

L'AUTOMAZIONE IN CITOLOGIA SU STRATO SOTTILE: CONTROLLO DELLE FASI OPERATIVE.

C. Sintoni – C. Galli

Servizio di Anatomia Patologica - Presidio Ospedaliero "S. M. delle Croci"- Ravenna

Attualmente nel nostro laboratorio di Citologia, così come in tanti altri, l'allestimento dei preparati viene effettuato coi metodi tradizionali: striscio del materiale direttamente sul vetrino o previa centrifugazione di arricchimento, citocentrifugazione, filtrazione attraverso filtri in acetato di cellulosa o in policarbonato (per le urine); qualora possibile vengono effettuati citoinclusi. Queste metodiche sono inevitabilmente generatrici di:

- errori di prelievo (fase di selezione e raccolta del campione),
- difetti di allestimento in una delle fasi descritte (esecuzione dello striscio, trasferimento del materiale prelevato sul vetrino, cattiva fissazione, ecc.).

Ciò può generare errori di lettura, per mancata individuazione o interpretazione di cellule anormali. Se poi materiale ematico e/o elementi infiammatori e/o muco sono presenti in quantità eccessiva, questi fattori possono alterare o non permettere la corretta interpretazione del preparato. Tutte queste fasi sono, comunque, oggetto di Controlli di Qualità specifici eseguiti secondo determinate procedure scritte.

Il nostro Servizio, infatti, è dotato di un Sistema Qualità che è stato certificato conforme alla Normativa europea UNI EN ISO 9002 in relazione all'erogazione di esami istologici, citologici e autoptici da BVQI (Bureau Veritas Quality International) a partire dal 02-02-1996, con accreditamento da parte del SINCERT . Attualmente stiamo aggiornando il Sistema Qualità anche

nell'ottica dell'Accreditamento istituzionale secondo quanto previsto dalla normativa nazionale, seguendo ovviamente le peculiari direttive della Regione Emilia-Romagna

Poichè gli attuali innovativi metodi di allestimento cosiddetti "su strato sottile" tentano di standardizzare il più possibile tutte le fasi descritte, a partire dal momento immediatamente successivo al prelievo, nel nostro Laboratorio abbiamo testato i tre nuovi sistemi di allestimento dei preparati attualmente presenti sul mercato.

La comparazione fra i vari metodi è avvenuta su vari materiali: urine, liquidi, pap test, agoaspirati (circa 500 pap tests, 200 urine e 200 tra liquidi da versamento cavitario e agoaspirati).

Tutti e tre offrono un contenitore per la raccolta e il trasporto del materiale prelevato, al cui interno è presente una quota di una miscela fissativa a base di alcool etilico a 95° e/o di Alcool metilico e/o di Formalina, che permette di conservare i campioni per più di 8 giorni o, aggiungendo un'apposita soluzione conservante (Preservcyt), per più di 3 settimane (Thin Prep), per più di un anno (Autocyte) e per 24 mesi (Cytoscreen).

Tutti i metodi esaminati permettono l'esecuzione ottimale delle colorazioni di routine e speciali, dell'immunocitochimica, dei controlli di qualità e del training diagnostico.

Tutti dichiarano di essere rappresentativi di tutte le popolazioni cellulari presenti originariamente nel campione e di offrire un'elevata qualità morfologica.

A tutt'oggi, due sono i sistemi di allestimento della citologia su strato sottile approvati dalla FDA (Food and Drug Administration), per quanto riguarda i Pap tests, che vanno per la maggiore: il Thin Prep (v. Fig.1) e l'Autocyte-Prep.(v.Fig.3)

Entrambi i sistemi sono basati sulla conservazione del materiale in un liquido contenuto in un vial e solo in seguito allestito in Laboratorio, ma ci sono molte differenze fra i due sia

nella tecnologia che nella performance e nel tipo di approvazione da parte dell'FDA.
(v.Tab.1)

Il **Thin Prep** è stato approvato dall'FDA (Food and Drug Administration) nel 1991 per i preparati non-ginecologici e nel maggio del 1996 come "significativamente più efficace



degli strisci

Fig. 1

convenzionali nella individuazione dei SIL a basso o ad alto grado". Nel trial sottoposto alla

FDA il Thin Prep ha mostrato un incremento nell'individuazione dei SIL del 65%.

Il **Thin Prep** esiste in due versioni: 2000 e 3000. Il primo permette di eseguire l'allestimento di un campione alla volta, il secondo permette di allestire 80 campioni per volta, ma è stato costruito per grandi numeri di esami (costo elevato).

