

## PREPARAZIONE E ALLESTIMENTO DEI PREPARATI CITOLOGICI

*Francesco Cian DVM, Dip ECVCP, FRCPath, MRCVS - Specialista Europeo in Patologia Clinica Veterinaria*

La citologia è un valido strumento per la diagnosi di molte patologie cutanee. È una tecnica rapida, economica, atraumatica e può essere facilmente eseguita dal veterinario, il più delle volte senza la necessità di sedazione o anestesia generale.

Tuttavia, il successo di tale procedura dipende da diversi fattori:

- scelta della tecnica di prelievo più adeguata e corretta esecuzione
- acquisizione di un campione rappresentativo della lesione
- corretto allestimento e colorazione del preparato citologico
- corretta lettura del preparato citologico

L'obiettivo di questo breve articolo è di guidarvi nel corretto processo di campionamento e preparazione dei preparati citologici. Essendo le masse cutanee le lesioni più comunemente campionate a livello ambulatoriale, ci soffermeremo su queste. Tuttavia la maggior parte delle informazioni che seguono sono rilevanti per tutti i campi della citopatologia diagnostica.

### Acquisizione e preparazione di un preparato citologico

#### Tecniche di prelievo

La tecnica di prelievo ideale dipende dalla

tipologia di lesione che viene campionata. La scelta della procedura corretta è cruciale, poiché un campionamento inadeguato (scarsa cellularità, scarsa preservazione cellulare) è una delle cause più comuni di campioni citologici non diagnostici. Maggiore è l'attenzione rivolta ad ottenere un buon preparato, maggiori saranno le probabilità di ottenere una diagnosi finale.

Esistono diverse procedure per il campionamento citologico di lesioni cutanee e non. Di seguito troverete elencate le procedure più comunemente utilizzate in citopatologia veterinaria.

#### A) Ago infissione / ago aspirazione

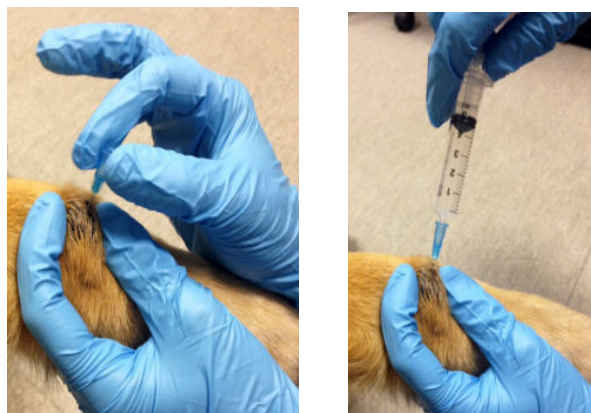
Queste sono le due più comuni tecniche utilizzate in citologia veterinaria per il campionamento di lesioni cutanee. La tecnica e la scelta degli strumenti può variare leggermente a seconda dell'operatore; per mia esperienza, raccomando l'utilizzo di una siringa da 2.5-5 ml e l'uso di un ago 22-25G. Come regola generale, più il tessuto da campionare è soffice, più piccoli saranno l'ago e la siringa da utilizzare per ottenere un preparato adeguato. Lesioni solide e dure richiedono spesso l'utilizzo di aghi e siringhe piuttosto grandi e di un'aspirazione più profonda al fine di ottenere dei preparati di cellularità adeguata.

**1. Ago infissione:** questa tecnica richiede soltanto un ago di dimensioni variabili (20/25G). L'ago viene inserito nella massa e ridiretto ripetutamente ad angolature

differenti, in maniera tale che il campione ottenuto sia rappresentativo dell'intera lesione. L'ago viene poi estratto dalla lesione, connesso ad una siringa (lo stantuffo deve essere sollevato), ed infine il materiale presente nell'ago viene espulso su un vetrino pulito. Questa tecnica è particolarmente utile per lesioni altamente vascolarizzate, in quanto minimizza la contaminazione ematica. Campioni citologici ottenuti con questa procedura possono essere talvolta scarsamente cellulari; in questi casi l'ago aspirazione può essere preferibile.

