

CAPITOLUL IX

TEHNICI DE COLORARE PENTRU ȚESUTUL NERVOS

Evidențierea celulelor nervoase, a prelungirilor acestora precum și a nevrogiilor sau a elementelor conjunctivo-vasculare din țesutul și sistemul nervos necesită efectuarea unor tehnici histologice speciale, pe lângă tehnicile histologice de rutină (colorarea cu hematoxilină-eozină, tricromic Masson, Goldner-Szeckeli sau PAS-hematoxilină).

Pentru tehnicile de microscopie optică uzuale (histochimie, imunohistochimie și microscopie electronică), țesutul nervos trebuie recoltat cât mai rapid posibil după decesul persoanei deoarece modificările provocate de anoxia postmortem sunt foarte mari și pot determina artefacte care reduc posibilitatea formulării unui diagnostic corect. Pentru a preveni aceste modificări se recomandă păstrarea cadavrelor în lăzi frigorifice până la efectuarea necropsiei.

Recoltarea, fixarea și prelucrarea materialului biologic se va face cu mare atenție, utilizând instrumente foarte bine ascuțite și manevrând cu blândețe țesutul nervos deoarece, datorită consistenței reduse, pot apărea modificări ale raporturilor celulare sau ale histoarhitectoniei de ansamblu a elementelor histologice componente. Este indicat, mai ales pentru țesutul nervos recoltat de la copiii mici, să se procedeze la fixarea encefalului în totalitate în soluție de formaldehidă 10-20% timp de câteva zile, după care să se execute prelevarea diferitelor zone ale acestuia.

O atenție deosebită trebuie acordată vaselor în care se recoltează, un vas de calibru redus va afecta raporturile normale dintre diverse componente tisulare și va genera artefacte.

Pentru studii de microscopie electronică sau studii experimentale, recoltările se vor face numai în timpul actului operator și se vor fixa imediat în fixatori adecvați tehnicilor de studiu preconizate.

Pentru evidențierea neuronilor, a organitelor specifice (corpusele Nissl, neurofibrile), a prelungirilor lor sau a celulelor gliale, au fost descrise mai multe metode specifice, majoritatea având la bază impregnările cu nitrat de argint.

1. Colorarea cu hematoxilină plumbică (tehnica Mac Conaill)

Fixatori : formaldehidă concentrată

Soluții:

Soluția I: (hematoxilină alcoolică 20%)

- hematoxilină pulbere 20 g;
- alcool etilic 95% 100 ml

Soluția II:

- azotat de plumb 5% 50 ml;
 - soluție apoasă saturată de acetat de amoniu 50 ml;
- Se agită, se filtrează, după care se adaugă:
- formol concentrat 2 ml.

Soluția de lucru (hematoxilină plumbică):

- soluția I 10 ml;
- soluția II 100 ml;
- apă distilată ad. 90 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- colorare 5 ore cu hematoxilină plumbică preparată extemporaneu;
- spălare 5 min. în apă de robinet;
- deshidratare în alcool;
- clarificare;
- montare.

Rezultate:

- corpul celular apare în gri;
- prelungirile nervoase în albastru închis.

2. Metoda Woelcke (pentru colorarea mielinei)

Fixatori: formaldehidă.

Soluții:

1. Alaun de fier:
 - alaun de fier 2,5 g;
 - apă distilată 100 ml.
2. Soluția de hematoxilină alcoolică Weigert:
 - soluție alcoolică de hematoxilină 10% 10 ml;
 - apă distilată 90 ml;
 - soluție saturată de carbonat de litiu 7 ml.

Precizări: se prepară în momentul folosirii și se agită bine înainte de folosire.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- tratarea pe timpul nopții cu soluție de alaun de fier 2,5% la temperatura laboratorului;
- spălare în două băi cu apă distilată;
- colorare 5-6 ore la temperatura laboratorului cu hematoxilină Weigert;
- clătire în două băi cu apă distilată;
- clătire în alcool 80% până nu se mai scurge colorant din secțiuni;
- deshidratare în alcool;
- montare.

Rezultate:

- mielina se va colora în negru pe fond galben.

Precauții: fixarea în formol să nu depășească 2 săptămâni pentru creierul de adult și 6 zile pentru piesele mai mici.

3. Metoda de colorare cu nitrat de argint Bielschowsky (pentru evidențierea neurofibrilelor, dendritelor și axonilor)

Varianta I

Fixatori: formol.

Soluții:

I. Soluția A (nitrat de argint 20%):

- nitrat de argint 20 g;
- apă distilată 100 ml;

2. Soluția B (argento-amoniacală preparată proaspăt):

- azotat de argint 20% 30 ml;
- alcool etilic absolut 20 ml;
- amoniac concentrat (picătură cu picătură până la dizolvarea precipitatului format);
- se mai adaugă încă 5 picături de amoniac concentrat.

Tehnica de colorare:

- deparafinare rapidă cu xilol;
- imersie în alcool absolut 30 sec;
- spălare în apă distilată;
- sensibilizare cu azotat de argint la 37°C 25-30 min;
- spălare în apă distilată;
- tratare cu formol 10% 10 sec;
- impregnare cu soluția argento-amoniacală 30 sec;
- spălare în două băi de formol 10 min;
- spălare cu apă distilată;
- tonare cu clorură de aur 0,2% 10 min;
- clătire cu apă distilată;
- fixare cu tiosulfat de sodiu 5% 5 min;
- spălare cu apă curgătoare 10 min;
- deshidratare cu alcool absolut;
- clarificare în xilol;
- montare în balsam de Canada.

Rezultate:

- neurofibrilele și pericarionii apar de culoare neagră sau cenușiu închis;
- fondul galben- cenușiu.

Varianta II

Fixatori: formol salin.

Soluții:

I. Soluția A de nitrat de argint:

- nitrat de argint 20 g;
- apă distilată 100 ml;

2. Soluția reducătoare A proaspăt preparată:

- pirogalol 100 mg;

- formol concentrat 10 ml;
- alcool etilic 80% 1200 ml.
- 3. **Soluția reducătoare B proaspăt preparată:**
- formaldehidă 5 ml;
- apă distilată 95 ml.
- 4. **Soluția B de nitrat de argint:**
- la 5 ml soluție 20% nitrat de argint se adaugă 0,2 ml hidroxid de sodiu soluție 40%. Se adaugă 20 ml apă distilată și se agită bine. Se așteaptă câteva min. și se aruncă supernatantul; se repetă spălarea de 5-6 ori; după ultima spălare se adaugă 20 ml de apă distilată și 0,5 ml de amoniac 88% pentru a dizolva precipitatul negru. Se agită continuu, adăugând treptat câte 0,02 ml amoniac până când rămân doar foarte puține granule negre. Se adaugă apă distilată până la 80 ml maxim. Este esențial să nu se adauge amoniac în exces.
- 5. **Soluția de tiosulfat de sodiu 5%:**
- tiosulfat de sodiu 5 g;
- apă distilată 100 ml;
- 6. **Soluție de clorură de aur 0,2%.**
- Tehnica de colorare:**
- deparafinare;
- hidratare în apă distilată;
- introducerea în soluția A de nitrat de argint - 1-2 ore, la termostat 37° C.
- clătire de două ori în apă distilată;
- introducerea în soluția reducătoare A pentru 3-5 min., agitând continuu. Secțiunile trebuie să devină galbene;
- spălare în trei băi de apă distilată câte 1 minut în fiecare baie;
- se trece în soluția B de nitrat de argint pentru 30 de secunde;
- spălare în apă distilată;
- se introduc secțiunile în agentul reducător B pentru 2-5 min.;
- spălare în apă distilată sub control microscopic; neuronii trebuie să apară brun-închis; se repetă introducerea în soluția B de nitrat de argint și soluția de reducere, dacă colorarea nu este satisfăcătoare;
- spălare în apă distilată;
- tonare cu clorură de aur 0,25 - 2-3 min.;
- trecere prin tiosulfat de sodiu 5% 5 min.;
- spălare în apă curentă;
- deshidratare;
- clarificare;
- montare în DPX.
- Rezultate:**
- neurofibrilele, dendritele și axonii se colorează în negru.

Varianta III

Fixatori: formaldehidă acidă sau metamonată.

Soluții:

- 1. **Soluția de nitrat de argint:**
- nitrat de argint 20 g;

- apă distilată 100 ml.
- (se va stoca în vase de sticlă de culoare închisă; pH-ul trebuie să fie aproximativ 5);
- 2. **Soluția de argint-hidroxid de amoniu:**
- nitrat de argint 20% 50 ml,
- hidroxid de amoniu 28% 210-280 picături
- Se agită continuu, până când dispăre precipitatul format inițial; pH-ul va fi aproximativ 11, se aruncă după o singură utilizare deoarece apar compuși explozivi.
- 3. **Soluția stoc de dezvoltare (preparată proaspăt):**
- formaldehidă concentrată 40% 20 ml;
- apă distilată 100 ml;
- acid nitric concentrat 1 picătură;
- acid citric 0,5 g.
- 4. **Soluția de dezvoltare de lucru:**
- se adaugă 2 picături din soluția de dezvoltare stoc într-un vas conținând 50 ml de argint - hidroxid de amoniu.
- 5. **Apa amoniacală:**
- hidroxid de amoniu concentrat 28% 2 picături;
- apă distilată 100 ml.
- 6. **Clorură de aur 0,5%:**
- clorură de aur 0,5g;
- apă distilată 100 ml.
- 7. **Tiosulfat de sodiu 5%:**
- tiosulfat de sodiu 5 g;
- apă distilată 100 ml.
- Tehnica de colorare:**
- deparafinare;
- hidratare în apă distilată - 10 min.;
- sensibilizare în nitrat de argint 20% - 20 min. la întuneric;
- spălare în apă distilată;
- imersie în soluția proaspăt preparată de argint-hidroxid de amoniu - 15 min., la întuneric;
- spălare în apă amoniacală;
- spălare în apă distilată (secțiunile devin brun închis);
- tonare rapidă în clorura de aur;
- spălare în apă distilată - 1 minut,
- spălare în tiosulfat de sodiu sau hiposulfat de sodiu - 30 de secunde - 5 min.;
- spălare în apă distilată - 3 băi, câte 3 min. în fiecare baie;
- deshidratare;
- clarificare;
- montare;
- Rezultate.**
- neurofibrilele intracelulare apar negre; axonii - negri;
- dendritele - negre;
- fondul - purpuriu.

Notă: metoda, având la bază tehnica Grös-Bielschowski, a fost pusă la punct de J. Naomenko (1976). Este o metodă care pune în evidență dendritele, axonii dar și rețeaua de neurofibrile intracelular.

4. Colorația Cherveau și Merty pentru nervii periferici modificată de Klaver și Barrera

Fixatori: oricare.

Soluții:

- Soluția de Luxol Fast Blue:
 - Luxol Fast blue 1 g;
 - alcool 95% 1000 ml;
 - acid formic 0,5 ml.
- Soluția colorantă eritrozină - orange G:
 - eritrozină 0,5 g;
 - orange G 0,5 g;
 - apă distilată 100 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- colorare în etuvă la 56°C în soluție de luxol Fast Blue (pH = 4,9);
- clătire intensă în alcool 70% (3 băi);
- spălare în apă curentă;
- diferențiere rapidă în soluție apoasă 0,05% de carbonat de litiu;
- trecere în soluție apoasă 0,01% de carbonat de litiu pentru stoparea diferențierii;
- contracolorare cu soluție de eritrozină-orange G 5 min.
- spălare în apă;
- deshidratare în alcool;
- montare în balsam.

Rezultate:

- mielină se colorează în albastru;
 - țesutul conjunctiv în roz;
 - nucleii în roșu.
- Precauții:
- diferențierea se face sub control microscopic;
 - colorația cu orange G prelungeste diferențierea.

5. Metoda Palmgren pentru fibrele nervoase

Fixatori: formol salin sau amestecul Bouin.

Secțiunile la parafină trebuie acoperite cu nitroceluloză.

Soluții:

- Formaldehidă acidă:
 - formaldehidă 40% 25 ml;
 - apă distilată 75 ml;
 - acid nitric 1% 0,2 ml.
- Soluția de nitrat de argint:
 - nitrat de argint 15 g;

- nitrat de potasiu 10 g;
 - apă distilată 100 ml;
 - acid acetic glacial 5% 1 ml.
3. Soluția reducătoare:
- pirogalol 1 g;
 - apă distilată 45 ml;
 - alcool etilic absolut 55 ml;
 - acid nitic 1% 0,2 ml.
- Se pregătește cu 24 de ore înainte de utilizare.
4. Soluția de clorură de aur:
- clorură de aur 0,5 g;
 - apă distilată 100 ml;
 - acid acetic glacial 100 ml;
 - alcool etilic 50% 0,1 ml.
5. Soluția de alcool etilic-ulei de anilină:
- alcool etilic 50% 100 ml;
 - ulei de anilină 2 picături.
6. Soluția de tiosulfat de sodiu 5%:
- tiosulfat de sodiu 5 g;
 - apă distilată 100 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare în apă distilată;
- spălarea secțiunilor în formaldehidă acidă 5 min. sau mai mult;
- spălare în 3 băi de apă distilată 5 min.;
- impregnare în soluția de nitrat de argint 15 min. la 20-25°C sau 4-5 min. la 35°C;
- trecere în soluția reducătoare încălzită la 40-45°C 1 min;
- spălare în alcool 50% 5-10 sec;
- spălare în 3 băi de apă distilată; se examinează la microscop și dacă este necesar se reia impregnarea;
- tonare cu clorură de aur până ce secțiunile devin galben-brun;
- transfer în soluția de alcool-ulei de anilină 15 secunde sau mai mult pentru intensificarea colorației;
- spălare în apă curentă;
- fixare pentru câteva secunde în tiosulfat de sodiu 5%;
- spălare în apă;
- deshidratare, înlăturarea nitrocelulozei cu alcool absolut;
- clarificare;
- montare.

Rezultate:

- fibrele nervoase apar colorate în maron sau negru.

6. Metoda Descelin pentru evidențierea butonilor terminali din sistemul nervos

Fixatori: oricare.

Soluții:

1. Soluția apoasă de acid citric:

- soluție apoasă de acid citric 1% 15 pic;
- apă distilată 1000 ml.

2. Soluția de nitrat de argint 2% în soluție citrică:

- nitrat de argint 2 g;
- soluție apoasă de acid citric 100 ml;

3. Soluția reducătoare:

- sol. A: glicerină 3% în soluție citrică 100 ml;
- sol. B: hidroximină 1% în soluție citrică 10 ml;
- sol. C: nitrat de argint 2% în soluție citrică 20 ml.

Se amestecă soluția A cu soluția B cu o oră înainte de utilizare. Imediat înainte de utilizare se încălzește la 60° C și se adaugă soluție C după care se agită bine.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
 - hidratare;
 - tratare 1-2 ore la 56° C cu soluție de bicromat de potasiu 10%;
 - spălare 5 min. cu apă curentă;
 - spălare 5 min. cu apă distilată;
 - tratare 5 min. la 56° C cu soluție de nitrat de argint 2% în soluție citrică;
 - tratare fără spălare cu lichidul reducător 5 min.;
 - spălare 1 minut în soluție citrică;
 - virare 2-4 min. cu soluție de clorură de aur 2%;
 - spălare în apă distilată;
 - reducere 1 minut cu soluție de acid oxalic 1%;
 - spălare în apă curentă;
 - contracolorare 10 min. cu soluție de albastru de tolbuidină 1% în apă acetică (0,2M, pH=5);
 - spălare în apă curentă;
 - deshidratare;
 - montare;
- Rezultate:**
- butonii terminali se colorează în negru;
 - nucleii se colorează în negru;
 - tecile de mielină, în roșu purpurii;

7. Metodă Donovanck pentru tesutul nervos

Fixatori: oricare.

Soluții:

1. Soluția acid acetic-acetonă:

- acid acetic glacial 1 vol;
- acetonă 4 vol.

2. Soluția de colorare tionină -formol:

- tionină 1 g;
- formol 10% 1000 ml.

Se filtrează înainte de folosire.

3. Soluția alcool izopropilic - acid acetic:

- alcool izopropilic 2 vol;
- acid acetic 10% 1 vol.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
 - hidratare;
 - tratare cu acetonă-acid acetic - 5 min.;
 - scurgere;
 - clătire cu apă;
 - colorare cu soluție de tionină-formol încălzită în prealabil la 60° C - 3-5 min.;
 - clătire în apă distilată;
 - tratare cu alcool - acid acetic - 5 min.;
 - tratare cu alcool izopropilic 99% - 5 min.;
 - tratare cu alcool - xilen în părți egale - 5 min.;
 - tratare cu xilen - 5 min.;
 - montare în rășini sintetice.
- Rezultate:**
- corpii celulari și corpusculii Nissi se colorează în bleu;
 - fibrele se colorează în roșu.

8. Metodă Kliver și Barvera cu Luxol Fast Blue pentru colorarea mielinei

Fixatori: formaldehidă; formol salin.

Soluții:

1. Soluția de Luxol Fast Blue 0,1%:

- Luxol Fast Blue 0,1 g;
 - alcool 95° 100 ml;
- după dizolvare:

- acid acetic 10% 0,5 ml.