All'inizio del 1990 il processore ThinPrep apparve come un metodo automatico per eseguire preparati su strato sottile attraverso un processo standardizzato di :

- raccolta campione dentro una soluzione alcolica,
- dispersione cellulare per assicurare l'omogeneità del campione (il filtro transcyt ruota nella sospensione cellulare così da separare in modo casuale il materiale aggregato e disperdere il muco, senza danneggiare la morfologia cellulare né i clusters)
- un trasferimento cellulare che usa una membrana filtro (previa la creazione del vuoto tramite aspirazione, le cellule si raccolgono sulla superficie della membrana ed un software controlla la precisione del flusso di pressione nel filtro)
- deposizione del materiale su di un vetrino pretrattato (quando le cellule sono state raccolte sulla membrana, il filtro viene capovolto e premuto dolcemente sul vetrino cosicchè le cellule aderiscono uniformemente al vetro ed in un'area definita)

I limiti della raccolta convenzionale di cellule su un vetrino fu così superata (v.Fig.2)

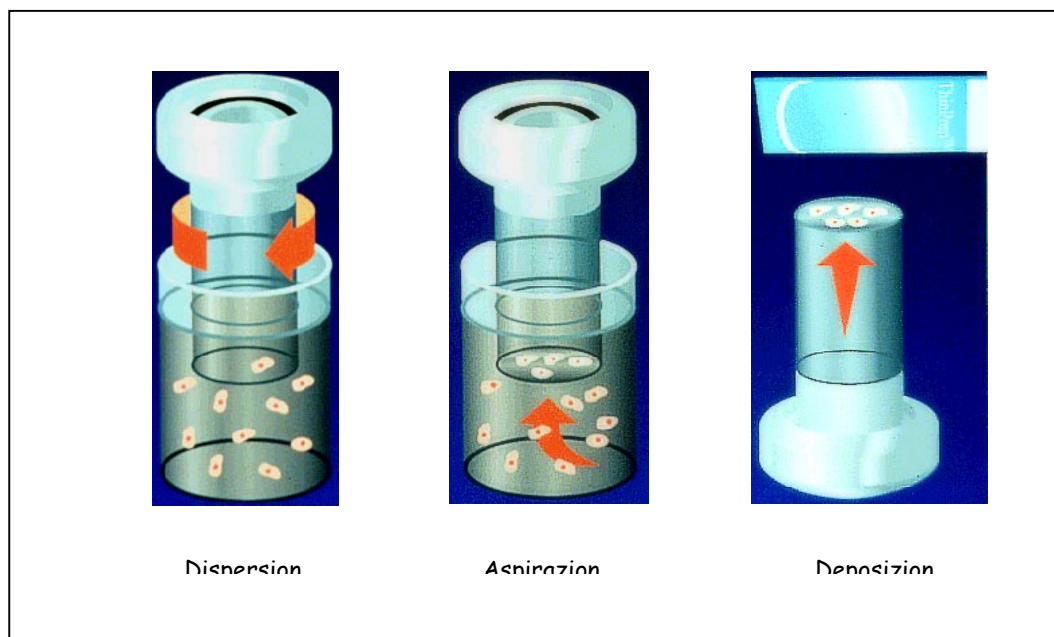


Fig.2

Nel caso in cui vi sia presenza eccessiva di sangue, muco o proteine la soluzione Cytolit aiuta a ridurli, conservando il campione per più di 8 giorni; la soluzione Preservcyt invece facilita il trasferimento ed il fissaggio delle cellule sul Thin Prep Microscope Slide conservando il preparato per più di 3 settimane.

La manutenzione deve essere giornaliera. Occorre infatti:

- controllare la tanica di scarico e svuotarla prima che il liquido raggiunga il livello massimo segnato, secondo istruzioni fornite dalla ditta;
- risciacquare il “cap filter” e asciugarlo;
- applicare un velo di “high vacuum grease” sui tre o-ring.

Si possono verificare problemi di intasamento dei pori di filtraggio per eccesso di muco qualora non sia stato applicato il mucolitico, o per l'abbondanza del materiale cellulare non adeguatamente diluito o emolizzato (variabilità dovuta a momenti soggettivi di applicazione della tecnica di allestimento).

L'**Autocyte** (Fig.3), previa adeguata preparazione dei campioni, prelevati in modo simile al metodo precedente, attraverso una serie di operazioni e di centrifugazioni per eliminare anche qui sangue, muco e proteine in eccesso, permette di allestire 48 campioni alla volta, provvedendo anche alla colorazione di Papanicolaou, con coloranti ottimizzati forniti dalla



Ditta .
Fig.3

Questa metodica agisce infatti sfruttando il principio della centrifugazione in gradiente di densità (Legge di Stock) secondo il quale le particelle si muovono in funzione del raggio al quadrato. Più piccole sono le cellule però, più problemi hanno ad essere differenziate ed in fase di aspirazione del sovrantante possono essere asportate con l'altro materiale rischiando una perdita della cellularità del campione.