**2. Ago aspirazione:** questa procedura è particolarmente indicata per lesioni che tendono ad esfoliare poche cellule (es. sarcomi). La massa viene inizialmente stabilizzata tra le dita dell'operatore. Successivamente, l'ago (già connesso alla siringa) viene inserito nella massa e lo stantuffo della siringa viene sollevato in maniera tale da creare una pressione negativa all'interno della stessa. L'ago viene poi diretto in diverse direzioni all'interno della massa. Qualora durante l'aspirazione venga campionato del sangue, la procedura viene interrotta per ridurre il grado di contaminazione ematica. Lo stantuffo della siringa viene poi rilasciato e l'ago è rimosso dalla massa. A quel punto l'ago può essere temporaneamente disconnesso dalla siringa, in maniera da permettere il sollevamento dello stantuffo. Il materiale contenuto nell'ago può essere poi espulso su un vetrino. È fondamentale depositare sulla superficie del vetrino una quantità adeguata (non eccessiva) di materiale, onde evitare di ottenere dei preparati

citologici troppo spessi e pertanto non valutabili.



(1)

(2)

Fig.1: Tecniche di campionamento citologico di masse cutanee; ago infissione (1) e ago aspirazione (2)

## B) Apposizione / impronta

Vetrini ottenuti per impronta sono il risultato dell'apposizione su un vetrino pulito di lesioni cutanee superficiali, generalmente ulcerate. Preparati di questo tipo possono anche essere ottenuti dall'apposizione di biopsie chirurgiche e permettono di fornire alcune informazioni preliminari in attesa che il campione istologico venga processato (48 ore presso Laboklin). Per eseguire correttamente questa tecnica ed al fine di ridurre la contaminazione ematica, si suggerisce di tamponare con una garza sterile l'eccesso di sangue e fluidi presenti sulla massa prima di eseguire l'apposizione. I preparati citologici ottenuti con questa tecnica sono spesso altamente cellulari; tuttavia, soprattutto in caso di lesioni cutanee superficiali e ulcerate, è importante ricordare come questi possano non essere indicativi di tutta la lesione (ma solo delle aree più superficiali).

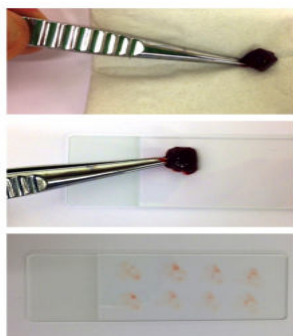


Figura 2: Tecniche di campionamento citologico di masse cutanee / lesioni biotipiche; apposizione / impronta

### Tecniche di allestimento del preparato citologico

La preparazione del campione è un passaggio cruciale per ottenere un buon preparato citologico. L'obiettivo è di ottenere un monostrato di elementi cellulari ben preservati che possano pertanto essere identificati e portino ad una diagnosi.

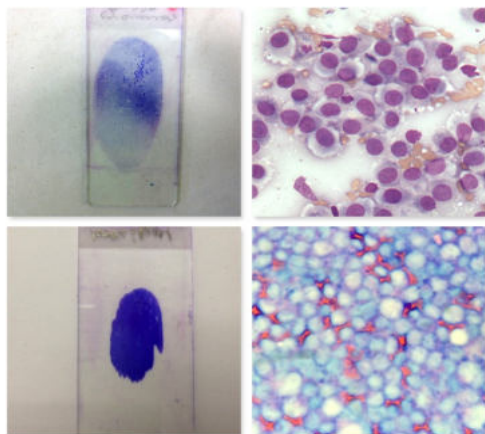


Fig. 3: Esempi di preparati citologici

La figura 3 offre due esempi differenti di allestimento di preparati citologici. Nella foto in alto a destra, le cellule appaiono ben preservate ed integre, con una chiara distinzione di nucleo e citoplasma. Diversamente, nell'immagine in basso a destra si può osservare come il campione

sia troppo spesso, le cellule sono disposte su più strati e pertanto non possono essere correttamente valutate. La principale limitazione in questo caso non è la scarsa cellularità del campione (che è elevata) ma l'allestimento del preparato, che non è avvenuto in maniera corretta (troppo materiale depositato sul vetrino e/o insufficiente strisciamento).