2. Soluția de violet de cresyl:

- violet de cresyl 0,1 g;
- acid acetic 1% 100 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- colorare la 57-60° C cu Luxol Fast Blue 16-24 de ore;
- spălare în alcool 95° până nu se mai scurge colorații;
- spălare în apă distilată;
- diferențiere câteva secunde în soluție de carbonat de litiu 0,05%;
- continuarea diferențierii în alcool de 70° până se distinge substanța albă de cea cenușie;
- spălare în apă distilată;
- continuarea diferențierii timp de 20-30 secunde în soluție apoasă de carbonat de litiu 0,05%, apoi în alcool de 70° până se decolorează complet substanța cenușie;
- spălare intensă în apă distilată;

- colorare cu soluția de violet de cresyl 10 min.;
 - diferențiere în alcool de 95°;
 - deshidratare;
 - montare în balsam.
- Rezultate:**
- mielina apare în bleu-verde;
 - nucleii și corpusculii Nissl în violet - purpuru.

9. Colorarea cu Luxol Fast Blue, acidul Periodic Schiff și albastru de toluidină

pentru evidențierea mielinei și celulelor gliale
Fixatori: formaldehidă.

Soluții:

- 1. Soluția de Luxol Fast Blue 0,1%:**
- Luxol Fast Blue 0,1 g;
 - Alcool 95° 100 ml;

după dizolvare se adaugă:

- acid acetic 10% 0,5 ml.

Soluția se filtrează înainte de utilizare.

2. Soluția de carbonat de litiu 0,05%:

- carbonat de litiu 0,05 g;
- apă distilată 100 ml;

3. Soluția de albastru de toluidină:

- albastru de toluidină 0,1 g;
- acid acetic glacial 3% 100 ml;

4. Soluția de acid periodic 1%:

- acid periodic 1 g;
- apă distilată 100 ml;

5. Soluția de reactiv Schiff:

- reactiv Schiff 50 ml;
- apă distilată 50 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- trecere în alcool etilic absolut, apoi în alcool 95%;
- spălare în alte 2 băi de alcool 95%;
- colorare cu soluția de Luxol Fast Blue peste noapte la 56-60° C;
- spălare în alcool 95% pentru a îndepărta excesul de colorant;
- diferențiere în soluție de carbonat de litiu și apoi în alcool sub control microscopic până nevrogliile, colagenul și mușchii sunt decolorați;
- spălare în apă distilată pentru a opri procesul de diferențiere;
- trecere în apă distilată 5 min;
- oxidare cu acidul periodic 1% 10 min;
- spălare în două băi de apă distilată;
- trecere în reactivul Schiff diluat 10 min;
- spălare în trei băi de metabisulfid de sodiu - câte 2 min. în fiecare baie;
- spălare intensă în apă curgătoare 15 min;
- spălare în apă distilată;

- colorare cu albastru de toluidină 1-5 min;
- spălare rapidă în alcool de 70% pentru înlăturarea excesului de albastru de toluidină;
- spălare rapidă în alcool 95%;
- deshidratare în alcool absolut;
- clarificare în xilol;
- montare în balsam de Canada.

Rezultate:

- mielina se colorează în albastru închis;
- nevrogliile în roz;
- mucopolizaharidele în roșu;
- nucleii și corpusculii Nissl în albastru închis;
- colagenul în albastru intens;
- keratina, keratohialina, lipofuscina în albastru deschis.

10. Metoda Fischinger pentru evidențierea corpusculilor Nissl

Fixatori: oricare; se preferă fixarea în alcool sau în fixator Carnoy.

Soluții:

1. Tamponul Walpole pH 4,65:

- soluție de acid acetic glacial IN 1 ml;
- soluție de acetat de sodiu IN 1 ml;
- apă distilată 98 ml.

Soluția colorantă:

- albastru de metilen 0,064 g;
- tampon Walpole 100 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- colorare cu soluție de albastru de metilen tamponată 10 min;
- clătire rapidă în tampon Walpole pH 4,65;
- tratare cu soluție apoasă de molibdat de amoniu 4% 10 min;
- spălare prelungită în apă de robinet 5-10 min;
- deshidratare direct în alcool absolut;
- clarificare în xilen;
- montare în balsam de Canada.

Rezultate:

- corpusculii Nissl și crătina nucleară se colorează în albastru.

11. Colorația cu galocianină pentru evidențierea corpusculilor Nissl

Fixatori: Carnoy, formol neutru, alcool.

Soluții:

1. Soluția de galocianină:

- galocianină 0,15 g;
 - alaum de crom în soluție apoasă 5% 100 ml;
- Se fierbe în clocot 3 min.; se lasă să se răcească și se filtrează după 24 de ore.

Tehnica de colorare:

- secțiunile se întind pe o baie de apă caldă;
- se "peșcuiesc" pe o lamă de sticlă și se transferă într-un vas cu soluția de colorare unde se lasă 24 de ore;
- se culeg secțiunile pe lame unse cu albumină Mayer;
- uscare în termostaț la 37-40°C, 24 de ore;
- deparafinare în xilen;
- montare în balsam de Canada.

Rezultate:

- corpuseculii Nissl se colorează în albastru.

14. Colorația cu hematoxilina - acid fosforungstic pentru evidențierea mielinei

Fixatori: oricare.

Soluții:

1. Soluția de permanganat de potasiu 0,25%:

- permanganat de potasiu 0,25 g;
- apă distilată 100 ml;

2. Soluția de acid oxalic 5%:

- acid oxalic 5 g;
- apă distilată 100 ml.

3. Soluția hematoxilina - acid fosforungstic:

- hematoxilina 1 g;
- acid fosforungstic 20 g;
- apă distilată 1000 ml.

Se dizolvă hematoxilina într-un vas cu o parte din apa distilată, iar acidul fosforungstic în alt vas. Se încălzește blând hematoxilina și când începe să fiarbă se amestecă cele două soluții. Sunt necesare 4-6 săptămâni pentru maturare.

4. Soluția Zenker (preparată proaspăt):

- bicromat de potasiu 2,5% 95 ml;
- acid acetic glacial 5 ml.

5. Soluția Lugol:

- iod 1 g;
- iodură de potasiu 2 g;
- apă distilată 100 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare în apă distilată;
- mordansarea secțiunilor în soluția Zenker 1 oră la 60°C sau peste noapte la temperatura camerei;
- spălare în apă curgătoare 15 min;
- tratare cu soluția Lugol 15 min;
- decolorare completă în alcool 95% 1 oră sau mai mult;
- spălare rapidă în trei băi de apă distilată;
- oxidare în soluția de permanganat de potasiu 0,25% 5 min;
- clătire rapidă în trei băi de apă distilată;

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- colorare 24 h la temperatura laboratorului cu soluția de galocianină
- spălare în apă curentă;
- deshidratare;
- diferențiere în xilen;
- montare în balsam de Canada sau rășini sintetice.

Rezultate:

- corpuseculii Nissl se colorează în albastru.

12. Colorația cu cresyl violet pentru corpuseculii Nissl

Fixatori: alcool etilic absolut sau 95%, Carnoy sau formol neutru salin.

Soluții:

1. Soluția de Cresyl violet:

- cresyl violet 0,5 g;
- apă distilată 100 ml.

2. Soluția diferențiator:

- acid acetic glacial 0,25 ml;
- alcool etilic 100 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- colorarea cu Cresyl violet 10-20 min;
- spălare în apă distilată;
- diferențiere în alcool acid 4-8 secunde (până nu se mai scurge colorant);
- trecere scurtă prin alcool absolut;
- diferențiere în xilen sub control microscopic; la nevoie se reia diferențierea;
- montare în balsam de Canada.

Rezultate:

- corpuseculii Nissl și nucleolii apar albastru - închis;
- neuronii se colorează albastru - palid;
- nucleii în albastru deschis.

13. Metoda de colorare cu tionină pentru evidențierea corpuseculilor Nissl

Fixatori: alcool etilic, formol-alcool, sau formol neutru.

Soluții:

1. Soluția de tionină:

- tionină 0,2 g;
- apă distilată 100 ml;
- acid tartric 0,1 g;
- thymol 1 cristal.

- decolorare în soluția de acid oxalic 5 min;
- spălare în apă distilată, apoi în apă curgătoare 5-10 min;
- colorare cu amestecul hematoxilina - acid fosfotungstic 2 ore la 60° C sau 24 de ore la temperatura camerei;
- diferențiere în alcool 95% sub control microscopic;
- deshidratare rapidă în două băi de alcool absolut;
- clarificare;
- montare în balsam de Canada.

Rezultate:

- neurogiile se colorează în albastru;
- mielina în albastru;
- nucleii fibrina, fibrele musculare striate în albastru,
- citoplasma - maroniu.

15. Colorația cu hematoxilina - acid fosfotungstic pentru evidențierea neurogiilor din sistemul nervos central

Fixatori: oricare, preferabil fixatorul Zenker.

Soluții:

- 1. Soluția hematoxilina - acid fosfotungstic:
 - hematoxilina 1 g;
 - acid fosfotungstic 20 g;
 - apă distilată 1000 ml

Se dizolvă separat hematoxilina și acidul fosfotungstic în apă distilată; pentru o dizolvare mai rapidă și totală se încălzește soluția de hematoxilina.

Apoi se lasă să se răcească la temperatura camerei și se adaugă soluția de acid fosfotungstic.)

- se adaugă 0,117 g de permanganat de potasiu pentru o mai rapidă maturare.

Soluția se prepară cu cel puțin 4-6 săptămâni înainte de utilizare.

Soluția de hematoxilina-acid fosfotungstic se utilizează pentru evidențierea fibrei și a fibrelor musculare striate.

2. Soluția Langeron:

- iod 1 g;
- iodură de potasiu 2 g;
- apă distilată 200 ml;

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare în apă distilată;
- tratare cu soluția Langeron 10 min;
- spălare în tiosulfat de sodiu 5% până la decolorare;
- spălare în apă de robinet 5 min;
- trecere în soluția de colorare la temperatura camerei; colorare la 60° C timp de 2 ore. Nu este indicat ca soluția de colorare să fie încălzită în prealabil pentru că va afecta calitatea colorării.
- deshidratare în alcool de 95% două băi, apoi în alcool absolut trei băi;
- clarificare în xilol;
- montare în balsam de Canada

Rezultate:

- macrogiile și microgiile se colorează în albastru;
- mielina în albastru
- nucleii în albastru închis;
- fibrele musculare în nuanțe de albastru;
- colagenul, fibrele de reticulină, membranele bazale, amiloizidul, cartilajul în nuanțe de roșu.

16. Metoda Linder pentru nervi pe secțiuni la parafină

Fixare: formol sahlin, formol calciu sau fluidul Bouin.

Secțiuni: 4-10 microni; țesuturile mineralizate sunt decalcificate cu acid formic sau EDTA

Soluții:

- 1. Soluția stoc de reactant:
 - colidină 2.4.6 6,6 ml;
 - apă distilată 450 ml;

Se ajustează pH-ul la 7,2-7,4 cu acid nitric 10% și se completează cu apă distilată până la 500 ml.

Reactivul diluat:

- reactiv stoc 8 ml;
- apă distilată 92 ml.

2. Soluția de impregnare cu cianat de argint:

- apă distilată încălzită la 60° C 84 ml;
- nitrat de argint 1% 4 ml;
- cianat de sodiu 0,38% 4 ml;
- soluție de reactiv stoc 8 ml;

3. Soluția stoc de dezvoltare fizică:

- sulfid de sodiu (Na₂SO₃, 7H₂O) 20 g;
- tetraborat de sodiu (Na₂B₄O₇ · 10H₂O) 4,75 g;
- apă distilată 450 ml;

Se încălzește soluția până la aproximativ 50° C și se adaugă gelatină (Belgium Gold) 10 g.

4. Soluția de lucru de dezvoltare:

- soluție stoc de dezvoltare 95 ml;
- hidroximonă 2% 5 ml;
- nitrat de argint 1% 2 ml;

Se adaugă nitratul de argint amestecând conținutul.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- celoidinizarea preparatelor;
- introducere în apă distilată;
- introducere în reactivul diluat:
 - țesuturile moi sunt lăsate 10-20 min. la 60° C;
 - țesuturile decalcificate sunt lăsate peste noapte la 40-45° C.
- transferați direct în soluția de impregnare argentică:
 - țesuturile moi sunt incubate 10-30 min. la 60° C
 - țesuturile decalcificate sunt incubate pentru 90 min. la 40-45° C.

- spălare în mai multe vase cu apă distilată aproximativ 3 min. în total;
 - mutați secțiunile în soluția de dezvoltare la aproximativ 25°C.
- Progresiunea dezvoltării poate fi verificată prin spălare cu apă distilată și examinare la microscop. Atunci când se consideră că rezultatele sunt optime, secțiunile sunt spălate în apă distilată, deshidratate, clarificate în xilen și apoi montate în balsam de Canada sau DPX.

Rezultate:

- fibrele nervoase mielinizate și nemielinizate se colorează în negru;
- fibrele musculare striate se colorează în maron.

Notă: agitatea constantă este esențială când se adaugă nitratul de argint în soluția de dezvoltare, pentru a preveni apariția unui precipitat alb. Cianatul de sodiu necesită mănuirea atentă (substanță deosebit de toxică).

TEHNICI PENTRU COLORAREA FIBRELOR NERVOASE DEGENERATE

1. Metoda Eager pentru axoni degenerați

Fixatori: formol salin.

Secțiuni: la gheață, de 30 microni.

Soluții:

Soluția de argint amoniacal:

- nitrát de argint 1,5% 40 ml;
- alcool etilic 95% 24 ml;
- amoniac 0,88 4 ml;
- hidroxid de sodiu 2,5 % 3,6 ml;

Soluția reductoare:

- alcool etilic absolut 90 ml;
- apă distilată 810 ml;
- acid citric 1% 27 ml;
- formaldehidă 10% 37 ml;

Tehnica de colorare:

- se introduc secțiunile la gheață în formol 2%;
- spălare în apă distilată;
- se transferă secțiunile în nitrát de uraniu 2,5% 5 min.;
- clătire în apă distilată;
- trecere în argint amoniacal până apare o colorație maronie 3-15 min.;
- transferare direct în soluția reductoare; se ține aproximativ 2-5 min. până culoarea nu mai virează;
- clătire în apă distilată;
- fixare cu tiósulfat de sodiu 0,5%;
- spălare în apă distilată;
- deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate:

- fibrele degenerate se colorează maron-negru;
- fibrele normale rămân galben palid.

Notă: Nitrátul de uraniu poate fi înlocuit cu acidul fosfomolibdemic 0,5%.

2. Metoda Weil pentru mielina degenerată

Fixatori: formol salin sau formol calciu.

Soluții:

Soluția colorantă:

- alauin de fier 4% 50 ml;
- hematoxilină alcoolică 1% 50 ml.

Se anestecă imediat înainte de folosire.

Soluția fericianură boraxată Weigert:

- fericianură de potasiu 2,5 g;
- borax 2 g;
- apă distilată 200 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- spălarea secțiunilor în apă distilată;
- colorare în soluția de colorant 10-45 min. la 50-60° C;
- spălare intensă în apă curentă;
- diferențiere în alauin de fier 4% până când se distinge substanța cenușie de zonele degenerate;
- spălare în câteva băi de apă distilată;
- completarea diferențierii cu fericianură boraxată Weigert;
- spălare în apă distilată și apoi în apă curentă;
- deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate:

- mielina se colorează în negru;
- fondul se colorează în galben.

3. Metoda de colorare hematoxilină - acid fosfotungstic pentru evidențierea astrocitelor

Fixatori: formaldehidă.

Soluții:

Soluția hematoxilină - acid fosfotungstic:

- hematoxilină 0,1 g;
- acid fosfotungstic 2 g;
- apă distilată 100 ml.

Se dizolvă separat hematoxilina și acidul fosfomolibdemic în puțină apă distilată, după care se amestecă cele două soluții.

Lichidul Zenker:

- clorură de mercur 5 g;
- bicromat de potasiu 2,5 g;
- apă distilată 95 ml;
- acid acetic glacial 5 ml.

Soluția Lugol:

- iod 1 g;
- iodură de potasiu 2 g;
- apă distilată 100 ml.

Soluția de permanganat de potasiu 1%:

- permanganat de potasiu 1 g;

- apă distilată 100 ml.
- Soluția de acid oxalic 5%:**
- acid oxalic 5 g;
- apă distilată 100 ml.
- Tehnica de colorare:**
- deparafinare;
- hidratare;
- mordansare în lichidul Zenker la 50° C 60 min;
- spălare cu apă curgătoare 15 min;
- trecere în soluție Lugol 15 min;
- decolorare în alcool 95% 60-90 min;
- spălare în apă distilată trei bai;
- oxidare cu permanganat de potasiu 1% 3-5 min;
- decolorare cu soluția de acid oxalic 5 min;
- colorare cu soluția de hematxilină - acid fosfotungstic 12-24 de ore la temperatura camerei;
- spălare rapidă în alcool 95%;
- deshidratare rapidă în trei băi de alcool absolut;
- clarificare în xilol;
- montare în balsam de Canada.

Rezultate:

- astrocitele fibrilare apar colorate în albastru;
- nucleii - albastru;
- mielina - albastru;
- neuronii în roz.

4. Metoda Cajal aur-sublimat pentru astrocitele

Fixatori: formalină.

