RIEMPITE TUTTE !!

Le masse molto voluminose o quelle costituite da noduli multipli come le neoplasie mammarie non devono obbligatoriamente essere inviate intere per motivi di ingombro ed impossibilità di fissarle adeguatamente in tempi rapidi, a meno che non sia possibile recapitarle direttamente al laboratorio nel volgere di poche ore, in tal caso sarà onere del patologo scegliere le aree suscettibili di sezionamento e fissazione, è considerato aleatorio fare l' esame di TUTTA la massa in quanto richiederebbe una mole di lavoro impensabile ed a costi improponibili (cosiddetta istopatologia 3D), piuttosto sarà opportuno da parte del clinico selezionare le aree più interessanti della massa, preferibilmente saranno rappresentate da una sezione profonda, varie superficiali preferibilmente ortogonali (metodo cross-sectioning combinato variamente con il cross-Breadlof o Mohs) , in tutti i casi andranno evitate le aree colliquate, necrotiche ed emorragiche che raramente concedono informazioni diagnostiche.

Le neoplasie mammarie vanno inviate intere nei limiti del possibile, se no identificati i vari noduli con fili da sutura o in diversi contenitori, nelle mastectomie inguinali va individuato ed isolato dal grasso il relativo linfonodo al fine di permetterne una tempestiva fissazione ed evitare una indaginosa ricerca sul tessuto già fissato. La mammella va sezionata in tagli trasversali al suo asse maggiore cercando di mantenere intere le neoformazioni, ciò permetterà al patologo di ottenere sezioni a tutto spessore e valutare meglio pattern di crescita ed eventuali invasioni vascolari e linfatiche peritumorali o in prossimità dei linfatici dermici.

Neoplasie e masse spleniche: non inviare la milza intera a meno di non farla recapitare in patologia nel giro di mezza giornata, le caratteristiche particolari dell' organo non permettono una adeguata fissazione, pertanto sarà necessario da parte del chirurgo o del clinico sezionare su banco una quantità variabile da 8 a 12 aree dello spessore massimo di 1 cm che comprendano le parti sospette, nodulari, solide, cistiche o comunque sede di alterazione avendo cura di comprendere oltre la capsula anche il punto di passaggio con il parenchima apparentemente integro. Andranno accuratamente evitate le aree contenenti coaguli grossolani contigue a rotture capsulari e parti colliquate o evidentemente necrotiche di scarsa utilità.





Schema operativo di come si gestisce il prelievo di pezzi istologici di una milza “a banco”, solo le parti sottili devono essere immerse in fissaggio, del resto non è umanamente possibile fare l’ istopatologia di un intera milza come del resto delle masse molto voluminose, sta al clinico acquisire un minimo di conoscenze operative in patologia per decidere le sezioni da avviare al laboratorio. In caso di dubbio contattare il patologo per esigenze particolari.

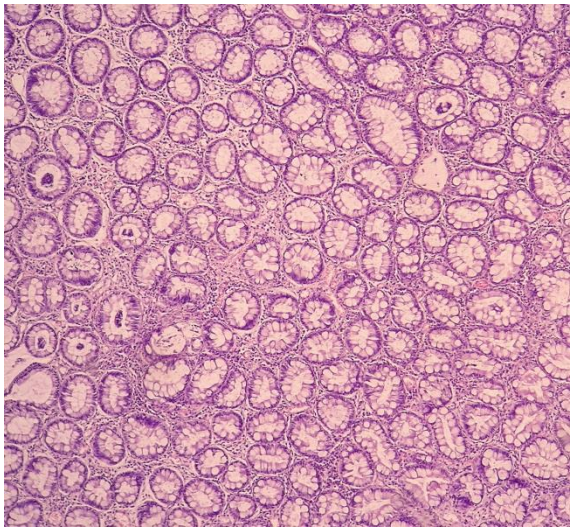
Rene: quando viene eseguita la nefrectomia l’ organo va inciso incompletamente fino al bacinetto e immerso tal quale in sufficiente quantità di formalina, se non fosse possibile inviarlo per intero si selezioneranno 3-4 cunei corticomidollari relativi ad aree significative, sempre cercando di comprendere la pelvi.