Poiché lo strumento è fornito di piccoli tubi per l'aspirazione del materiale da esaminare che verrà poi deposto sui vetrini anche qui pretrattati per favorire l'adesione del sedimento, si può verificare il loro "intasamento" dovuto ad esempio a materiale particolarmente mucoide anche se precedentemente opportunamente trattato.

La fase precedente, di preparazione del materiale da inserire nella macchina, è abbastanza indaginosa, lunga e poco standardizzabile (v. identificazione del campione ad es.) .

Questo problema, che poteva presentarsi anche nel Thin Prep 3000, laddove vengono allestiti ben 80 campioni per volta, viene in questo regolamentato, tramite l'introduzione dell'uso di un codice a barre che la macchina inserisce sia sul vial che sul vetro, consentendo così una maggiore affidabilità nella identificazione dei preparati.

In caso di rottura dello strumento, dotato di un sofisticato software, può essere garantita l'assistenza entro le 24 ore, ed eventualmente i vetrini possono essere colorati in una fase successiva, con gli strumenti e i coloranti normalmente in dotazione al servizio.

L'**Autocyte** ha dimostrato il 7% di incremento nell'individuazione dei SIL (Squamous Intraepithelial Lesion) con una diminuzione di individuazione del SIL ad alto grado in 5 degli 8 centri di controllo.

Le performances dei due sistemi nell'individuazione del SIL a Basso Grado e ad Alto Grado sono quindi diverse.

In questi 2 metodi esistono differenze anche nella diversa grandezza del campione cellulare sul vetrino (20 mm. di diametro nel Thin Prep e 13 mm. nell'Autocyte, con un'area rispettivamente di 1.257 mm² contro 631 mm²).

Il Thin Prep usa un'aspirazione su filtro, mentre l'Autocyte agisce per gradiente cellulare.(v. Tab.1)

Per entrambi i sistemi è previsto un corso di formazione per la lettura dei preparati.

Esistono numerose pubblicazioni nella letteratura su entrambi i metodi.

L'altra metodica da noi provata è denominata **Cytoscreen** e consiste in un metodo basato sulla cito-centrifugazione, molto semplice, mediante il quale è possibile preparare 6 campioni simultaneamente. Il metodo si avvale di comuni strumenti di laboratorio e di colorazioni classiche, L'uso del nefelometro (Fig.4) (strumento che permette di valutare la densità del materiale che poi verrà trattato di conseguenza) permette di ottenere uno standard omogeneo. Campioni ematici vengono anche qui trattati preventivamente in modo opportuno.

Occorre ricordarsi di trascrivere sempre sul vetro oltre i codici di identificazione del paziente anche il valore della densità del campione fornito dal nefelometro. Dopodichè si monta il vetro sull'apposito supporto fissando la monocamera, (nel caso ad esempio di materiale ginecologico)

(Fig.5) vi si aggiunge il "collante" che faciliterà l'adesione del sedimento al vetrino già comunque pretrattato con poli-lisina, si aggiungono alcune gocce del campione preventivamente "vortexato" e poi, inserita la monocamera nella centrifuga, si fa girare il

tutto per 10 minuti a 3200 RPM. Il vetrino viene poi fatto asciugare all'aria e colorato in seguito come di consueto.

Le cellule ed il background vengono conservati e si riduce la stratificazione, conservando la morfologia cellulare. Il sistema quindi conserva il "fondo", (al contrario dei due metodi precedenti, in cui il "fondo" viene in qualche modo attenuato anche se solo visivamente ma non nel contenuto), senza oscurare il preparato e consente di ottenere fino a 3 spot per vetrino nelle preparazioni di campioni non ginecologici (anche a diluizioni diverse). E' di semplice esecuzione, si possono raddoppiare i campioni preparati simultaneamente utilizzando due centrifughe. Occorre essere molto attenti nel momento di inserimento del campione nella monocamera, quando il tutto va miscelato senza toccare il fondo con il puntale, ed effettuare una buona manutenzione delle monocamere che vanno riposte sempre in una soluzione disinfettante dopo l'uso.