Soluții:

- Clorura de mercur 5%:**
- clorură de mercur (sublimat) 5 g;
- apă distilată (caldă) 100 ml.
- Clorură de aur:**
- soluție apoasă de clorură de aur 1% (brună) 8 ml
- apă distilată 40 ml;

Soluția formalină-bromură de amoniu:

- bromură de amoniu 0,6 g;
- formaldehidă 40% 14 ml;
- apă distilată 100 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare în apă distilată;
- trecere în soluția de formol - bromură de amoniu la temperatura camerei 1-3 zile;
- clăture scurtă în apă distilată (o afundare scurtă);

- trecere în soluția de clorură de aur; apoi se adaugă 6,4 ml din soluția de clorură de mercur 5% la întuneric, se agită continuu timp de 6 ore sau mai mult (la întuneric);
- spălare în apă distilată 2-5 min;
- trecere în tiosulfat de sodiu 5% 5 min;
- spălare în apă distilată;
- deshidratare;
- clarificare;
- montare.

Rezultate:

- astrocitele fibroase și protoplasmice se colorează în negru sau purpuru închis;
- fondul apare purpuriu.

Notă: există peste 8 variante ale acestei tehnici, descrisă inițial de Cajal.

5. Metoda de colorare cu carbonat de argint pentru microglie

Fixatori: formaldehidă netamponată sau acidă.

Soluții:

- Soluția de acid clorhidric:**
- acid clorhidric concentrat 3 ml;
- apă distilată 100 ml.
- Soluția de carbonat de sodiu 5%:**
- carbonat de sodiu 10 g;
- apă distilată 200 ml.

Soluția de carbonat de argint:

- carbonat de sodiu 5% 200 ml;
- nitrat de argint 20% 25 ml;

După dizolvare se adaugă:

- hidroxid de amoniu concentrat, picătură cu picătură până când soluția începe să se clarifice. Trebuie ca soluția să rămână puțin tulbură. Se filtrează înainte de utilizare. Dacă soluția nu este utilizată imediat se va ține la întuneric până la folosire.

Soluția de formaldehidă 0,2%:

- formol comercial 40% 2 ml;
- apă distilată 1000 ml.

Soluția de clorură de aur 1/500:

- soluție apoasă de clorură de aur 1% 10 ml;
- apă distilată 40 ml.

Soluția de tiosulfat de sodiu 5%:

- tiosulfat de sodiu 5 g;
- apă distilată 100 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- spălare în 2 băi de apă distilată;
- trecere în soluția de acid clorhidric 3%, la temperatura camerei timp de 90 min.;
- clătire (o afundare) în două băi de apă distilată;
- trecere în carbonat de sodiu la temperatura camerei 2 ore;
- trecere în soluția de carbonat de argint, 1 minut; fiecare preparat se introduce separat.
- trecere succesivă prin două băi de formalină 0,2% agitănd continuu, 10 secunde în total. Soluția de formalină va deveni tulbură;
- spălare în două băi de apă distilată 1 min.;
- trecere în soluția de clorură de aur 1/500 timp de 1 minut sau până când secțiunile devin gri;
- spălare în apă distilată 30 sec.;
- trecere în soluția de tiosulfat de sodiu 5% 1 min.;
- spălare în apă distilată;
- deshidratare;
- clarificare; montare.

Rezultate: microgîurile se vor colora în negru.

Notă: Tehnica de mai sus este o variantă a tehnicii del Rio Horteaga de evidențiere a microgîlei, pentru secțiunile incluse în parafină.

6. Tehnica HOLMES cu nitrat de argint - Luxol Fast Blue Fixatori: formaldehidă 10% netamponată.

Soluții:

Soluția de nitrat de argint 20%:

- nitrat de argint 20 g.;
- apă distilată până la 100 ml.

Soluția de acid boric 1,24%:

- acid boric 1,24 g.;
- apă distilată 100 ml.

Soluția de borax 1,9%:

- borat de sodiu, tetra (Borax) 1,9 g.;
- apă distilată 100 ml.

Soluția de nitrat de argint 1%:

- nitrat de argint 1 g.;
- apă distilată 100 ml.

Soluția de piridină 10% (se prepară sub hotă):

- piridină 1 ml.;
- apă distilată 9 ml.

Soluția de impregnare (preparată proaspăt):

- acid boric 1,24% 11 ml.;
- borax 1,9% 9 ml.;
- apă distilată 78,8 ml.;

Se combină inițial cele trei componente și se agită, apoi se adaugă:

- nitrat de argint 1% 0,2 ml.;
- piridină 10% 1 ml.

Se agită bine până la amestecare completă.

Soluția reductoare (preparată proaspăt):

- hidrocchinonă 1 g.;
- sulfat de sodiu cristalizat 10 g.;
- apă distilată până la 100 ml.

Soluția de clorură de aur 0,2%:

- clorură de aur 2 g.;
- apă distilată 100 ml.

Soluția de acid oxalic 2%:

- acid oxalic 2 g.;
- apă distilată 100 ml.

Soluția de Luxol Fast Blue:

- Luxol Fast Blue 1 g.;
- alcool 95% 1000 ml.

Se pune LFB în alcool; după dizolvare se adaugă.

acid acetic 10% (10 ml acid acetic + 90 ml apă distilată) 5 ml. (se filtrează înainte de folosire).

Soluția de contrastare albastru de toluină 0,1%:

- albastru de toluină 0,1 g.;
- acid acetic 3% (3 ml acid acetic glacial + 97 ml apă distilată) 100 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- depigmentare,
- spălare în apă distilată;
- trecere în soluție de nitrat de argint 20% la întuneric 2 ore;
- spălare în 3 băi de apă distilată 10 min.;
- trecere în soluția de impregnare într-un vas închis ermetic peste noapte la 37° C;
- se scot, se scurge excesul de soluție și se introduce în soluția reductoare
- spălare în apă curgătoare 2-4 min.;
- tonare cu clorură de aur 0,2% 3 min, apoi în apă distilată;
- spălare rapidă în apă distilată; 3 min.;
- trecerea secțiunilor în soluția de acid oxalic 2% 3-5 min.
- Examinezi la microscop, axonii trebuie să fie albastru - negru;
- spălare rapidă în apă distilată,
- trecere în tiosulfat de sodiu 5% 5 min.;
- spălare în apă curgătoare;
- deshidratare parțială prin alcool de 80%, 2 băi; apoi alcool de 95%, 2 băi;
- trecere în soluție de Luxol Fast Blue la 55-60° C peste noapte;
- spălare în alcool 95% pentru a înlătura excesul de colorant;
- diferențiere în carbonat de litiu 0,05%;
- colorare cu albastru de toluină 20-30 sec. până la 5 min.;

- spălare rapidă în alcool de 80%, apoi în alcool de 95%;
- deshidratare în alcool absolut;
- clarificare, montare.

Rezultate:

- axonii se colorează în albastru spre negru,
- nervii și terminațiile nervoase în negru;
- fondul roz;
- mielina - turcoaz-albastru;
- corpusul lui Nissl și nucleii în albastru palid sau violet.

7. Tehnica BODJAN pentru fibre nervoase, neurofibrile și terminații nervoase (varianta I)

Fixatori: fixatori acizi; nu este recomandat formaldehida tamponată.
Includere: în parafină.

Soluții:

- Soluția de protargol 1%:**
- protargol S (argint proteic) 1 g;
 - apă distilată 100 ml;

(protargolul se presară puțin câte puțin în apă agităndu-se conținutul. Soluția trebuie încălzită la 40° C. Nu trebuie să coaguleze).

Cupru metalic (perle) curățat cu apă regală.

Curățarea cu apă regală se face sub hotă.

Apa regală:

- acid nitric concentrat 1 parte;
- acid clohidric concentrat 3 părți.

Soluția reductoare:

- hidrocchinonă 1 g;
- sulfid de sodiu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 5 g;
- apă distilată 100 ml.

(dacă este anhidru se folosește 1/2 din cantitate)

(soluția se prepară proaspăt sau cu cel mult 24 de ore înainte de utilizare. După utilizare soluția se aruncă)

Soluția de clorură de aur 1%:

- clorură de aur 1 g;
- apă distilată 100 ml.

Soluția de acid oxalic:

- acid oxalic 2 g;
- apă distilată 100 ml

Soluția de tiosulfat de sodiu 5%:

- tiosulfat de sodiu 5 g;
- apă distilată 100 ml.

Kernechtrot:

- kernechtrot (roșu nuclear) 0,05 g;
- sulfat de aluminiu 5% (sulfat de aluminiu 5g + 100 ml apă dist.) 100 ml;

(se încălzește până la fierbere soluția de sulfat de aluminiu 5%, se înlătură de pe foc și se adaugă roșu nuclear, se dizolvă la cald în circa 10 min. După răcire se filtrează. Se adaugă câteva cristale de timol pentru conservare).

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- plasarea în soluție de protargol la care se adaugă 4-6 g de cupru metalic curățat cu apă regală la 100 ml de soluție de protargol. Se lasă la termostat la 37° C 18-48 de ore.
- spălare în apă curentă 3 băi;
- trecere în soluția reductoare, 5-10 min.;
- spălare în apă distilată, 3 băi;
- tonare cu soluție de clorură de aur, 10 min.;
- spălare în apă distilată, 3 băi, 5 min.;
- dezvoltare în acid oxalic sub control microscopic până fondul devine gri, iar fibrele nervoase apar negre clar;
- spălare în apă distilată, 3 băi;
- trecere în tiosulfat de sodiu 5%, 5 min.;
- spălare bine în apă distilată;
- contrastare cu Kernechtrot, 5 minute;
- spălare;
- deshidratare;
- clarificare;
- montare.

Rezultate:

- neuronii, neurofibrilele, fibrele mielice și amielinice apar negre
- țesutul conjunctiv - gri;
- nucleii în roz.

Notă: Rezultate bune se obțin dacă se utilizează o soluție de 0,5% de acid oxalic și hiposulfid de sodiu 10%, 1-2 min. Protargolul în prezența cuprului impregnează țesutul nervos dar și țesuturile conjunctive simultan. Hidrocchinona reduce depunerile de ioni de argint la argint metallic de culoare maronie.

Tehnica Bodian -vaianta II

Fixatori: Bouin. Champy. Da Fano, Carnoy, alcool-acid acetic;

Includere: la parafină;

Soluții:

Soluția alcool-formol:

- alcool etilic 96% 2 volume;
- formaldehidă concentrată 1 volum;

Soluția de permanganat de potasiu 0,5%:

- permanganat de potasiu 0,5 g;
- apă distilată 100 ml.

Soluția de acid oxalic 5%:

- acid oxalic 5 g;
- apă distilată 100 ml;

Soluția de protargol 1 %:

- protargol S 1 g;
 - apă distilată 100 ml;
- (se prepară extemporaneu fără agitare, ci doar presărând deasupra apei distilate pulberea de protargol; după dizolvare completă se adaugă, ca activator, 3-6 g de cupru metallic pur).

Soluția reductoare (proaspăt preparată):

- sulfat de sodiu anhidru 5 g;
- hidrochinonă 1 g;
- apă distilată 100 ml.

Soluția de clorură de aur 1%:

- clorură de aur 1 g;
- apă distilată 100 ml.

Soluția de acid oxalic 2%:

- acid oxalic 2 g;
- apă distilată 100 ml.

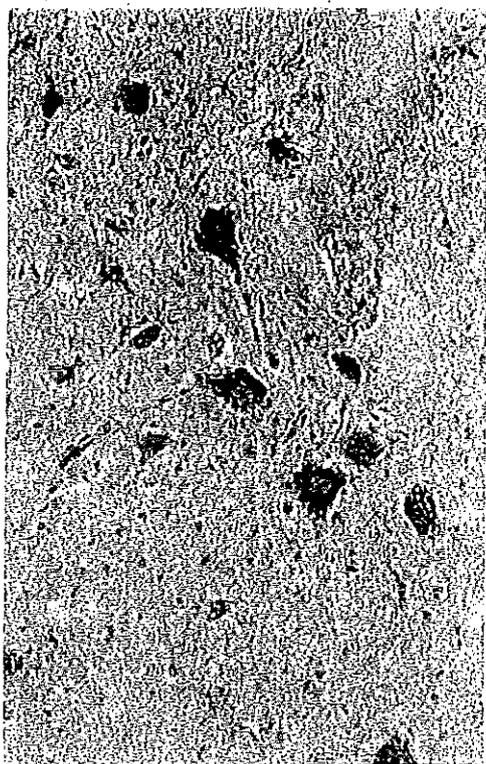
Soluția de tiosulfat de sodiu 5%:

- tiosulfat de sodiu 5 g;
- apă distilată 100 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- tratare cu soluția de formol-alcool, 1 oră;
- spălare în apă curgătoare, 15 min.;
- oxidare cu permanganat de potasiu 0,5%, 5 min.;
- clătire cu apă distilată;
- albire cu acid oxalic 5%, 6-8 min.;
- spălare cu apă curgătoare 15 min.;
- impregnare cu soluția de protargol 48 de ore, schimbată la 24 de ore, la 37° C;
- clătire cu apă distilată;
- reducere controlată cu hidrochinonă, 5-10 min.;
- clătire cu apă distilată;
- trecere în clorură de aur 5-10 min.;
- clătire cu apă distilată;
- tratare cu acid oxalic până când secțiunea devine purpurie, 5-10 min.;
- spălare în apă curgătoare 10-15 min.;
- fixare rapidă în tiosuulfat de sodiu;
- spălare în apă 5-10 min.;
- deshidratare;
- clarificare;
- montare.

Rezultate: neurofibrilele apar colorate în roșu purpuriu.



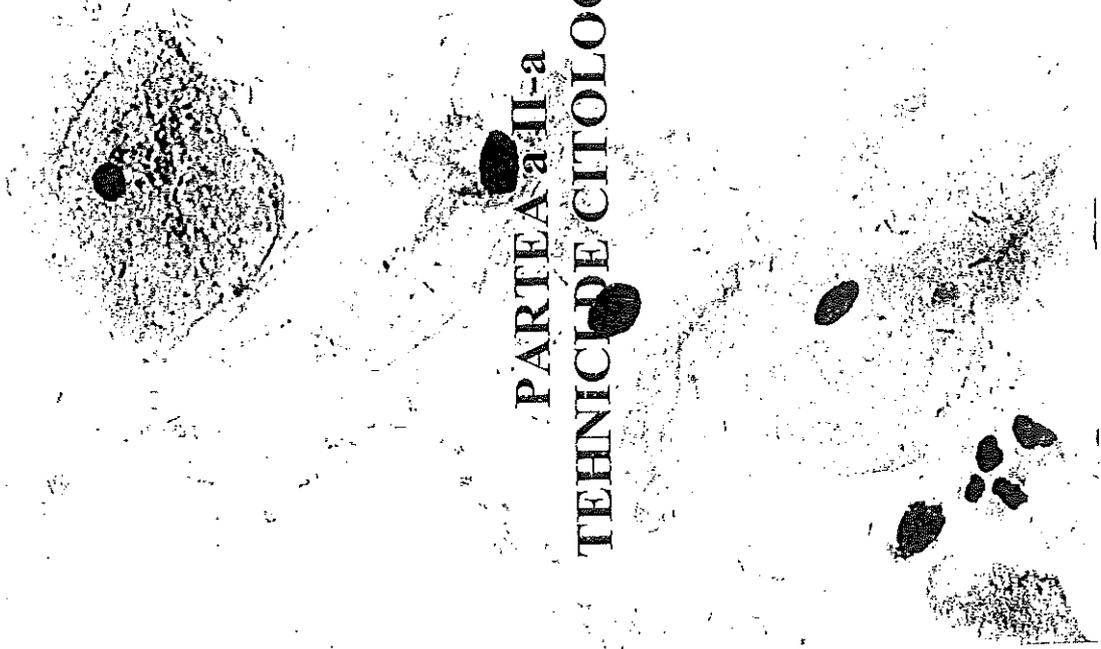
Corpusculii Nissl
Colorația cu galocianină



Fibre de mielină
Colorație Luccol Fast Blue (pe un cerebel de șoarece).

Spenter[®]
acid acetic
75mg

PARTEA a II-a
TEHNICILE DE CITOLOGIE



CAPITOLUL X

Examinarea la microscopul optic a celulelor atât descumate spontan (citologia exfoliativă) cât și îndepărtate mecanic de la nivelul diferitelor țesuturi umane (citologia neexfoliativă) reprezintă o importanță metodă de diagnostic a afecțiunilor maligne, în special pentru depistarea precoce a acestora.

Citologia exfoliativă vaginală a fost prima metodă citologică cu ajutorul căreia s-a precizat un diagnostic prin examinarea celulelor izolate și a avut aplicabilitate practică în diagnosticul neoplazilor maligne ale colului uterin. Deși în literatura universală se atribuie medicului grec Georgios Papanicolaou, în mod exclusiv, meritul de a fi descoperit această metodă în anul 1931 (denumită chiar Pap-Test), datele istorice arată că adevărații săi protagoniști au fost, de fapt, medicii români Aurel A. Babeș și Constantin Daniel care au publicat în 1927 prima comunicare intitulată: "*Posibilitatea diagnosticului cancerului uterin prin frotiuri*" (lucrare publicată în 1928 în *Presse Medicale*). G. Papanicolaou a perfecționat metoda, a difuzat-o pe scară largă printre ginecologi și anatomopatologi și a transformat-o dintr-un domeniu teoretic al cunoașterii într-o metodă de laborator larg acceptată (metoda citologiei exfoliative cervico-vaginale).