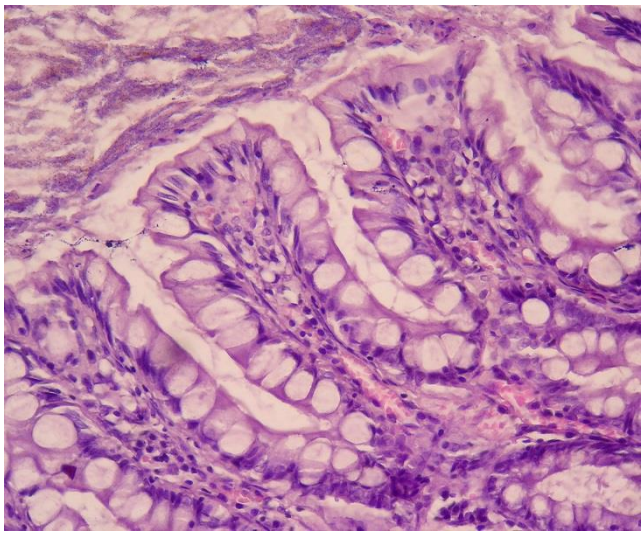
Testicolo: va sezionato sagittalmente lungo il rafe mediano ed eseguendo su indicazione dei rilievi clinici ed ecografici vari tagli incompleti comprendendo l’ epididimo e il funicolo, avendo cura di esaminare tutto il parenchima in quanto frequentemente possono sussistere a carico dell’ organo neoplasie multiple e di diversa natura variamente in combinazione tra loro e spesso non deformanti il profilo e la dimensione dell’ organo. Tale procedura è adottata analogamente per quanto riguarda le masse ovariche, che se non molto voluminose è preferibile siano fissate intere.

Osso: le biopsie ossee se non particolarmente litiche devono subire un processo di decalcificazione, che sarà più breve per le carote ottenute con ago di Jamshidi o Mallarme, mentre sarà cura del clinico in caso di pezzi anatomici provenienti da amputazioni (es osteosarcomi) segare con sega oscillante o banale seghetto per il ferro il raggio osseo interessato cercando di ridurre le sezioni a pochi cm, altrimenti sarebbe aleatorio pretendere di fissare adeguatamente un intero arto o una massa ossea avvolta da cute, grasso e muscoli.

Il solo processo di decalcificazione può richiedere da uno fino a diversi giorni, allungando discretamente i tempi di refertazione, cosa di cui si dovrà tenere conto nei tempi di attesa da comunicare ai proprietari.

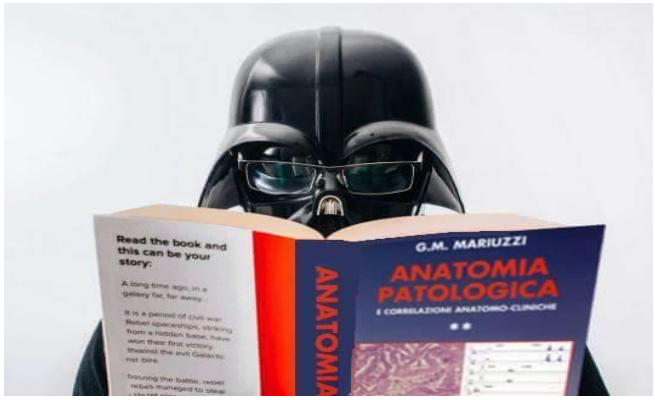
Le piccole biopsie ottenute per via endoscopica di cavità nasali, tubo gastroenterico, vie urinarie ecc.. dovrebbero essere orientate dall’ endoscopista su piccoli nastri di nitrato di cellulosa (http://www.bio-optica.it/pdf/EndoKit.pdf) che permettono di ottenere sezioni ortogonali alla stratigrafia delle mucose evitando orientamenti casuali che possono fare ottenere tagli non adeguati.