Preparati citologici adeguati possono essere ottenuti attraverso tecniche differenti, tra le quali ricordiamo:

- compressione / squash preparation
- tecnica dello striscio di sangue

#### Compressione / squash preparation

Questa è probabilmente la tecnica più utilizzata per allestire un preparato citologico da masse solide. Il materiale campionato durante l'aspirazione viene poi espulso vicino al bordo di un vetrino pulito. Un secondo vetrino viene appoggiato sulla superficie del primo, ma perpendicolarmente a questo. Il contatto tra i due vetrini indurrà il materiale a distendersi sulla superficie. Il secondo vetrino viene poi delicatamente mosso in direzione opposta favorendo un'omogenea distribuzione del materiale. Una pressione eccessiva potrà danneggiare le cellule e rendere il preparato non diagnostico; allo stesso modo, una pressione inadeguata non permetterà alle cellule di disporsi a formare un monostrato e risulterà in un vetrino troppo spesso. L'esperienza gioca un ruolo importante in questo caso in quanto è soltanto esercitandosi che si potrà trovare la procedura migliore per ottenere preparati diagnostici.

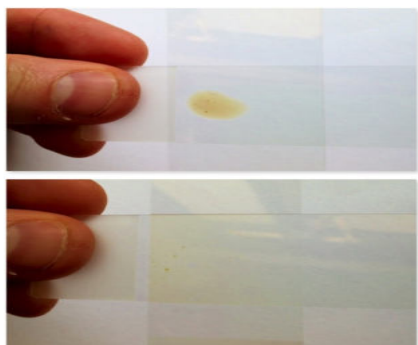


Fig. 4: Compressione / squash preparation

### Tecnica dello striscio di sangue

La tecnica dello striscio di sangue è consigliata qualora il materiale aspirato appaia molto fluido ed è analoga alla preparazione di un normale striscio ematico.

### **Colorazione del preparato citologico**

Una volta allestiti, i preparati citologici devono essere opportunamente colorati. Le colorazioni più frequentemente utilizzate in medicina veterinaria sono quelle di tipo Romanowsky, le stesse usate anche in ematologia (May Grünwald-Giemsa, Wright). Sono inoltre disponibili in commercio dei *kit* di colorazione di tipo Romanoswsky rapida che risultano estremamente pratici nella routine diagnostica (es. Diff-Quik).

Ciascuna colorazione ha il suo protocollo di utilizzo che deve essere seguito. I coloranti devono essere regolarmente filtrati e sostituiti per evitare la presenza di artefatti che possono compromettere l'interpretazione dell'esame citologico. I preparati citologici devono poi essere lasciati asciugare prima di essere

esaminati. Campioni estremamente spessi possono richiedere tempi di colorazione prolungati.

La colorazione di almeno uno dei vetrini ottenuti è altamente consigliata in quanto fornisce una idea preliminare (se il campionamento è stato eseguito in maniera corretta) e, per coloro che hanno delle conoscenze di base di citologia, può fornire delle importanti informazioni sulla natura della lesione in questione. Tuttavia, qualora vi sia la necessità di inviare il preparato al laboratorio specializzato di analisi, si suggerisce l'invio di alcuni vetrini non colorati; questo permetterà al laboratorio di effettuare le colorazioni più appropriate che in alcuni casi possono essere determinanti ai fini della diagnosi finale.



Fig. 5: Colorazione Diff-Quik