Datorită acurateții mari a citodiagnosticului genital feminin, acesta a fost aplicat ulterior pentru depistarea și a tumorilor cu alte localizări (pulmonare, urinare).

Din 1974, odată cu introducerea în practică a puncției aspirative cu ac fin ghidată sau nu ecografic, a crescut considerabil spectrul de aplicabilitate al metodei de citodiagnostic în practica medicală.

Citologia clinică este o metodă rapidă de diagnostic sau de orientare a diagnosticului clinic, repetabilă, ieftină, efectuată cu disconfort minim pentru pacient, are o acceptabilitate largă și o aplicabilitate teoretic nelimitată. Presupunând o cunoaștere aprofundată a caracterelor normale și patologice ale celulelor, cu particularitățile caracteristice fiecărui organ, aceasta a devenit astfel o supraspecializare a anatomiei patologice.

CITOLOGIA CERVICO-VAGINALĂ

În 1927, medicii români Aurel A. Babeș și Constantin Daniel au urmărit identificarea unei posibilități de utilizare a frotiurilor în locul biopsiei în scopul obținerii unui diagnostic mai rapid al cancerului colului uterin. Astfel, ei au arătat că diagnosticul precoce al acestuia poate fi pus pe frotiuri și au prezentat criteriile citologice de malignitate ale celulelor tumorale, indicând totodată modelul de studiere al acestora pe frotiuri vaginale colorate prin metoda Giemsa.

Frotiul Papanicolaou, descris în 1931 de medicul grec Georgios Papanicolaou, a fost descris pentru studiul influenței hormonilor feminini asupra epitelului vaginal la șoareci. Deși acesta nu a fost un frotiu cervical, ulterior la realizarea sa s-a folosit produs recoltat din fundul de sac vaginal inițial de la șoareci și mai târziu de la femei. După ce a identificat într-un frotiu vaginal celule atipice, el a aplicat metoda citologiei vaginale mai întâi în diagnosticul citologic al cancerului colului uterin și, ulterior, pentru cel al leziunilor extragenitale. Papanicolaou a avut meritul de a perfecționa metoda citodiagnosticului exfoliativ (enuțată anterior de A. Babeș) prin clasificarea froturilor în cinci clase (clasele I - V Pap), metodă pe care ulterior a aplicat-o în screening-ul cancerului colului uterin în marile colectivități.

Calitatea finală a citodiagnosticului, depinde nu numai de interpretarea citologică și de calitatea prelucrării materialului recoltat, ci, în multe cazuri, și de informația clinică pertinentă precum și de metoda utilizată pentru obținerea frotiului.

Pentru majoritatea laboratoarelor de citologie cea mai mare parte din probele prelucrate este reprezentată de frotiurile cervico-vaginale. Clinicienii folosesc frotiurile Papanicolaou sub denumirea de testul Babeș-Papanicolaou sau testul Pap ca test screening al displaziei scuamoase cervicale și al carcinomului scuamos precoce invaziv al colului uterin. În acest scop, testul este folosit în cazul femeilor asimptomatice care au colul uterin aparent normal clinic, acelea care sunt simptomatice pot necesita investigație suplimentară.

Screening-ul a fost definit în 1957 de către United States Commission on Chronic Illness ca fiind: „Identificarea probabilă a unei boli sau a unei leziuni inaparente clinic prin aplicarea unor teste, examinări sau alte proceduri care se pot efectua rapid. Testele screening fac trierea persoanelor cu col uterin aparent clinic normal care probabil au boala, de cele care probabil nu o au”.

Testul Pap prezintă multiple avantaje și anume:

a. Are sensibilitate mare (aceasta fiind reprezentată de procentul de paciente care au boală și care vor avea un rezultat pozitiv al testului) și specificitate (procentul de paciente care au boală și care vor avea un rezultat negativ);

b. Are risc scăzut;

c. Este larg acceptat atât de medici cât și de populația țintă;

d. Este eficient în reducerea morbidității sau mortalității.

Frotiul Pap cervico - vaginal este un preparat citologic recoltat adecvat ce conține celule exfoliate sau disociate mecanic de la nivelul vaginului, colului și, uneori, endometriului, și care ulterior sunt etalate pe o lamă de sticlă.

Frotiurile sunt fixate, colorate corespunzător și evaluate citomorfologic pentru următoarele scopuri:

- depistarea unor modificări microscopice la nivelul mucoasei colului uterin la femeia asimptomatică;

- depistarea recidivei unor afecțiuni anterioare ale colului;

- evaluarea unor anomalii hormonale susținute clinic;

- monitorizarea terapiei hormonale.

Obținerea unui frotiu Pap implică:

- vizualizarea colului;

- recoltarea de la nivelul acestuia prin răzuire cu unul sau mai multe instrumente,

- transferul celulelor de pe dispozitivul de recoltare pe o lamă de sticlă (efectuarea frotiurilor).

După cum se știe, epitelul cervical este influențat permanent, mai ales la nivelul zonei de tranziție scuamo-cilindrică, de hormoni, bacterii și alți factori. Epitelul răspunde prin modificarea numărului, a gradului de maturitate și de diferențiere a celulelor. Se preferă recoltarea la jumătatea ciclului deoarece în această perioadă, de obicei, detaliile citologice nu sunt acoperite de sânge sau elemente inflamatorii.

Scopul recoltării unui frotiu cervical este obținerea unui specimen reprezentativ pentru joncțiunea scuamocilindrică (zona de transformare) deoarece majoritatea leziunilor precursore carcinomului scuamos invaziv al colului uterin au originea la acest nivel.

METODOLOGIE

a. *Vizualizarea colului și a zonei de transformare* se face prin introducerea cu grijă în vagin a unui specul preîncălzit care poate fi lubrifiat cu o soluție salină (ser fiziologic). Nu se recomandă folosirea unui gel lubrifiant pe specul deoarece poate să acopere detaliile celulare, poate modifica afinitatea funcțională a acestora, poate să interfereze cu aderența celulară și poate favoriza proliferarea bacteriilor pe lamă.

Atunci când colul uterin e acoperit de sânge sau secreții, acestea se îndepărtează cu blândețe cu ajutorul unui tampon de vată sau tifon.

Pacienta trebuie informată asupra respectării anumitor recomandări și anume:

- evitarea spălăturilor vaginale cu 48 h înainte de recoltare;

- nu se admite folosirea cremelor vaginale cu 1 săptămână înainte;

- evitarea contactului sexual cu 24 h înainte.

b. Metode de recoltare

Recoltarea trebuie să înceapă cu informarea corectă a pacientei asupra testului Pap.

Inițial, frotiurile Pap au fost obținute prin irigare vaginală urmată de aspirarea fluidului din fundul de sac vaginal posterior într-un lichid fixator. După Ayre, frotiurile obținute prin aspirație vaginală conțineau celule care erau deja exfoliate. El a recomandat folosirea unei mici spatule pentru răzuirea ușoară a suprafeței fesurilor de la joncțiunea scuamocilindrică pe care a denumit-o spatula Ayre.

Sunt disponibile multe tipuri de spatule comerciale, dar unii autori recomandă folosirea spatulei „Aysesbury”; aceasta are un vârf mai alungit care facilitează recoltarea celulelor din canalul endocervical și o lamă orizontală care permite recoltarea pe o suprafață mai mare de la nivelul exocolului acoperind și zona de transformare.

Punol et al. au obținut frotiuri pentru evaluare citologică prin introducerea în canalul cervical a unei pense ce conține în vârf un tampon de bumbac înmuiat în prealabil într-o soluție salină, urmată de răscuirea ei de câteva ori într-o singură direcție și apoi întinderea materialului recoltat pe o lamă de sticlă.

Jonson et al. au concluzionat că rezultate mai bune se obțin prin asocierea și a unui tampon endocervical. În anii 1970, metoda standard de obținere a frotiurilor, a fost reprezentată de combinarea recoltării de la nivelul exocolului cu recoltarea de la nivelul endocolului folosindu-se o pensă port-tampon sau prin aspirație cu un tub de plastic. Astfel, pentru fiecare pacientă, pentru recoltare se alege spatula Ayre care se potrivește cel mai bine anatomiei exocolului și zonei sale de transformare. Se așază spatula astfel încât porțiunea orizontală să vină în contact cu exocolul, iar porțiunea verticală se poziționează în canalul cervical; se realizează o recoltare circumferențială prin răscuirea spatulei cu 360° în timp ce se menține contactul strâns cu suprafața exocolului, obținându-se astfel celule de la nivelul întregii joncțiuni scuamoase. Rotația spatulei se poate face în sensul acelor de ceasornic (de la ora 9 la 9) sau împotriva acelor de ceas (de la ora 3 la 3).

Localizarea și aspectul zonei de transformare sunt variabile depinzând de factori ca: vârstă, pH vaginal, sarcină, mediu hormonal, terapia anterioară și de anatomia individuală. Odată cu vârsta, de obicei începând de la 40 de ani, joncțiunea scuamo-cilindrică tinde să fie situată cât mai sus în canalul cervical, făcând ca recoltarea de la acest nivel să se realizeze astfel mai dificil. Totuși, chiar și la femei mai tinere, în 20% din cazuri frotiurile nu conțin celule endocervicale. Deși în Sistemul Bethesda 2001 se consideră că celulele endocervicale sunt un factor important în evaluarea adecvabilității frotiului cervical, absența lor nu obligă la repetarea testului Pap. Nu există o asociere semnificativă între paritate sau faza ciclului menstrual și numărul celulelor endocervicale pe frotiu.

În 1986 a fost introdus un nou dispozitiv pentru obținerea frotiului endocervical numit *Cytobrush*. Frotiul endocervical este util nu numai pentru depistarea leziunilor endocervicale, dar și pentru depistarea leziunilor intrauterine care astfel pot fi omise; el permite, de asemenea, depistarea modificărilor celulelor endocervicale induse de inflamație și a metaplaziei pavimentoase. Cytobrush are peri circumferențiali care vin în contact cu întreaga suprafață de inserție; se introduce în canalul cervical; se răsucesce un sfert de rotație după care produsul recoltat este înțins pe o lamă de sticlă în strat cât mai subțire prin răscuirea perutei de-a lungul lamei. Nu se recomandă folosirea Cytobrush în sarcină.

Dacă frotiurile obținute cu Cytobrush nu conțin celule endocervicale, nu este necesară repetarea recoltării. Există două excepții de la această regulă:

- femeile la care sunt suspectate leziuni glandulare neoplazice;
- femeile care au fost tratate pentru neoplazie cervicală intraepitelială (CIN) și au stenoză cervicală.

Pentru obținerea frotiurilor Pap au mai fost introduse și alte dispozitive cum ar fi: *The Eisenstein Ecto-Endo-Cervical Scraper* și *Cervex-brush*. Totuși, cu nici unul din acestea nu s-a observat o creștere a proporției frotiurilor cu celule displazice. Cervex-brush este o periuță de poliolenă moale, flexibilă, cu lungimea de 20 cm, ce constă din 57 țepi de plastic semi-circulari de diferite lungimi. Țepii din mijloc sunt cei mai lungi și pătrund adânc în canalul endocervical, iar cei mai scurți ating în același timp suprafața exocolului și zona de transformare. Prin

inserarea Cervex-brush în canalul cervical și rotirea ei de 5 ori în sensul acelor de ceasornic cu o ușoară presiune, toate celulele necesare pot fi recoltate printr-o singură mișcare. Folosirea Cervex-brush este esențială pentru realizarea unui singur frotiu; frecvența frotiurilor nesatisfăcătoare pentru diagnostic este sub 4%; nu produce sângerare; reduce costul frotiului Pap (datorită ratei scăzute de repetabilitate) și anxietatea pacientei.

c. Efectuarea frotiurilor

După recoltare, metoda convențională de obținere a frotiului constă în transferul materialului recoltat de pe dispozitivul de recoltare pe suprafața unei lame de sticlă pe care este scris fie numele pacientei, fie numărul din registrul la care a fost înregistrată pacienta.

În ceea ce privește numărul frotiurilor necesare pentru o evaluare citologică corespunzătoare, acesta diferă în funcție de autori.

Astfel, unii preferă recoltarea a două frotiuri (exocervical, endocervical) sau a trei frotiuri separate (vaginal, exocervical și endocervical), metodă folosită și în majoritatea cabinetelor de specialitate din Craiova. Alții preferă realizarea frotiului VCE astfel:

- lângă marginea rugoasă a lamei de sticlă se întinde materialul recoltat de pe peretele lateral al vaginului cu o spatulă de lemn obișnuită (V);
- la mijloc - material recoltat de la nivelul exocolului (C);
- spre cealaltă extremitate a lamei - material recoltat de la nivelul canalului cervical cu unul din dispozitivele amintite mai sus (E).

Ală modăritate este reprezentată de amestecarea pe aceeași lamă a materialului exocervical (recoltat cu spatula) cu produsul endocervical (recoltat cu penula Cervex-brush), obținându-se „frotiul rapid” al lui Frost (*Frost's "fast smear"*) sau frotiul unic. În acest caz există trei opțiuni pentru întinderea produsului recoltat:

- se împarte în două jumătăți lungimea suprafeței lamei de sticlă. Produsul de pe spatulă se întinde pe jumătatea superioară a lamei, iar cel de pe periuță pe jumătatea inferioară.
- produsul de pe spatulă se întinde pe toată lama, iar peste acest frotiu se întinde produsul de pe periuță (se fixează imediat).
- se împarte în două jumătăți lăjimea lamei de sticlă. Produsul recoltat cu spatula se întinde pe jumătatea din vecinătatea marginii rugoase a lamei, iar cel de pe periuță pe cealaltă jumătate.

Dezavantajul frotiului unic este că uneori nu se poate identifica cu precizie locul de origine al eventualelor celule displazice sau atipice diagnosticate pe frotiu.

Frotiurile care ajung în laboratorul de citologie trebuie să fie însoțite obligatoriu de un bilet de trimitere care să conțină: numele, prenumele și vârsta pacientei; data recoltării; data ultimei menstruații, orice semn sau simptom clinic relevante; statusul endocrinologic al pacientei (sarcină, postmenopauză, etc.); istoric de tratamente hormonale sau administrări de contraceptive; prezența dispozitivului intrauterin; dacă este cazul: tipul și datele chimioterapiei, intervenții chirurgicale ginecologice în antecedente, istoric de neoplazie, detalii privind testele Pap anterioare, factori de risc; numele, semnătura și parafa medicului care a

examinat pacienta. În anumite situații, frotiurile care ajung în laborator pot fi considerate nesatisfăcătoare și respinse din două motive:

1. Motive tehnice: - lamele pe care au fost etalate frotiurile sunt sparte sau lipsesc datele de identificare ale pacientei.
2. Motive legate de interpretare:
 - mai mult de 75% din celule sunt acoperite de exudat inflamator sau sânge,
 - prea puține celule pe frotiu (mai puțin de 1000),
 - frotiul conștă mai ales din celule glandulare endocervicale și nu este reprezentată zona de tranziție,
 - fixare necorespunzătoare a celulelor.De asemenea, există o serie de factori care reduc acuratețea frotiurilor Pap:
 - contaminarea frotiului cu sânge sau lubrefianți,
 - istoric clinic neadecvat,
 - recoltare inadecvată de la nivelul zonei de tranziție,
 - frotiu etalat prea gros sau care ocupă mai puțin de 10% din suprafața lamei de sticlă (material insuficient),
 - recoltarea testului Pap în ciuda infecției evidente,
 - confundarea frotiurilor sau a numelor pacientelor,
 - neidentificarea celulelor displazice,
 - interpretare greșită a diagnosticului clinic,
 - prelucrare tehnică deficitară.

Recoltarea de la nivelul altor zone anatomice ale tractului genital feminin

a. De la nivelul VULVEI

Această zonă se folosește pentru depistarea carcinomului vulvar in situ, pentru specificarea naturii unei leziuni vulvare sau vaginale sau pentru obținerea altei informații utile diagnosticului clinic, cu disconfort minim pentru pacientă.

Leziunile vulvare de consistență moale pot fi evaluate citologic cu ajutorul frotiului amprentă obținut prin aplicarea unei lame de sticlă pe suprafața leziunilor. În cazul leziunilor vulvare cu consistență crescută recoltarea se face prin răzuirea suprafeței leziunii cu lama unui bisturiu. (Răzuirea trebuie să fie mai puternică în prezența unui strat gros de keratină).

b. De la nivelul VAGINULUI

Pentru studiul leziunilor vaginale se folosește recoltarea prin aspirație din fundul de sac vaginal posterior sau prin răzuirea ușoară de sus în jos a pereților vaginali anterior, posterior și laterali.

În afara valorii lor în depistarea celulelor maligne, frotiurile vaginale sunt utile și pentru evaluarea profilului hormonal al pacientei, pentru evaluarea unei posibile reacții inflamatorii în vagin, pentru identificarea caracteristicilor microbiologice ale florei vaginale și pentru depistarea citologică a adenozei vaginale și a carcinomului cu celule clare (frotiuri de pe fiecare perete al

vaginului).

c. De la nivelul CAVITĂȚII UTERINE

Spre deosebire de carcinomul epidermoid cervical, pentru screening-ul carcinomului endometrial nu există un test satisfăcător.

Au fost descrise mai multe tehnici pentru recoltare de la nivelul endometriului, dar a căror acuratețe este variabilă în depistarea citologică a carcinomului endometrial.