Orientamento non adeguato orientamento adeguato

L' invio dei campioni deve essere eseguito sempre con contenitori assolutamente ermetici e robusti per evitare pericolosi sversamenti, meglio se a doppia camera e bene imballati, se già adeguatamente fissati da almeno 2-3 giorni è possibile sversare parte della formalina e tenere in bagno umido, al fine di alleggerire il contenuto se voluminoso e limitare i costi di spedizione. Parimenti oltre che utilizzare delle comuni Eppendorf è possibile per masse piccole già fissate, sigillarle bene in una serie di bustine di polietilene a chiusura ermetica a grip e sigillarle ulteriormente con scotch, per poi spedirle tramite posta o corriere all' interno di ordinarie buste gialle imbottite con bolle d' aria (comuni sacboll Blasetti o simili).



I due contenitori a sinistra sono assolutamente inadeguati, apparentemente solidi tendono con pochi urti ad aprirsi e perdere liquido, come vantaggio posseggono una bocca larga adeguata ad estrarre pezzi relativamente voluminosi, i due raffigurati a destra hanno ottima contenzione per i liquidi, ma hanno il difetto di avere la bocca relativamente stretta, vanno bene per pezzi piccoli e medi.

Di seguito sono rappresentati una serie di contenitori adeguati con chiusura ermetica affidabile.

Parimenti vanno evitati contenitori specificamente dedicati alle urine che sono fragili ed assolutamente inadeguati.

Considerazioni analitiche ed operative:

La lavorazione del campione una volta avvenuta la ricezione avviene secondo diversi step e può richiedere da pochi giorni in caso di processazione standard e valutazione con colorazione di routine Ematossilina-eosina, fino a settimane in relazione alle diverse esigenze tecniche ed alla complessità del caso, che talvolta può suggerire approfondimenti ulteriori con l' esecuzione di colorazioni istochimiche particolari (PAS, Blu di toluidina, Giemsa, Ziehl Neelsen ecc.) o immunoistochimiche di complessità ancora superiore. In tali casi i costi di processazione subiscono variazioni sensibili rispetto le procedure standard e andranno concordati di volta in volta con il laboratorio in base alla mole di lavoro e i materiali necessari.

La lavorazione standard avviene secondo il seguente schema, che può variare leggermente nei tempi e nei materiali a seconda del laboratorio o delle preferenze del patologo:

1) ricezione ed identificazione dei pezzi istologici;

2) lavaggio per rimozione del liquido di fissaggio e trimming dei pezzi per la riduzione alle sezioni desiderate, da pochi mm a diversi cm, fino a più sezioni in relazione alle diverse esigenze;

3) passaggi nella scala ascendente degli alcoli, mediamente 1 h o più in ogni alcool 70°, 80°, 95°, 95°, 100° abs tre passaggi;

4) Xilene da due a tre passaggi di 1 h circa o più

5) immersione in bagno di paraffina fusa 56°-58° che richiede almeno tre passaggi di diverse ore a meno che

non si abbia a disposizione un processatore automatico sotto vuoto che permette di accorciare i tempi;

6) blocchettamento nelle specifiche formelle e raffreddamento delle sezioni;

7) taglio al microtomo, distensione delle fette su bagno di acqua distillata con colla albuminica, raccolta delle stesse su vetrini ed asciugatura delle sezioni in termostato a 40°

8) sparaffinatura in xilene 2 passaggi e reidratazione progressiva con passaggi di 1 min da alcool assoluto (2 passaggi), alcool 95°, 70°, 50°, sezioni all' acqua;

9) colorazione routine con Ematossilina in tempi variabili, differenziazione con acqua di Scott e acqua corrente, tempi variabili;

10) passaggio in eosina alcolica o acquosa sempre con variazioni temporali in base alla tipologia e il grado di utilizzo del colorante e successiva disidratazione delle sezioni con passaggi rapidi nella scala ascendente degli alcoli, 95° x 2, 100° x 2, in seguito due passaggi in xilene sempre in tempi molto variabili, dunque si può passare al montaggio in resina dei vetrini.