La lettura dei preparati non comporta training di formazione. Si potrebbero avere problemi nella valutazione della densità del materiale se questa non fosse eseguita al nefelometro



Fig.4

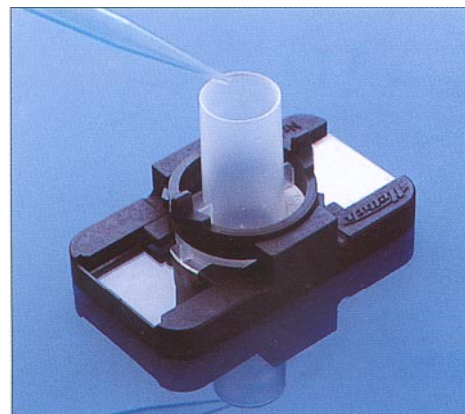


Fig.5

Tutti e tre i metodi esaminati prevedono comunque una fase preliminare manuale in cui il tecnico deve operare delle scelte, a seguito della valutazione del preparato, per poi trattarlo in modo differenziato e ottimale. Tutti e tre i metodi permettono di allestire tutti i tipi di campione citologico.

Anche il campionamento del materiale avviene in modo simile permettendo:

- Velocità e semplicità nel trasferimento delle cellule campionate in un liquido conservante.
- Maggiore sicurezza e tranquillità di un campionamento adeguato.
- Il mantenimento della cellule prelevate nel loro stato naturale
- La possibilità di ripetere e/o approfondire il test senza dover allertare il/la paziente.

La nostra esperienza di utilizzo ha posto comunque in evidenza, oltre ai vantaggi e/o svantaggi già descritti nella relazione, anche il fatto che per tutti i metodi è da prevedere

una nuova organizzazione del lavoro, un maggior coinvolgimento del personale tecnico, sia nella valutazione del materiale che nella manutenzione degli strumenti.

I vantaggi derivanti dall'adozione di queste metodiche sono comunque rilevanti e possono venire così riassunti:

1. qualità intrinseca dei preparati di gran lunga superiore, in virtù dell'ottenimento di un monostrato cellulare, privato degli elementi di disturbo, quali sangue, muco e materiale essudativo o necrotico;
2. riduzione del numero totale dei vetrini allestiti (per ogni campione, in genere, risulta sufficiente un unico vetrino allestito in questa maniera);
3. possibilità di ottenere, in un secondo tempo, altri preparati sovrapponibili a quello originale, per la ripetizione in caso di necessità diagnostiche e/o per l'allestimento di metodiche speciali (colorazioni speciali e/o immunoistochimica);
4. conservabilità e migliore fissazione del campione inviato, in virtù della presenza, nel contenitore di raccolta, di apposito liquido fissativo e conservante (ciò permette, inoltre, di procedere all'allestimento anche differito rispetto all'accettazione);
5. possibilità di ottenere una "banca" di campioni biologici per eventuali future applicazioni collaterali, quali la Biologia Molecolare, per la ricerca di oncogeni, genomi virali e quant'altro sui campioni così conservati;
6. possibilità di semplificare e ridurre gli accessi degli utenti ambulatoriali al Laboratorio, per quanto riguarda l'esame citologico delle urine e degli escreti. Infatti, invece della finora necessaria consegna di tre campioni successivi in tre giornate consecutive, gli utenti potranno consegnare i tre campioni tutti in una volta, in qualsiasi giorno della settimana (lo stesso principio vale anche per la consegna dei campioni da parte dei Reparti di degenza dell'Ospedale);
7. semplificazione, standardizzazione ed elevata automazione delle metodiche, in quanto le modalità di allestimento sono molto simili, se non identiche, per qualsiasi tipologia di campione.

Tab.1- Valutazioni comparative dei tre sistemi effettuate dal Servizio di Anatomia Patologica di Ravenna

CARATTERISTICHE	THIN PREP 2000	AUTOCYTE	CYTOSCREEN
Principio della metodica	Aspirazione su filtro	Gradiente cellulare	Centrifugazione
Diametro dello "spot" sul vetrino	Ø 20 mm area di 1257 mm ²	Ø 13 mm area di 631 mm ²	A scelta: 1 spot di Ø 17 mm 3 spot di Ø 8 mm
Conservabilità del campione dichiarata a temperatura ambiente	Alcool etilico 95° per > 3 settimane	Alcool metilico Per > 1 anno	Alcool+formalina 24 mesi
N°di preparati allestiti contemporaneamente	1	48	6
Tempi tecnici	2' (ca.25 vetri/ora) + allestimento e colorazione	45' di preparazione + 50' di allestimento/ colorazione	30'- 40' + colorazione

Spazio occupato	46x38x50 cm.	2,5 m	50cmx 20 cm.ca.
Colorazione dei preparati	Non inclusa	Inclusa	Non inclusa
Affidabilità	++	+	+
Approvazione FDA (sul Pap Test)	++	+	-
Semplicità di utilizzo	++	-/+	+++
Utilizzo per studi di biologia molecolare (ISH, test HPV)	+	+	+