Pentru recoltare din cavitatea uterină se recomandă folosirea următoarelor metode:

c.1. Frotiul V.C.E., folosit în screening-ul carcinomului cervical poate evidenția unele anomalii endometriale dar are sensibilitate și specificitate reduse. Prin această metodă se evidențiază celulele endometriale descumate spontan care se acumulează în fundul de sac vaginal posterior. Pentru recoltare se folosește spatula Ayre modificată. Totuși, frotiul cervical de rutină este o metodă extrem de ineficientă, depinzând de șansa de a recolta celule endometriale de la nivelul originii orificiului exterior al colului uterin în momentul în care se face recoltarea.

c.2. Aspirația fluidului cervical pare a fi o metodă practică și sigură de evluare a leziunilor endometriale, folosită de rutină în unele laboratoare atunci când este suspectat carcinomul endometrial, cum ar fi cazul pacientelor cu vâsua peste 40 de ani, cu metroragie. Se introduce în canalul endocervical o canulă de plastic sau de metal la care se atașează o pară de cauciuc cu care se aspiră. Produsul aspirat este întins pe una sau mai multe lame de sticlă și fixat imediat.

c.3. Frotiul endometrial descris de Isaacs. În cavitatea uterină se introduce o canulă de inox flexibilă cu diametrul de 1,9 mm, cu aproximativ 40 perforații, la care este atașat un dispozitiv asemănător unui robinet. Canula este deplasată de la o extremitate a cavității la cealaltă, în timp ce se aplică o presiune negativă cu ajutorul unei seringi de 10 ml. Materialul aspirat se întinde în strat cât mai subțire pe una sau mai multe lame și se fixează imediat în alcool 95%.

c.4. Periajul endometrial și Helixul Mi-Mark - se realizează prin introducerea intrauterin fie a unei periuțe mici, fie a unui helix moale de plastic denumit helix Mi-mark. Acestea sunt apoi răscuțite pentru a răzu endometriul, iar materialul recoltat se întinde ulterior pe lame de sticlă. Periuța mai poate fi introdusă într-un lichid de conservare care apoi se filtrează. Această metodă nu se folosește datorită:

- dificultății sterilizării instrumentelor,
- riscului de a rămâne peri din periuță în uter,
- conservării mai puțin optime a detaliilor citologice.

Totuși, sensibilitatea acestei metode este de 97%, specificitatea de 96%, iar valoarea predictiv pozitivă de 97%.

c.5. Aspirația endometrială Vakutage și Vabra

Aspirația directă a endometrului cu ajutorul unei camere Vakutage duce la obținerea unui material bine conservat, concentrat, în care se pot include glande întregi. Canula (chiureta) de 4 mm este introdusă în cavitatea uterină prin orificiul exterior al colului uterin și se recoltează simultan prin chiuretă și aspirație. Din materialul recoltat se pot face frotiuri direct sau după filtrare, sau se pot face blocuri celulare. Totuși, folosirea canulei endometriale necesită experiență, condiții de asepie, timp, iar din punct de vedere tehnic metoda e mai dificilă comparativ cu aspirația endocervicală. Este folosită și în caz de cervicită sau endometrită.

Dispozitivul de aspirație Vabra este o canulă de metal cu diametrul de 3 mm atașată la o cameră de plastic cu un filtru. După aplicarea unei presiuni negative în cameră și aspirarea materialului, se adaugă formalină pentru fixarea materialului acumulat pe suprafața filtrului și se fac blocuri celulare. Metoda are o acuratețe de 90-95% dar adesea produce disconfort pacienței.

c.6. Spălarea în jet și lavajul endometrial

Metoda jetului Gravlee implică spălarea cavității uterine cu ser fiziologic sub presiune negativă, pentru evitarea diseminării eventualelor celule tumorale prin trompa uterină.

În uter se introduce un tub format din 2 cilindri cu multiple perforații pe o parte, ajustat astfel încât să ajungă până la 1 cm de fundul uterului. Un tampon cervical la nivelul orificiului exterior creează o cavitate închisă etanș. Presiunea negativă se creează în cavitatea uterului cu ajutorul unei seringi atașată unui dintr-un cilindri. Aceasta duce la formarea unui jet prin cilindrul perforat care spală cavitatea endometrială înainte de a se reintoarce în seringă. Materialul se filtrează apoi sau se centrifughează, se întind pe lame și se colorează.

Această metodă nu necesită anestezie și poate fi efectuată și la paciențele din ambulator.

Oricare ar fi valoarea recoltării directe de la nivelul endometrului, trebuie subliniat faptul că în cazul oricărei femei în postmenopauză, pe ale cărei frotiuri Pap sunt prezente celule endometriale, este necesară o investigație suplimentară deoarece prezența acestor celule după menopauză este întotdeauna anormală chiar în absența anomaliei citologice. În plus, prezența pe frotiuri a celulelor endometriale la orice femeie peste 40 de ani, după ziua 14 a ciclului, în absența unui dispozitiv intrauterin, impune investigație similară.

Investigația inițială este reprezentată de examenul citologic pe frotiuri efectuate din produsul de aspirație endometrială, care poate evidenția celule atipice. Totuși, un diagnostic citologic negativ la o pacientă suspectată de carcinom endometrial nu exclude această boală. De aceea investigația trebuie completată cu un chiuretăj biopunc etajat al canalului endocervical și al cavității endometriale.

PRELUCRAREA FROTIURILOR

FIXAREA

a. Aspecte generale ale metodelor de fixare

Fixarea imediată a materialului celular este primul pas esențial pentru acuratețea diagnosticului citologic. Scopul fixării în citologie este păstrarea caracteristicilor citomorfologice cât mai apropiate de cele din vivo și menținerea elementelor citochimice esențiale diagnosticului citologic.

Fixatorul este definit ca o substanță folosită pentru menținerea formelor și structurilor celulare existente. Acest lucru se realizează prin fixarea imediată a frotiurilor după înținderea materialului recoltat.

Fixarea prin uscare în aer, care apare în 10% de la înținderea frotiului, poate face ca frotiul să fie dificil sau imposibil de interpretat în colorația Papanicolaou.

Condițiile pe care trebuie să le îndeplinească un fixator optim sunt:

- penetrarea rapidă în celule;
- minimalizarea retracției (micsorării) celulelor;
- menținerea integrității morfologice;
- inactivarea enzimelor autolitice;
- să înlocuiască apa intracelulară;
- să permită pătrunderea coloranților în celule;
- să permită aderarea celulelor la suprafața lamei de sticlă;
- să corespundă metodei de colorare care va fi folosită ulterior;
- să fie bactericide;
- să fie reproducibile.

La început, atât Papanicolaou în 1963 cât și Reider în 1966 au utilizat pentru fixare un amestec de eter și etanol 95% în raport 1:1. În ultimii ani, acest amestec a fost înlocuit de alte soluții și diferite spray-uri fixatoare.

Există trei metode de fixare:

a. Fixarea umedă -- prin introducerea imediată a frotiurilor proaspăt recoltate într-o soluție fixatoare. Ele rămân în această soluție până ajung în laborator unde sunt numerotate și colorate. Celulele nu sunt expuse la aer.

b. Fixarea umedă cu uscare în aer ulterioară: frotiurile se introduc imediat într-o soluție fixatoare o anumită perioadă de timp, după care se scot din fixator, se usucă și apoi se transportă la laborator. Odată ajunse aici, se reintroduc în etanol 95% soluție (sau în altă soluție) înainte de colorare.

c. Fixarea cu spray se realizează prin pulverizarea frotiurilor proaspete cu un spray fixator.

Spray-urile fixatoare constau de obicei dintr-o substanță de bază alcoolică și o substanță ceroasă (Carbowax) care produce un strat protector ce acoperă celulele. În acest caz, lama de sticlă se așează pe un plan neted și se pulverizează asupra frotiului de la o distanță de 15-25 cm. Dacă distanța este prea mică, jetul de pulverizare poate produce alunecarea pe lamă a materialului recoltat cu formarea de suprapunerii celulare sau chiar îndepărtarea definitivă a acestuia. Nu se recomandă folosirea spray-urilor fixative pentru păr existente în comerț deoarece substanțele pe care le conțin pot produce modificări celulare, iar fixarea realizată de acestea nu este optimă.

În cazurile în care nu poate fi evitată fixarea frotiului prin uscare în aer și totuși acestea trebuie colorate prin metoda Papanicolaou, se poate obține rehidratarea lor prin introducerea lamelor într-o soluție de 50% glicerol și apă. În aceste condiții însă, rezultatele obținute prin această metodă sunt suboptimale.

Înainte de colorare, se introduc frotiurile în două băi separate de etanol 95% pentru a îndepărta polietilen-glicolul (Carbowax) care acoperă celulele. Frotiurile rămân în prima baie de etanol aproximativ 30 minute. Uneori se pot vedea la suprafața soluției particule mici, opace, ceroase, de aceea aceasta trebuie schimbată după fiecare utilizare. În a două baie de etanol 95% frotiurile sunt finite 10-15 minute. Folosirea acestor 2 băi de etanol este de obicei suficientă pentru a dizolva substanța ceroasă, dacă mediul este prea cald și umed, este necesară folosirea încă a unei băi de etanol. În cazul când Carbowax nu a fost îndepărtat complet, el va fi vehiculat prin soluțiile de colorare determinând în final dificultăți de interpretare ale celulelor.

Fixatorii alcoolici cei mai folosiți sunt:

- etanol 95% - acționează rapid și nu e toxic;
- izopropanol 80%;
- propanol 80%;
- metanol 100% e toxic, se folosește mai ales pentru frotiurile uscate în aer;
- alcool denaturat 95% - 90 părți etanol 95%;
- 5 părți metanol absolut;
- 5 părți izopropanol absolut.
- alcool pentru analiză - metanol absolut;
- izopropanol 80%;
- acetonă 90%.
- amestec de - acetat etil - o parte;
- metylisobutylketonă - o parte;
- benzină de avion (Kerosen) - o parte;
- etanol - 100 părți.

Pentru ca fixatorul să penetreze suprafața celulelor, frotiul trebuie întins în strat cât mai subțire (monostrat) care este ușor de fixat, de colorat, de montat și de examinat.

Totuși, obținerea adevăratelor frotiuri în monostrat poate fi realizată doar pe material recoltat ca suspensie celulară și necesită de obicei o aparatură sofisticată.

Gradul aderenței celulare la lama de sticlă depinde, în general, de zona anatomică de la nivelul căreia se face recoltarea și de prezența diferitelor stări patologice. Astfel, celulele dintr-un col uterin normal aderă mai bine decât cele prelevate de la o pacientă cu un proces inflamator local. În acest ultim caz, fixarea cu spray-ul permite obținerea unor rezultate mai bune decât cea obținută cu etanol 95%. De aceea, pentru a favoriza aderența celulelor de lama de sticlă, se poate folosi albumina Mayer sau hidrobromid polilizina într-o soluție apoasă 0,1%. Substanțe care fie sunt întinse pe lame înainte de întinderea materialului recoltat, fie sunt adăugate probelor lichide, înainte de centrifugare.

Prezența pe frotiu a hematiilor care acoperă parțial sau total celulele epiteliale trebuie semnalată în rezultatul citopatologic, conform Sistemului

Bethesda, ca „frotiu optim” sau „nesatisfăcător”. Există mai multe metode pentru fixarea și prelucrarea frotiurilor sau a probelor hemoragice. Boschann (Boschann-Personal communication) recomandă adăugarea unei picături de acid acetic în soluția de etanol 95% în care se face fixarea frotiurilor, pentru liza hematiilor, dar și pentru fixare. Unele laboratoare folosesc fixatorul Carnoy sau Clarke sau formule modificate ale acestora. Unii autori recomandă fixarea inițială a frotiurilor și ulterior introducerea lor într-o soluție de lizare, în timp ce alții introduc frotiurile direct într-un mediu pentru liza hematiilor. Este important ca frotiurile să fie bine spălate după scoaterea lor din această soluție, iar timpii de colorare în hematoxilină și EA să fie mai mici.

Fixatorul Carnoy se prepară întotdeauna proaspăt din etanol absolut, cloroforn și acid acetic glacial în proporție 6 : 3 : 1. El este un excelent fixator nuclear și are rol și în fixarea glicogenului. Se mai pot folosi formule modificate ale acestui fixator și anume:

- etanol 95%, cloroforn, acid acetic glacial (7 : 2,5 : 0,5);
- etanol 95%, cloroforn, acid acetic glacial (6 : 3 : 1);
- etanol 95%, acid acetic glacial (6 : 1).

Nu se cunoaște încă perioada de valabilitate a acestor soluții, dar la un moment dat ele se transformă în acid clorhidric. De aceea se recomandă înlocuirea lor după fiecare utilizare și agitarea înainte de folosire.

Fixatorul Clarke este compus din etanol absolut și acid acetic glacial în proporție de 3:1.

Alte modalități de liză a hematiilor sunt:

- adăugarea unei picături de acid clorhidric în 500 ml etanol 95%;
- introducerea frotiurilor în acid acetic glacial 10% după fixarea lor în etanol 95%;
- adăugarea de uree 2M (120 g uree pulbere într-un litru de apă distilată).

Metode de liză a hematiilor:

- I. 1. Fixare în etanol 95% - 15-20';
2. Fixare în soluție Carnoy - 10' sau mai puțin;
3. Introducere în etanol 95%.
- II. 1. Introducere în fixator Carnoy - 3'-5' până când produsul recoltat devine incolor;
2. Treccere în etanol 95%.
- III. a. Fixare în etanol 95% - 5';
- b. Introducere în soluție de uree 2M - 30'';
- IV. a. Fixare în etanol 95% - 15-20';
- b. trecere în soluție de uree 2M - până la 1'.
- V. a. Fixare în fixator Clarke - 10-15';
- b. Spălare în etanol 95%.

Calitatea fixării trebuie monitorizată de personalul mediu din laborator, iar frotiurile cu fixare slabă sau inadecvată trebuie raportate clinicienilor. Frotiurile fixate corespunzător sunt apoi colorate prin diferite metode și examinate la microscop.

CAPITOLUL XI

TEHNICI DE PRELUCRARE A ALTOR PRODUSE ÎN AFARA CELOR DIN SFERA GINECOLOGICĂ

I PRELUCRAREA REVĂRSATELOR PLEURALE, PERTONEALE ȘI PERICARDICE

Revărsatele seroase pot fi transudate sau exudate, clasificare care se bazează pe greutatea specifică, pe conținutul de proteine și pe alți parametri biochimici. Transudatele sunt fluide cu greutate specifică mică (sub 1010), cu conținut proteic scăzut și cu celularitate redusă. Exudatele au greutate specifică mare (peste 1010), un bogat conținut proteic și numeroase celule.

Intrucât revărsatele seroase pot avea diferite aspecte macroscopice în funcție de mecanismul de producere și de istoricul clinic, se recomandă precizarea acestor aspecte pe buletinul citologic, precum și a volumului probei lichidiene trimise în laboratorul de citologie.

Seros	Chilos	Pseudo-chilos	Citrotic	Eozinofilic	Infamator	Infecțios	Hemergic
Macroscopic Apos. clar	Lăptos, alb	Lăptos, verzui	Apos, brun	Apos	Alb-gălbui	Verzui, miositor	Brun sau roșu intens, opac
Microscopic Hipocelular	Celule cu conț. Lipidic	Celule spumoase	Celule atipice	Eozinofile	PMN, limfocite	PMN, limfocite	Celule maligne
Semif. Posibilă	Retenție limfă	Cristale de colesterol	Transudat, bilirubină	Proces alergic	Boală de colagen	Taberculoză	Mezoteliom, carcinom

II Aspecte macroscopice și microscopice ale revărsatelor seroase

Celulele dintr-un exudat aderă, de obicei, mai bine la suprafața unei lame de sticlă comparativ cu celulele dintr-un transudat. Diferența dintre exudate și transudate este evidențiată în tabelul de mai jos.

	Aspect macroscopic	Coagulare	Comportament bacteriologic	Celularitate
EXUDAT	Opac (noros)	Coagulează la temperatura camerei	Poate favoriza proliferarea bacteriană	Hipercelularitate, predominant inflamatorie
TRANSUDAT	Clar	Nu coagulează	De obicei steril	Celularitate redușă, de obicei celule mezoteliale

Transudate și exudate

În afara precizării diagnosticului citologic al transudatelor și exudatelor, citologia revărsatelor și-a extins utilitatea în evaluarea lavajelor peritoneale pentru stadializarea neoplazilor maligne ovariene, precum și în supravegherea pacienților supuse tratamentelor specifice.

Etiologia revărsatelor este foarte variată, putând să apară în boli de collagen, afecțiuni circulatorii, neoplasme și infecții. Deoarece pe biletul de trimitere care însoțește revărsatul nu se furnizează întodeauna informații referitoare la potențialul infecțiv al acestuia, toate probele trebuie considerate infectate și prelucrate cu grijă deosebită. Astfel, revărsatele seroase se pot întâlni în afecțiuni ca: tuberculoză, infecții virale, infecții parazitare (cum ar fi cea cu *Strongyloides stercoralis*), infecții cu agenți oportuniști la pacienți imunosupresați, etc.

Recoltarea adecvată, conservarea și prelucrarea coresponsătoare a revărsatelor seroase sunt esențiale pentru o corectă interpretare citologică.