Come si può osservare anche la sola preparazione standard richiede elevato dispendio tempi e materiale e non ultimo, elevato dispendio di energie psicologiche e fisiche, in considerazione di ciò è opportuno comunicare con il patologo preferibilmente tramite e-mail ed evitare sollecitazioni telefoniche che sono fonte di perdite di tempo medio/elevate. Il contatto telefonico si riserverà piuttosto ai colloqui necessari ad aggiornare il caso con informazioni cliniche supplementari intervenute nel frattempo o complementari come variazioni del quadro sintomatologico, comparsa di nuove lesioni ecc..

A MENO CHE NON CI SIANO ESIGENZE DIAGNOSTICHE GRAVI ED IMPELLENTI NON SI METTE MAI PREMURA AL PATOLOGO SOLO PER SODDISFARE L' ANSIA DEI PROPRIETARI, LA FRETTA E' CATTIVA CONSIGLIERA ED E' FONTE DI ERRORI NON SEMPRE RIMEDIABILI.

In ogni caso si deve sempre tenere presente che eventuali errori preanalitici già citati in precedenza non possono essere rimediati dal patologo ed assumono connotazione di irreversibilità con le sgradevoli conseguenze del caso.

Considerazioni postanalitiche e diagnostiche:

In questa delicata fase la collaborazione tra il clinico ed il patologo deve essere massima, quest' ultimo anche se spesso ha sufficienti conoscenze cliniche sia di medicina interna che di chirurgia, non sa nulla e non ha visto nulla del paziente e deve fare affidamento alle informazioni che devono essere quanto più dettagliate possibile. Da parte sua il clinico dovrà leggere il referto con attenzione ma con spirito critico, senza esimersi dal manifestare qualunque perplessità se a suo giudizio riportante considerazioni non in linea con il quadro clinico. Un rilievo istopatologico può sempre essere rivalutato ed approfondito, è sempre possibile integrare il caso con ulteriori sezioni seriali o ulteriori sezioni su tessuti residui ancora presenti in fissaggio. Tale pratica deve essere considerata come collaborazione in equipe, non dissimile da ciò che avviene in clinic in tempo reale tra anestesista, chirurgo, ecografista, patologo clinico.

Il referto che si presenterà al clinico è in genere caratterizzato da una sola pagina di testo (eventualmente corredata di documentazione iconografica), in cui sarà indicato n° progressivo del caso, struttura che ha riferito il caso, segnalamento del soggetto e dati clinici, tipologia e numero dei materiali ricevuti.

La descrizione è generalmente concisa e limitata a sette frasi o poco più, con una struttura "a piramide" che descrive il campione dall' aspetto macroscopico fino agli ingrandimenti maggiori (40x max), sarà importante focalizzare l' attenzione sulle definizioni tecniche, es: "cutaneo" o "sottocutaneo" non sono la stessa cosa e possono avere connotazioni diverse, come ad es valutazione prognostica tra mastocitoma cutaneo e s.c.

I tessuti che si ritengono normali non vengono descritti, mentre vengono segnalati la densità cellulare, la presenza o meno di capsula e la natura dello stroma di sotegno, il pattern di crescita se espansivo o infiltrante, presenza di flogosi, emorragia, necrosi, invasione dei margini chirurgici, alterazioni vascolari e linfatiche, presenza o sospetta presenza di agenti eziologici.

La descrizione successiva è riservata al medio e forte ingrandimento in cui vengono riportate succintamente le caratteristiche istogenetiche se rilevabili con certezza, forma, coesività ed atipie presenti nel tessuto in esame, viene inoltre valutato il tasso mitotico e la eventuale presenza di figure atipiche, bizzarre, multinucleazioni e figure apoptotiche.