Alegerea metodei de citoprelucrare se face în funcție de proprietățile fizice ale probei lichidiene respective și de istoricul pacientului. Este foarte important ca buletul de însoțire al probei să conțină o informație clinică pertinentă pentru ca citopatologul să o poată corela cu aspectele citologice.

Pentru a preveni coagularea revărsatelor seroase, se recomandă adăugarea după recoltare a 1 ml soluție de heparină 1:1000 la 100 ml fluid recoltat sau realizarea recoltării într-un recipient ce conține soluție de EDTA. În situația în care aceste condiții nu pot fi îndeplinite, iar produsul nu poate fi trimis imediat după recoltare în laboratorul de citologie, acesta trebuie congelat pentru evitarea lizei și degenerării celulelor.

Varietatea și tipul probelor lichidiene pot necesita pentru citodiagnostic o serie de teste suplimentare, cum ar fi: teste de imunocitochimie, teste microbiologice și colorații speciale.

Metoda de prelucrare poate fi aleasă în funcție de rezultatele testului rapid cu albastru de toluidină. În general, se pot întâlni următoarele posibilități:

1. Dacă produsul este în cantitate mică, are aspect clar și conține puține celule (la testul cu toluidină), atunci metoda de elecție este filtrarea cu ajutorul filtrelor citologice.

2. Dacă produsul este tulbure ("cloudy"), are puțin sediment după centrifugarea inițială și are celularitate moderată, se procedează astfel: fie se efectuează frotiuri direct din sediment, fie se prelucurează prin

citocentrifugare sau filtrare. Frotiurile directe sunt fixate atât uscat cât și umed pentru colorațiile MGG, Diff-Quick și, respectiv, Papanicolaou.

3. Dacă fluidul este hemoragic și nu are sediment, se poate folosi metoda cu saponină combinată cu filtrarea produsului, frotiuri directe sau citocentrifugare.

4. Prelucrarea unui fluid mucoïd se poate face prin frotiuri directe sau prin metoda de concentrare Saccamanno.

5. În general, toate probele pot fi prelucrate prin metode de filtrare, dar nu toate probele celulare au o cantitate suficientă de celule prin metoda frotiului direct.

Centrifugarea inițială se poate face în mai multe moduri, după diferiți autori. Unii autori [Wied și colab., 1992] recomandă folosirea următoarei metode: se pun 200 ml fluid într-o eprubetă (se recomandă folosirea eprubetelor cu vârf conic), se amestecă cu o cantitate egală de alcool etilic 50% și apoi se centrifughează timp de 30 minute. Se recomandă ca întreaga cantitate de lichid extrasă prin punctie (ex. - revărsatele lichidiene masive) să fie imediat trimisă în laboratorul de citologie unde se prelucurează în totalitate. Astfel, inițial se amestecă cu o cantitate egală de etanol 95%, apoi se reparitizează în eprubete conice (de 15 sau 50 ml) și se centrifughează. Timpul și viteza de centrifugare sunt, de asemenea, variabile în funcție de produs:

- revărsatele seroase - 5 - 10 minute, la 1500 - 3000 rot/min.
- lichidul cefalorahidian - 4 - 5 minute, la 1500 - 2000 rot/min.
- urina - 10 minute, la 2000 - 2500 rot/min.
- sputa (cu fixator Carbowax) - 5 minute, la 1500 rot/min.

Din sediment se pune câte o picătură pe una sau mai multe lame de sticlă (pretratate cu albumină sau nu, în funcție de tipul de colorație care se va efectua) care apoi se învânde în strat cât mai subțire cu ajutorul altei lame; în general, se efectuează minim trei frotiuri. Când cantitatea de sediment este mare, se efectuează mai multe frotiuri pentru diferite colorații și, eventual, sedimentul rezidual poate fi inclus la parafină și prelucrat ca "bloc celular". Frotiurile pot fi colorate prin metoda Papanicolaou, MGG, Diff-Quick sau Hematoxilina-Eozină. Probele proaspete pot fi prelucrate imediat fără fixator. De asemenea, se pot realiza și colorații rapide supravitale (ex. colorația cu albastru de toluidină, cu albastru de timină, etc.).

Prelucrarea probelor hemoragice prin metodele cu saponină

Saponina, enzima care produce liza hematiilor, poate fi utilă în prelucrarea probelor celulare hemoragice. Metodele cu saponină realizează liza hematiilor în timp ce celulele sunt în suspensie. Se recomandă folosirea acestei metode în cazul tuturor probelor lichidiene în care sunt vizualizate hematii după centrifugarea inițială.

Când această metodă este realizată corect, supernatantul va avea culoare roșie, iar sedimentul, albă, exact invers față de ce se obține în mod normal prin centrifugare. Saponina trebuie folosită cu atenție deoarece atunci când este în exces poate distruge componentele celulare din proba respectivă. Timpul este elementul critic, acțiunea saponinei trebuind să fie oprită după 1 minut cu ajutorul ionilor de

calcium din soluția de gluconat de calciu. Soluția se prepară cu mască de protecție, pentru a evita inhalarea pulberii de saponină, astfel:

- 1 g saponină
- 0,2 g sare sodică de acid p-hidroxibenzoic
- 100 ml apă distilată.

Toate aceste ingrediente se amestecă bine și se filtrează.

Soluția de gluconat de calciu se obține amestecând bine și apoi filtrând următorul amestec:

- 3,0 g gluconat de calciu,
- 0,02 g sare sodică de acid p-hidroxibenzoic,
- 100 ml apă distilată.

NOTĂ. Această soluție este un bun mediu de cultură pentru fungi.

Metodele cu saponină:

1. *Metoda 1:*

- a) centrifugarea probei 10 minute la 3000 rot./min.;
- b) se aruncă supernatantul;
- c) resuspensia sedimentului în 30 ml soluție de sare Hank neutră (BSS);
- d) se adaugă 5 picături de soluție de saponină;
- e) agitare lentă timp de 1 minut;
- f) se adaugă 15 picături de soluție de gluconat de calciu pentru stoparea acțiunii enzimei; se amestecă bine;
- g) centrifugare la 2000 rot/min.;
- h) dacă sedimentul este încă hemoragic, se repetă procedura. Dacă sedimentul lipsește, produsul se filtrează.
- i) când sedimentul este vizibil, se prepară frotiuri directe;
- j) fixare umedă cu spray pentru citologie;
- k) colorare.

2. *Metoda 2:*

- a) centrifugarea probei 10 minute la 3000 rot./min.;
- b) se aruncă supernatantul;
- c) se adaugă 25 ml soluție de sare Hank neutră (BSS);
- d) se amestecă bine în agitator;
- e) se adaugă soluție de sare Hank neutră (BSS) până la 45 ml și se amestecă bine;
- f) se adaugă 2 ml saponină 1% și se omogenizează bine;
- g) se așteaptă 1 minut;
- h) se adaugă 3 ml gluconat de calciu 3% și se amestecă;
- i) centrifugare 10 minute la 3000 rot/min.;
- j) citocentrifugare sau filtrare;
- k) fixare;
- l) colorare.

Pentru prepararea soluției de sare Hank neutră se procedează astfel:

- 1. se dizolvă pulberea de sare Hank neutră în 950 ml apă distilată, deionizată, la temperatura camerei;
- 2. se adaugă 0,35 g de NaHCO₃ la 1 litru de soluție,
- 3. se adaugă 50 ml apă distilată, deionizată pentru a aduce volumul la 1 litru.

II. PRELUCRAREA PROBELOR OBTINUTE DIN TRACTUL GENIIO-URINAR

Efectuarea citodiagnosticului urinar se recomandă în următoarele situații:

Diagnosticul primar al tumorilor uroteliiale,

Hematurie,

Pacienți operați pentru tumori vezicale; în acest caz, citodiagnosticul urinar se efectuează cu următoarea rituitate: lunar în primul an, la 3 luni în al doilea an și apoi bianual; în cazul apariției recidivei, ciclul se reia.

Diagnosticul primar al tumorilor tractului urinar superior - prin urină spontană și lavaje uretero-pielo-caliceale,

Pacienți cu tumori ale organelor pelvine cu invazie posibilă în tractul urinar.

Pacienți cu tumori maligne prostatice invadante în trigonul vezical și uretra prostatică,

Infecții urinare cronice rebelle la tratament,

Adenom de prostată și sindrom de obstrucție subvezicală asociat frecvent cu tumori vezicale,

Achiziți de screening citologic urinar la populațiile cu risc crescut pentru neoplazia vezicală,

Identificarea focarelor de adenocarcinom care se pot dezvolta la nivelul mucoasei rezervorului de tip colic din vezica de substituție (citologie prin lavaj).

Tehnici citologice folosite în citologia urinară

Există încă multe controverse în ceea ce privește recoltarea eșantionului urinar. Cel mai frecvent se folosește urina eliminată spontan, iar mai rar se utilizează lavajul vezical, lavajul uretral și irigarea retrogradă. Recoltarea se face la 3 ore după ce pacientul a urinat ultima dată, iar cantitatea de urină recoltată spontan trebuie să fie minim 50 ml - maxim 100-300 ml.

Prelucrarea probei obținute implică atât etape obligatorii cât și etape opționale. În general, metoda de citoprocrescere trebuie aleasă în funcție de posibilitățile laboratorului, de locul unde se va face examinarea citologică și de necesitatea obținerii unui diagnostic rapid.

Holmquist (Holmquist ND, 1977) afirmă că o probă de urină poate sta la temperatură camerei dacă este prelucrată tot în ziua în care a fost obținută; în cazul în care trebuie lăsată peste noapte sau în week-end, ea trebuie ținută la congelator.

Dacă, în anumite condiții, nu poate fi adusă în laborator decât peste o perioadă mai lungă de timp, atunci se recomandă fixarea probei cu etanol 70% (fie în părți egale, fie două părți de urină la o parte de alcool).

În general, examinarea citologică nu se face la patul bolnavului și de aceea este necesară fixarea probei pentru prelucrarea ulterioară.

Acuratețea citodiagnosticului depinde de o fixare corespunzătoare. Există două posibilități de fixare:

- Adăugarea unei cantități corespunzătoare de fixator în recipientul care conține proba de urină,
- Concentrarea urinei → frotiuri → fixare uscată / cu spray fixator / fixare umedă.

Se recomandă împărțirea probei urinare în două părți:

1. Pentru citodiagnostic rapid prin colorație extemporanee cu albastru de metilen.
2. Fixare prealabilă → frotiuri → colorații permanente sau diferențiale.

În citologia urinară se lucrează cu celule exfoliate care sunt prelevate dintr-un volum mare de fluid. Datorită acestui efect de diluție, materialul celular trebuie concentrat înaintea examinării astfel încât să poată fi pus un diagnostic corespunzător într-o perioadă de timp rezonabilă.

Metode de concentrare:

- centrifugare directă cu obținerea unui sediment;
- metoda filtrării cu ajutorul membranelor filtrante;
- citocentrifugare (centrifugarea celulelor direct pe lamă).

Recoltarea

Întrucât micoziunea este un proces fiziologic, nu este nici o dificultate în recoltarea probei de urină pentru examinarea citologică.

Folosirea urinei eliminată spontan este satisfăcătoare pentru examinările citologice de rutină. Prima urină de dimineață nu ar trebui folosită deoarece stagnarea celulelor în vezică pe timpul nopții duce la degenerare celulară accentuată prin acțiunea enzimelor proteolitice și a citolizinelor bacteriene.

Unii examinatori preferă citologia după lavajul căilor urinare datorită celularității crescute. După urinare, vezica este irigată cu ajutorul unui cateter sau cistoscop cu 50 - 100 ml ser fiziologic (pentru a evita modificările celulare induse de hipo- sau hiperosmolaritate). Această metodă are, însă, și dezavantaje:

- folosirea instrumentarului determină modificări celulare reactive care pot mima aspectele displaziilor sau ale tumorilor bine diferențiate;
- în caz de exfoliere celulară accentuată se poate mima o falsă invazivitate.

Tehnici speciale de recoltare:

1. Lavajul tractului urinar superior (irigația retrogradă) - poate fi efectuat în acest caz se recomandă următoarele:

materialul citologic ar trebui recoltat înainte de administrarea substanței de contrast pentru a evita artefactele;

întrucât celulele uroteliale prezintă modificări reactive mult mai semnificative decât în cazul irigației vezicale, s-a dovedit a fi benefică efectuarea acestei metode în mai multe etape, și anume:

1. Se drenează vezica urinară prin cistoscop, preferabil fără irigare;
2. În condițiile unei diureze satisfăcătoare, se introduce un cateter în orificiul uretral și se obține o probă (cățiva ml) de urină produsă spontan;
3. Se spală tractul urinar superior cu 10 - 20 ml soluție salină izotonică sau soluție Ringer și apoi se colectează produsul de lavaj.

Astfel, în cazul unor modificări celulare reactive observate în produsul de lavaj al tractului urinar superior, urina recoltată din vezică și cea obținută spontan cu ajutorul cateterului oferă informații adiționale pentru examenul citologic.

2. **Metoda periajului retrograd**, descrisă prima dată de Gill și alții în 1973, este dificilă deoarece pasajul cateterului Ch 7 este destul de dureros necesitând folosirea unui anestezic și produce, de asemenea, artefacte importante. Datorită ratei ridicate de rezultate fals- pozitive, această metodă a fost abandonată.

3. Lavajul uretral

Deoarece 4 - 18 % din pacienții cistectomizați pot dezvolta o tumoră urotelială recurentă în uretra restantă, spălăturile uretrale reprezintă o modalitate importantă a programului de supraveghere postoperatorie. Acestea se pot realiza fie cu ajutorul unei pere de cauciu adaptată orificiului extern (dezavantaj: nu se irigă adecvat porțiunea proximală a uretrei restante la nivelul căreia se produc cel mai frecvent recidivele), fie cu ajutorul unui cateter subțire care ajunge până în porțiunea proximală a uretrei. Pentru irigație se folosește tot ser fiziologic sau soluție Ringer.

4. **Citologia prin aspirație.** Examinarea citologică a materialului aspirat este indicată ocazional și necesită adăugarea unui anticoagulant corespunzător (heparină, EDTA sau citrat de sodiu).

Prelucrarea probei de urină implică fixarea și concentrarea corespunzătoare a acesteia.

I. Fixarea

Fixarea materialului citologic este importantă deoarece permite efectuarea examenului citologic la distanță de locul unde s-a efectuat recoltarea. Permite realizarea unor colorații mai complexe și determină economie de timp și cost deoarece urmile recoltate în diferite momente (ex: 3 zile consecutiv) pot fi prelucrate în același timp.

Pentru fixare sunt folosite două metode de bază:

1. Fixarea celulelor în timp ce se găsesc încă în urină.
2. Celulele sunt prelevate inițial din urină, se realizează frotiuri care apoi sunt fixate.

- centrifugare simplă,
- frotiuri directe
- citocentrifugare.

Nu se recomandă prefixarea în alcool deoarece aceasta poate precipita orice proteină din lichid. Întrucât lichidul cefalorahidian normal conține puțină celulă, iar atunci când sunt prezente celule maligne, numărul acestora este de asemenea mic, cele mai bune rezultate se obțin prin citocentrifugarea sa care se efectuează similar cu citocentrifugarea probelor obținute din tractul genitourinar.

Pentru evitarea contaminării cu alte tipuri de celule care pot exista în bateria de colorare, frotiurile din LCR se colorează separat.

IV. PRELUCRAREA PROBELOR MUCOIDE

!!! Probele citologice provenite de la nivelul tractului respirator reprezintă un procent semnificativ din produsele prelucrate într-un laborator de citologie.

Prelucrarea probelor mucoide provenite de la acest nivel, sub formă de spută, produs de lavaj bronhic sau bronhoalveolar, produs de aspirat bronhic sau tracheal, se poate face prin diferite metode, dar cel mai frecvent sunt folosite: metoda "alege și înmide" și metoda de concentrare Saccmanno. Probele se pot prelucra direct sau după fixare prealabilă într-o soluție de alcool.

Indiferent de metoda folosită, scopul prelucrării tuturor probelor este obținerea celor mai bune frotiuri pentru diagnostic.

~ Sputa este compusă din secreții (predominant mucoide) și celule de la nivelul căilor aeriene și a alveolelor, și se poate obține prin tuse profundă. La nesfumători, atunci când există dificultăți în obținerea spontană a sputei, aceasta se poate induce prin inhalarea unei soluții aerosolizate preîncălzită (de ex. soluție salină izotonică). Pentru o mai bună depistare a tumorilor pulmonare, se recomandă prelucrarea a 3 probe de spută succesiv recoltate dimineața la prima oră.

Sputa este produsul cel mai ușor de obținut, iar citodiagnosticul din spută este testul inițial pentru evaluarea leziunilor pulmonare, mai ales pentru cele localizate central și care prezintă suspiciunea clinică de degenerare malignă; de asemenea, sputa este folosită și pentru depistarea infecțiilor cu diverse microorganismе, mai ales la pacienții imunocompromiși.

Dezavantajele citodiagnosticului din spută includ imposibilitatea localizării leziunilor și sensibilitatea scăzută în depistarea microorganismelor.

~ Periajul și lavajul bronhic

Probele citologice de la nivelul bronhiilor sunt obținute după introducerea unui bronhoscop cu fibre optice care permite recoltarea direct de la nivelul leziunilor dezvoltate la nivelul mucoasei bronhice ajungând până la nivelul bronhiilor segmentare.

Produsul de periaj bronhic poate fi etalat direct pe lame de sticlă și apoi fixat uscat sau umed; produsul de lavaj este recoltat după instilarea a 3-5 ml de soluție salină izotonică. Acesta din urmă poate fi centrifugat, filtrat sau prelucrat cu ajutorul metodelor de citologie lichidă în monostrat.

— Lavajul bronhoalveolar (BAL)

În anii 1980 și 1990 au fost introduse în practica de rutină metodele de lavaj bronhoalveolar pentru evaluarea leziunilor periferice (alveolare) ale plămânilor. Lavajul bronhoalveolar este realizat în cursul unei endoscopii efectuată după metoda clasică și constă în instilarea, prin intermediul bronhoscopului introdus până la nivelul unei bronhii segmentare sau subsegmentare, a 150-300 ml de soluție salină izotonică sterilă (încălzită în prealabil la 37°C) fragmentată în părți de 20-60 ml, urmată de recoltarea produsului după fiecare instilație prin aspirație blândă fie cu o seringă, fie cu un aspirator. Este preferabil, atunci când este posibil, realizarea unui lavaj abundent deoarece acesta reprezintă mai bine caracteristicile biologice ale teritoriului explorat, iar procentul de lichid recuperat prin aspirație variază între 40-70% din lichidul instilat.

După aspirație, se notează volumul de lichid recuperat și aspectul macroscopic al acestuia (clar, gălbui, brun, hemoragic, lactescen). În funcție de acest volum se poate aprecia calitatea lavajului bronhoalveolar și caracterul său interpretabil sau nu: un volum mai mic de 25-50 ml este puțin reprezentativ pentru teritoriile alveolare și în acest caz lavajul trebuie interpretat cu prudență.

Lavajul bronhoalveolar este testul cel mai indicat pentru depistarea citologică a agenților infecțioși la pacienții imunocompromiși (putându-se realiza și culturi sau alte teste microbiologice); el este de asemenea util în evaluarea pneumonocitozelor (mai ales a azbestozei), a bolilor pulmonare induse de medicamente și a leziunilor maligne (în special carcinomul bronhioloalveolar);

— Puncția aspirativă transcutanată a revoluționat citologia respiratorie în statele unite ale americii în ultima parte a secolului XX. Ea este folosită în special în evaluarea leziunilor pulmonare periferice, având indicație atunci când sputa sau produsele de lavaj și / sau periaj bronhic nu oferă o informație diagnostică satisfăcătoare.

Deși această metodă a fost introdusă inițial pentru evaluarea leziunilor potențial maligne, multe afecțiuni benigne, infecții sau procese reactive se pot depista prin puncție aspirativă transcutanată.

Procedul are mortalitate și morbiditate mult mai reduse comparativ cu biopsia pulmonară deschisă, la 7% din pacienții care fac pneumotorax se impune rareori introducerea unui tub de dren, iar hemoptizia minimă care poate să apară nu are semnificație clinică.

Puncția este contraindicată la pacienții necooperanți, pacienții cu tuse necontrolabilă, emfizem sever, hipertensiune pulmonară, leziuni vasculare suspecte, diateze hemoragice, chiste echinococice sau la pacienții aflați sub tratament cu anticoagulante.

~ Puncția aspirativă transbronhică (WANG-FNA) se folosește în cazul leziunilor aflate în vecinătatea mucoasei bronhice, dar care nu o interesează direct.

Puncția se realizează cu ajutorul unui ac flexibil (ac Wang) introdus prin bronhoscop care penetrează peretele bronhic și prin care se aspiră.

Altă metodă oarecum legată de aceasta este puncția aspirativă cu ac fin transesofagiană ghidată ecografic care se poate folosi pentru evaluarea leziunilor paratracheale, perihilare și / sau mediastinale.

Metode de prelucrare:

a. Metoda "alege și întinde"

Produsele obținute prin una din metodele de mai sus pot fi prelucrate direct, nefixate, sau după fixare prealabilă.

I. Prelucrarea probelor proaspete, nefixate obținute din tractul respirator

Înainte de a începe prelucrarea propriu-zisă se recomandă examinarea probei într-o cameră specială sterilă, bine iluminată, unde se lasă o jumătate de oră înainte de examinare (examinatorul trebuie să poarte haine de protecție, mănuși și mască). Dacă proba a fost congelată în prealabil, trebuie adusă la temperatura camerei. Între timp, se pregătesc patru frotiuri pe care se notează numărul de indentificare al pacientului.

Examinarea trebuie făcută cu foarte mare atenție; această etapă poate necesita transferul probei într-o cutie Petri care se așează pe un fond întunecat pentru vizualizarea ariilor suspecte. Se notează prezența eventualelor zone hemoragice, zone decolorate sau fragmente tisulare și din acestea se întind frotiuri cât mai subțiri. Se poate adăuga o picătură de soluție Hank sau apă distilată pentru ca produsul să nu se usuce și să se întindă pe lama de sticlă cât mai uniform. După aceasta, frotiurile se fixează în etanol 95%, 15 - 30 minute, și se colorează prin metoda Papanicolaou.

II. Prelucrarea probelor tractului respirator recoltate într-o soluție de fixare

În general, pentru fixarea tunurilor probelor se folosește alcoolul etilic 50% sau 70%, în proporții egale (o parte probă, o parte fixator). Acești fixează celulele, lizează hematii, oprește autoliza și împiedică dezvoltarea microorganismelor.

Dezavantajul recoltării pe fixator este acela că celulele se micșorează, produsul se întărește, nu mai aderă la lama de sticlă și este dificilă obținerea unui frotiu cât mai subțire. De aceea, se folosesc lame de sticlă pretratate cu albumină (lame prealbuminizate) care sunt păstrate într-un spațiu acoperit înainte de folosire.

Prelucrarea se face la fel ca pentru probele nefixate, cu deosebirea că pentru întinderea frotiurilor se utilizează lame prealbuminizate.

b. Metoda de concentrare Saccomanno

Metoda Saccomanno constă în omogenizarea probei înainte de întinderea produsului pe lama de sticlă, cu reducerea cantității de mucus și concentrarea celulelor.

Tehnica:

se lasă proba într-o cameră specială sterilă timp de o jumătate de oră,

se adaugă un amestec fixator format din Carbowax (polietilen glicol) 2% și etanol 50% la o cantitate dublă de probă, dacă

produsul este în cantitate foarte mică, se adaugă Carbowax până se obțin 30 ml,

se omogenizează bine și se lasă la fixat în acest amestec până la o oră, în camera sterilă,

se pune amestecul într-un agitator electric și se agită o perioadă de timp variabilă în funcție de tipul de produs:

apoi - 2 secunde la viteză mică sau 6 secunde la viteză mare.

seminuoid - 2 secunde la viteză mică sau 8 secunde la viteză mare,
mucoid - 2 secunde la viteză mică sau 10 - 30 secunde la viteză mare.

se împarte proba în două părți egale care se pun în două sau mai multe eprubete conice a câte 15 ml și se centrifughează la 1500rpm timp de 5 minute,

se aruncă supernatantul (se lasă 2 ml de supernatant să acopere sedimentul), se omogenizează supernatantul rămas împreună cu sedimentul,

cu ajutorul unei pipete Pasteur, se ia câte o picătură de sediment, se pune pe o lamă de sticlă și se întinde în strat cât mai subțire, frotiurile se fixează și apoi se colorează corespunzător metodei de fixare aleasă.

Se recomandă ca frotiurile obținute din spută să fie colorate cu hematoxilina Gill-jumătate oxidată și soluții OG și EA modificate astfel:

- fixare în alcool 95%,
- îndepărtarea Carbowax în alcool 95%,
- spălare în apă de robinet - 2 băi, câte 10 scufundări în fiecare, colorare cu hematoxilina Gill-jumătate oxidată - 1 minut,
- spălare în apă de robinet - 2 băi, câte 10 scufundări în fiecare, spălare cu substituent Scott - 2 minute,
- spălare cu apă de robinet - 2 băi, câte 10 scufundări în fiecare, etanol 95% - 10 scufundări,
- colorare cu OG modificat - 2 minute,
- etanol 95% - 2 băi, câte 10 scufundări în fiecare,
- colorare cu amestec EA modificat - 10 minute,
- etanol 95% - 3 băi, câte 10 scufundări în fiecare,
- etanol absolut - 2 băi, câte 10 scufundări în fiecare,
- clarificare în xilen - 3 băi,
- montare.

Se poate întâmpla ca în sputa obținută de la pacienți cu istoric de expunere la azbest, prelucrată prin aceste metode, să nu fie depistați corpii feruginoși, de ceea se recomandă concentrarea ei cu ajutorul membranelor filtrante. În acest caz, frotiurile trebuie colorate cu albastru de Prusia pentru evidențierea corespunzătoare a corpiilor feruginoși.

V. PUNCȚIA ASPIRATIVĂ CU AC FIN (FNA)

Pentru precizarea diagnosticului formațiunilor tumorale solide sau chistice localizate în diferite organe parenchimatose sau fesături moi se utilizează o metodă rapidă, ieftină, repetabilă și bine tolerată de pacienți numită *puncție aspirativă cu ac fin* ("fine needle aspiration" - FNA). Aceasta reprezintă un domeniu important pentru citodiagnostic și cunoaște în prezent o continuă dezvoltare.

Puncția constă în introducerea unui ac fin la nivelul țesutului ce prezintă interes urmată de aspirarea materialului pentru examen citologic. Ea se poate efectua atât în cazul leziunilor palpabile (metoda clasică), cât și pentru leziunile nepalpabile

(sub ghidaj ecografic sau endoscopic). Localizările cele mai frecvente ale leziunilor palpabile la nivelul cărora se poate efectua puncția cu ac fin sunt reprezentate de glanda mamară, glanda tiroidă, ficat, oase, țesuturi moi și limfoganglionii.

Folosirea metodei de aspirație cu ac fin pentru diagnosticul tumorilor a fost atribuită lui Martin & Ellis (Martin HE, Ellis EB, 1930) care au publicat studiul lor privind această metodă, în 1930. Ulterior, și alți autori au descris puncția aspirativă cu ac fin, însă această metodă a întâmpinat rezistență din mai multe motive, unul din acestea fiind reprezentat de probabilitatea diseminării tumorale prin această manevră.

Începând din 1974, a crescut interesul pentru această metodă în primul rând datorită costului redus și a scăderii numărului zitelor de spitalizare. Un alt raționament pentru reintroducerea acestei metode în scop diagnostic a fost înțelegerea mai bună a biologiei tumorilor maligne.

În literatură au fost folosiți mai mulți termeni pentru această metodă, și anume: citologie prin aspirație cu ac fin (*fine needle aspiration cytology*), biopsie prin aspirație cu ac fin (*fine needle aspiration biopsy*), biopsie cu ac fin (*fine needle biopsy*), biopsie prin aspirație cu ac (*needle aspiration biopsy*), biopsie de aspirație (*aspiration biopsy*), citologie prin biopsie de aspirație (*aspiration biopsy cytology*) etc. Totuși, termenul cel mai corect și cel mai des folosit este *puncție aspirativă cu ac fin* (*fine needle aspiration*) deoarece include atât dimensiunea acului (ac fin) cât și tehnica (aspirație); astfel nu se poate confunda cu puncția biopsie.

Avantajele acestei tehnici sunt costul mic, simplitatea manevrei de execuție, complicațiile reduse fără a cauza leziuni la nivelul țesutului adiacent.

Puncția aspirativă poate fi dezavantajoasă atunci când, mostra obținută este mică și nereprezentativă pentru întreaga tumoră sau atunci când nu interceptează structura tisulară neoplazică. Pentru a evita acest lucru este nevoie ca puncția să fie realizată de un chirurg cu experiență în domeniu, conștient de semnificația gestului chirurgical.

Principii generale

Principiul de bază al puncției aspirative cu ac fin este acela că ea poate fi aplicată numai în cazul unei mase tumorale palpabile sau al unei care a fost depistată mamografic (sau prin altă metodă similară). Nu se folosește pentru diagnosticul modificărilor mamară nespecifice sau ca metodă de screening pentru o glandă mamară clinic normală.

Corelarea examenului obiectiv cu manografia și cu puncția aspirativă cu ac fin conduce la o acuratețe a diagnosticului de 100%.

Sensibilitatea metodei variază între 65 - 82%, iar specificitatea este de asemenea mare, până la 100% (între 98 - 100%). De aceea, un rezultat negativ pentru boala malignă neoplazică suspectă clinic și paraclinic nu exclude tumora impunând fie repetarea puncției fie folosirea altor metode biopice.

Procentul rezultatelor fals negative variază între 2 % și 10%, corelându-se atât cu volumul tumorii cât și cu prezența frothurilor paucicelulare. Cu cât tumora este mai mică, cu atât posibilitatea rătăirii aspiratului este mai mare. În cazul tumorilor mari, rezultatele negative se pot datora necrozei centrale sau edemului periferic. Formațiunile situate profund constituie, de asemenea, un element de dificultate diagnostică.

Tehnica puncției aspirative cu ac fin

FNA este o investigație cu caracter minim invaziv.

Prima etapă a puncției o reprezintă așa numitul "timp clinic" în care, prin examenul obiectiv, se identifică și se localizează masa tumorală. Metoda poate fi efectuată atât de chirurg cât și de anatomopatolog, în secția de chirurgie sau în ambulatoriul de specialitate, este mai puțin dureroasă comparativ cu o puncție venoasă și nu necesită anestezie locală. Unii medici preferă, însă, efectuarea anesteziei locale cu 1 ml lidocaină 1%, la nivelul tegumentului supraajacent formațiunii tumorale. Totuși, aceasta are două dezavantaje:

- injectarea unei cantități prea mari de anestezic sau dacă formarea unui hematom local vor masca tumora reducând astfel probabilitatea unei puncții reușite,

- apariția anafilaxiei.

Puncția este precedată de dezinfecția locală a tegumentului cu soluție de alcool 70% sau iod. Echipamentul necesar este simplu: o seringă de 10 ml sau 20 ml și ac fin, cu diametrul exterior mai mic de 1 mm, bine ajustat. De obicei se folosesc ace cu diametrul de 19 G, 20 G sau 22 G (0,57 mm), care se atașează unei seringi de 20 ml, această seringă poate fi manipulată cu ajutorul unui dispozitiv port-seringă (Comeco-Seringe Pistol) care permite medicului să efectuează puncția să controleze seringa și acul cu o mână, iar cu cealaltă să susțină formațiunea tumorală.

Seringa și acul pot fi spălate înainte de folosire cu o soluție salină ce conține heparină (1/10). Avanzajul este dublu: prelevat mai abundent și posibilitatea menținerii aspiratului în seringă câteva minute.

Înainte de atașarea acului la seringă, unii preferă să aspire în această 5cc aer folosiți apoi pentru expulzarea conținutului acului pe lame de sticlă fără detașarea seringii de ac după efectuarea puncției. După atașarea acului la seringă, se susține tumora cu o mână în poziție fixă, iar cu cealaltă se puncționează printr-o lovitură scurtă, apăsându-se în același timp și consistența formațiunii tumorale. Apoi se efectuează mișcări de aspirație în seringă prin deplasarea pistonului sus-jos, în timp ce acul și se imprimă câteva mișcări de "da-te-vino" și de rotație. Se fac apoi noi prelevări în "spățe de roată" (puncție radială) plecând din același punct central de la nivelul tegumentului. Acul se retrage când materialul aspirat se observă la vârful seringii; principiul este umplerea acului cu celule, nu a seringii (un ac poate conține mai mult de 100 000 de celule ceea ce este suficient pentru un diagnostic citologic). Etapa următoare constă în exprimarea conținutului acului pe una sau mai multe lame de sticlă, se are în vedere ca vârful acului să atingă lama, evitându-se astfel uscarea în aer a produsului aspirat. Picăturile de produs aspirat sunt apoi etariate rapid, uniform, în strat cât mai subțire, cu ajutorul altei lame, printr-un proces blând de strivire. Cu cât se obțin mai multe frothuri, cu atât acuratețea diagnosticului este mai mare.

Când produsul aspirat este în cantitate mare, se recomandă ca o parte să fie prelevat sub forma biocurilor celulare prin includere la parafină. De asemenea, se recomandă ca o parte din frothuri să fie păstrate și fixate corespunzător pentru teste imunocitochimice suplimentare.

Dacă s-a puncționat o formațiune chistică, lichidul aspirat se prelevează ca oricare altă probă lichidiană, notându-se cantitatea, culoarea și consistența acestuia.

Aprecierea calității prelevatului (celularitate) se face imediat, la locul unde s-a efectuat puncția, prin examinarea la microscop a unui sau două frotiuri colorate extemporane. Rezultatele cele mai bune se obțin atunci când există o colaborare strânsă între chirurg și anatomopatolog și când puncția se efectuează în prezența anatomopatologului care poate aprecia adecvabilitatea aspiratului prin colorația extemporaneu cu Hematoxilina-Eozină. În cabinetul de specialitate din ambulatoriu trebuie să existe o trușă cu coloranți, alcooluri, xilen și recipiente corespunzătoare unei astfel de colorații. Se examinează frotiurile la microscop, iar în cazul în care examenul apreciază că celularitatea este insuficientă pentru citodiagnostic, puncția se repetă imediat fără ca pacientul (pacienta) să fie rechemat ulterior la medic. Nu se folosește altă colorație extemporaneu deoarece pe frotiurile colorate cu hematoxilina-eozină anatomopatologul poate sugera și un diagnostic citologic orientativ.