Alla voce "Diagnosi" dovrà essere dedicata particolare attenzione in quanto da questa derivano una buona parte delle sensazioni di frustrazione. Le eventualità potrebbero essere diverse, nella maggior parte dei casi si avrà per fortuna una **diagnosi perentoria di certezza**, quando il quadro diagnostico non presenta difficoltà interpretative di sorta, in altri casi si potrà avere una interpretazione spalmata su due o più diagnosi differenziali (es. linfoma vs sarcoma istiocitario), in questi casi si suggerisce frequentemente il ricorso ad approfondimenti di natura immunoistochimica. Altra eventualità interviene quando il patologo emette una diagnosi di **"compatibilità"** con una determinata affezione, in questo caso il termine indica una elevata probabilità che si tratti della patologia in oggetto ma esprime la mancanza di certezza assoluta perché il campione esprime diverse caratteristiche della patologia in oggetto ma non tutte. La diagnosi di **"suggestione"** è altra eventualità in cui il patologo individua alcune alterazioni tipiche di una patologia, ma non di quella sospettata dal clinico, in pratica il patologo gli "suggerisce" elegantemente l' esistenza di altra possibile patologia.
Altre volte la delusione sarà più palpabile, soprattutto quando ci saremo dannati l' anima ad ottenere dei prelievi in zone impossibili con anestesie epiche per poi vederci un referto istopatologico non diagnostico. Questo nella maggior parte dei casi sarà descrittivo, cioè il patologo non emette né una diagnosi né un diagnostico differenziale perché il campione ha delle alterazioni troppo aspecifiche, come necrosi, emorragie o flogosi.
Più di rado il referto riporterà una risposta aspecifica per campionamento insufficiente o campione non adeguato, o ancora peggio quando non proviene dalla sede indicata; es: si invia campione epatico per inda-

gine istopatologica, se il campione è rappresentato da tessuto polmonare, pancreatico o renale il patologo, che è persona corretta e professionale, emetterà un giudizio di materiale patologico non adeguato ed inviterà ad un ricampionamento. Le maledizioni le riserverà piuttosto ad una più riservata conversazione telefonica al fine di fare più attenzione nell' eseguire il prelievo dalla sede corretta ed in modo più ortodosso.

(periodo tratto quasi integralmente dal "cito-tricks" i cento trucchi del citologo provetto, Giorgio Cancedda, edizioni Belvedere 2011, ormai introvabile ma reperibile tramite l' autore in forma di e-book).

Il **commento** non viene sempre stilato e sarà l' ultima parte a corollario e completamento del referto riservata ad eventuali criticità, diagnosi differenziali possibili ed alternative, permanenza di dubbi o ed eventuali suggerimenti nell' esecuzione di ulteriori campionamenti o indagini supplementari. Più raramente il patologo vi esprimerà giudizi di carattere prognostico che in linea generale spettano al clinico. Un generico suggerimento ad una revisione chirurgica per margini insufficienti deve comunque essere preso in seria considerazione.

In caso il clinico non sia convinto della diagnosi o del ventaglio di diagnosi differenziali proposte va concertata assieme al patologo la richiesta di una seconda opinione, che può essere estesa ad uno o più patologi esperti, sia come second opinion sui campioni già esistenti o come rivalutazione del caso su altre sezioni seriali degli stessi blocchetti o su ulteriori pezzi istologici formalinati residui se ancora disponibili (eventualità auspicabile).

Tale pratica non deve essere presa come mancanza di fiducia nel primo patologo ma anzi è ampiamente utilizzata per aumentare l' accuratezza diagnostica di un lavoro di equipe, come non ci si stancherà mai di ribadire. L' istopatologia e l' anatomia patologica in generale riconoscono migliaia di variabili impossibili da valutare e una miriade di patologie spesso associate tra loro con presentazione frequente di casi atipici ed insoliti con cui non c' è particolare confidenza, per cui l' errore va sempre valutato come possibile.

I WILL DO
PATHOLOGY
FOR FOOD
C Anderson MD

Non dormo, recupero.