Produsul aspirat poate fi prebucrat fie sub forma frotiurilor directe, fie sub forma suspensiilor celulare. Frotiurilor directe sunt fixate uscat sau umed și colorate corespunzător metodei de fixare aleasă.

De asemenea, este foarte important ca frotiurile să fie însoțite de un bilet de trimitere care să cuprindă atât date de identificare ale pacientului (pacientei), cât și informații clinice: vârsta, rezultatul mamografiei sau al ecografiei, tratamente instituite anterior, etc.

Realizarea tehnicii poate fi marcată de anumite dificultăți, și anume:

- delimitarea formațiunii tumorale prin palpate improprie și fixarea digitală inadecvată,
- dimensiuni mici ale tumorii sau dispunerea profundă a acesteia,
- mișcări insuficiente ale acului în masa lezională,
- presiune negativă inadecvată,
- deficiențe în prepararea frotiurilor.

Complicații

Principalul risc al puncției aspirative cu ac fin constă în posibilitatea implantării celulelor tumorale pe traiectul acului de puncție, mai ales în cazul tumorilor osoase. Acest risc este influențat în primul rând de grosimea acului, putând să apară în cazul folosirii acelor de 12 G sau 16 G (de obicei folosite pentru puncția biopsie). Toți, acest incident este extrem de rar și poate fi evitat prin localizarea traectului aștrii. Încă acesta să poată fi excizat cu ușurință în momentul intervenției chirurgicale definitive.

Alte complicații sunt reprezentate de:

- mastită și hematoame (la nivelul glandei mamare); hematoamele pot determina apariția rezultatelor fals pozitive, de aceea se recomandă ca mamografia să fie efectuată înaintea puncției, fie la două săptămâni după aceasta.
- pneumotorax (în cazul puncției aspirative cu ac fin la nivelul glandei mamare, a ganglionilor axilari sau supraclaviculari).

VI. PUNȚIE FINĂ ASPIRATIVĂ ECOGHI DATĂ ENDOSCOPIC (EUS-FNA)

Deși ecografia endoscopică (*Endoscopic Ultrasound - EUS*) este o metodă utilă pentru stadializarea neoplasmelor maligne gastrointestinale, totuși ea singură nu poate fi folosită pentru diferențierea leziunilor benigne de cele maligne.

În ultimii ani, tehnologia avansată a permis performanța efectuării puncției fine aspirative sub ghidajul ecografiei endoscopice (EUS-FNA). Posibilitatea obținerii materialului citologic sub vizualizare directă a îmbunătățit utilitatea diagnostică a EUS, a lărgit câmpul de diagnostic și a adăugat o nouă dimensiune la posibilitățile EUS deoarece oferă o oportunitate pentru un diagnostic prompt și corect și permite caracterizarea leziunii, realizând astfel triajul pacienților pentru un management mai eficient.

EUS-FNA este o metodă simplă, sigură și sensibilă care permite diagnosticul specific și corect al leziunilor cu localizare profundă la nivelul abdomenului și/sau toracei. Probele pot fi obținute eficient din leziunile mici (< 2,5 mm), indiferent de organ. De asemenea, oferă clinicienilor diagnosticul citologic al acestor leziuni vizualizate prin EUS, putând ghida intervenția terapeutică specifică bolii respective. Ea devine o metodă importantă pentru managementul cancerului pulmonar și al altor boli mediastinale, ca și pentru diagnosticul și stadializarea leziunilor benigne și maligne ale abdomenului și pelvisului.

EUS-FNA este mai puțin costisitoare, mai puțin riscantă și mai puțin invazivă pentru managementul clinic în majoritatea cazurilor în care poate fi aplicată și a devenit în ultimul timp o metodă din ce în ce mai mult folosită.

Indicațiile EUS-FNA:

A. Indicații principale:

- tumori pancreatice (< 2 cm),
 - tumori care determină compresivitatea extrinsecă a peretelui gastric,
 - leziunile mici ale lobului stâng hepatic,
 - tumori recidivate (gura de anastomoză),
 - limfoganglionii celiaci (< 3 cm),
 - tumori și limfoganglioni mediastinali.
- #### B. Alte indicații:
- tumori submucoase,
 - pluri gastrice intense hipertrofiate cu biopsii endoscopice negative.

Contraindicații relative:

- leziuni mai mici de 5 mm,
- leziuni la distanță mai mare de 6 - 7 cm de probă,
- tulburări de coagulare a sîngelui (timp de protrombină mai mic de 60%, nr. de trombocite mai mic de 80 000 /mm³).

Conform datelor din literatură, se consideră că metoda puncției fine aspirative ghidată ecoendoscopic are o sensibilitate de 76 - 91%, o specificitate de 84 - 100% și o acuratețe de 78 - 94%.

Considerații tehnice

Pentru efectuarea puncției fine aspirative ghidate ecendoscopic se folosesc ace de diferite lungimi și calibru: 5 cm/ 25; 5 cm/ 22; 6 cm/ 22 ac tip-eco (ajustabil). Cea mai frecventă problemă legată de toate aceste prototipuri de ace a fost riscul de perforație al canalului operațional. Din acest motiv, în ultimul timp sunt disponibile 2 tipuri de ace care nu prezintă nici un risc: acul Vilmann-Flancke și acul Wilson-Cook, ambele prezentând un înveliș teflonat confecționat parțial din metal. Materialul celular poate fi obținut efectiv din leziunile mici (sub 2 mm), din orice organ.

Pentru puncția fină-aspirativă, se folosește de rutină un ac cu diametrul de 25 pentru majoritatea leziunilor, cu ajutorul cărui se obține material celular suficient, iar cantitatea de sânge conținută de acesta este mai mică.

Când se dorește obținerea de fragmente tisulare (când sunt suspectate tumori stromale), se folosește un ac de 19 cu ajutorul cărui se obține o cantitate mai mare de material celular. De asemenea, acele de 19 și 22 sunt preferate pentru aspirarea colecțiilor lichidiene și a limfoganglionilor mediastinali cu scleroză.

Numărul de pasaje

În general, numărul de pasaje necesar pentru obținerea unei cantități corespunzătoare de material celular depinde atât de experiența clinicianului, cât și de prezența sau absența citopatologului în momentul puncției. Dacă citopatologul nu este prezent, doar structura organului aspirat (masă tumorală vs. metastază ganglionară sau hepatică) este cea care determină direct numărul de pasaje (sensibilitate 80% și specificitate 100%):

- 5-7 pasaje pentru masele pancreatice și alte leziuni;
 - 3-5 pasaje pentru limfoganglionii;
 - 2-3 pasaje pentru metastazele hepatice.
- Interpretarea citologică necesită o bună comunicare între gastroenterolog și citopatolog. Pe de o parte, datele clinice și imagistice sunt esențiale pentru diagnosticul citologic fină, iar pe de altă parte, citopatologul este cel care stabilește când puncția a fost corect făcută.

Acuratețea EUS-FNA depinde foarte mult de evaluarea imediată a frotiurilor. Acest lucru optimizează acuratețea diagnostică și minimizează frecvența frotiurilor inadecvate. Interpretarea rapidă a frotiurilor determină creșterea sensibilității metodei până la 90% și a specificității și PPV până la 100%. Totuși, acest lucru necesită o instruire specială și poate necesita o perioadă mai mare de timp. Un diagnostic preliminar are rolul de a ghida investigația clinică sau tratamentul, precum și de a determina necesitatea efectuării unor teste adiționale (flow-cytometrie, determinări genetice) pentru un diagnostic mai specific și cu o acuratețe mai mare.

Metodă de prelucrare al materialului aspirat:

1. Etalarea pe lama de sticlă a materialului aspirat (4 - 6 pasaje, cel puțin câte 1 frotiu/pentru fiecare colorație/pasaj);
2. Fixarea frotiurilor prin uscare (pentru colorația rapidă MGG) / fixare uscadă (pentru colorația Papanicolaou);
3. Colorarea frotiurilor prin metoda MGG sau Papanicolaou;

4. Produsul rămas după etalarea frotiurilor împreună cu cel obținut prin spălarea acului de puncție cu alcool etilic absolut este utilizat pentru realizarea blocurilor celulare (centrifugare în alcool etilic umedă de fixare în formol 10% până a doua zi și prelucrare prin metoda clasică a includerii la parafină);

5. Secționarea blocurilor celulare - colorații uzuale (H-E, PAS) și speciale (imunocitochimie);

6. Efectuarea de teste suplimentare (testare ADN, flow-cytometrie, culturi pentru agenți infecțioși, etc.).

Eficiența EUS-FNA

Cea mai importantă întrebare este dacă efectuarea EUS-FNA va modifica decizia diagnostică și atitudinea terapeutică. În multe cazuri, nu este întotdeauna posibilă o confirmare tisulară a naturii unei tumori prin biopsie și de aceea diagnosticul citologic obținut prin EUS-FNA va oferi documentația necesară pentru neoplasmele maligne nerezeccabile sau metastatice sau dovada unei leziuni benigne cu localizare profundă care nu necesită o intervenție chirurgicală ulterioară. În asemenea cazuri, citologia va fi singura confirmare tisulară disponibilă.

Cele mai bune rezultate obținute au fost pentru limfoganglionii, tumorile pancreatice, recidivele apărute pe anastomoză și în cazul tumorilor care determină compresione extrinsecă la nivelul peretei tubului digestiv.

Metoda s-a dovedit a fi mai eficientă pentru leziunile pancreatice solide mai mici de 4 cm (tumorile mari conțin o cantitate mai mare de fibroză și/sau necroză ceea ce duce la obținerea unei cantități mai mici de material celular pentru citodiagnostic). În plus, abordarea transgastrică sau transduodenală scade riscul diseminărilor la distanță, iar în cazul tumorilor de cap de pancreas locul unde s-a efectuat puncția va fi excizat în timpul procedurii Whipple.

Confirmarea unei recidive la locul de anastomoză (în special în cazul cancerelor colorectale) implică adesea o abordare terapeutică mai agresivă, abordare care, în cazul cancerelor esofagian și gastric nu trebuie efectuată fără o confirmare cito/histopatologică.

Pentru masele pancreatice solide, impactul EUS în decizia terapeutică este bine stabilit în literatură. Totuși, asocierea FNA este foarte importantă în confirmarea diagnosticului de cancer pancreatic, fie primar, fie metastatic, pentru acele tumori care nu au fost diagnosticate cu metodele convenționale (CT, RMN).

Utilitatea EUS-FNA în evaluarea neoplasmelor diferitelor organe interne

A. Tumorile pancreatice

Scopul puncției fine aspirative ghidată ecendoscopic în cazul tumorilor pancreatice este diagnosticarea inițială a unui neoplasm cu suspiciune clinică de malignitate, pentru evitarea unei intervenții chirurgicale inutile, confirmarea malignității înainte intervenției chirurgicale cu intenție curativă sau pentru inițierea chimioterapiei adjuvante; stadializarea neoplasmelor maligne.

Diagnosticele diferențiale al tumorilor pancreatice chistice

Markeri IHC	PEN	Carcinom cu celule acinare	Carcinom papilar mucinos	IPMT
<i>Vimentină</i>	+	(20%)	-	-
<i>Sinaptofizina</i>	+	-	-	-
<i>Cromogranina</i>	+	-	-	-
<i>Citocheratine</i>	+	(60-80%)	+	+
<i>α1-ACT (antichimotripsină)</i>	-	+	-	-
<i>α1-AT (antitripsină)</i>	-	+	-	-
<i>Lipază</i>	-	+	-	-
<i>β catenina</i>	+	+	-	-

B. Tumorile tractului gastrointestinal

În cazul tumorilor tractului gastrointestinal, puncția fină aspirativă ghidată ecoendoscopic se utilizează pentru evaluarea leziunilor submucoase, permițând:

- vizualizare directă a suprafeței mucoasei și acuratețe în evaluarea dimensiunii și extinderii leziunii submucoase;
- stadializarea TNM a neoplasmelor maligne ale tractului GI, incluzând pe cel de esofag, stomac, tumorile perianulare, colorectale și ale canalului anal;
- evaluarea răspunsului terapeutic al limfoamelor gastrice;
- stadializarea și managementul carcinomului rectal;
- diagnosticarea bolii recidivate (acuratețe de 100% la pacienții cu carcinom rectal recidivat).

Tumorile intramurale care pot fi diagnosticate prin EUS-FNA sunt:

- tumorile stromale gastrointestinale (GIST);
- tumorile de mușchi neted;
- carcinomul cu celule „în mel cu pecete”;
- gastroenterita eozinofilică;
- pancreasul heterotopic; chistele congenitale;
- tumora cu celule granulare și schwannomul; tumori neuroendocrine;
- limfoamele.

Întrucât aspectul citologic în cazul tumorilor mezenchimale ale tubului digestiv poate fi foarte asemănător între tipuri diferite de tumori și terapia ulterioară este diferită, diferențierea GIST de alte tumori cu celule fusiforme (tumori de mușchi neted sau tumora fibroasă solitară) este foarte importantă. Acest lucru este posibil numai prin examen imunohistochimic efectuat în special pe secțiuni din blocuri

Pentru leziunile pancreatice solide, efectuarea EUS-FNA are rol în obținerea materialului celular pentru:

- diferențierea adenocarcinomului pancreatic de leziunile care îl pot mima (atipia ductală din pancreatită, neoplasmale mucinoase chistice);
- diferențierea tumorilor endocrine de leziunile care le pot mima: pancreatita cronică, tumora solidă pseudopapilară, carcinomul cu celule acinare, prin imunomarcaj specific (AE1/AE3, CK 7, CK 20, CEA, CA19-9).

După majoritatea autorilor, sensibilitatea acestei metode în evaluarea tumorilor pancreatice este cuprinsă între 84 - 93%, iar specificitatea este de 100%.

Evaluarea leziunilor pancreatice chistice reprezintă o provocare atât pentru endoscopist, cât și pentru radiolog și anatomopatolog. După cum se știe, acestea se clasifică în tumori pseudochistice și tumori chistice (adevărate sau tumori cu modificări degenerative chistice). Cele mai frecvente sunt tumorile mucinoase papilare intrachistice (IPMT), adenocarcinomul ductal cu degenerare chistică, chistadenomul seros și neoplasmale mucinoase chistice (MCN).

MCN și IPMT beneficiază de rezecție chirurgicală. În schimb, leziunile chistice nonmucinoase (incluzând chistadenomele seroase și pseudochistele) sunt rezecate numai dacă sunt simptomatice, determină complicații sau când un diagnostic definitiv nu poate fi obținut fără intervenție chirurgicală. De aceea, este necesară o mare acuratețe diagnostică pentru a diferenția tumorile mucinoase de leziunile chistice nonmucinoase.

Uneori, natura leziunilor chistice (seroase sau mucinoase; chist adevărat/pseudochist; benigne / maligne - tumora papilară mucinoasă intraductală / ADK invaziv) nu poate fi stabilită cu certitudine pe baza caracteristicilor citologice. De aceea, DOAR examenul citologic este insuficient pentru analiza leziunilor chistice pancreatice, fiind necesare colorații speciale (colorația PAS), teste suplimentare din fluidul chistic: valoarea antigenului carcinoembrionar (CEA), amilaza chistică, valoarea antigenului CA 19-9, precum și imunomarcajul cu diverse tipuri de antigene anti-mucine: MUC5AC, MUC1, MUC2 (*pattern-ul expresiei antigenelor MUC poate oferi o informație utilă pentru stabilirea potențialului invaziv al unei leziuni mucinoase chistice*). Imunomarcajul se poate efectua atât pe froțuri, cât și pe secțiuni provenite din blocuri celulare, cele mai bune rezultate fiind obținute totuși prin folosirea materialului celular inclus la parafină (blocuri celulare).

Tumorile pancreatice metastatice sau diseminat pot proveni din aproape orice organ și interesează predominant capul și corpul pancreasului (cele mai frecvente localizări primare sunt plămânul, rinichiul și sânul; în 16% din cazuri melanomul malign).

EUS-FNA permite diferențierea dintre metastaze și tumorile pancreatice primare, prin efectuarea blocurilor celulare și imunomarcaj cu anticorpi specifici pentru diferitele forme de celule.

celulare, folosindu-se următorul panel de anticorpi: citokeratinele AE1/AE3; c-Kit (CD117); CD34; actina specifică mușchiului neted; S 100 (figurile 11.10, 11.11, 11.12 și 11.13).

C. Adenopatiile intraabdominale și mediastinale

Multe studii au arătat importanța efectuării EUS-FNA în cazul limfadenopatiilor intraabdominale și mediastinale, în special în: stadializarea neoplasmelor maligne de la nivelul plămânilor, tractului

gastrointestinal și pancreasului (de ex., în cazul cancerului pulmonar, metastaza evidențiată prin puncție fină aspirativă ecoghidată în ganglionul contralateral sau invazia directă în mediastin reprezentată stadiul III B și acest rezultat poate exclude un pacient de la intervenția chirurgicală); diagnosticul limfonului malign - în cazul adenopatiilor profund situate;

evaluarea limfadenopatiilor apărute după tratamentul oncologic (chimioterapie, radioterapie sau ambele).

EUS-FNA prezintă o mai bună sensibilitate și specificitate (90% și, respectiv, 100%) în evaluarea limfadenopatiei față de ecoendoscopia simplă, evitând necesitatea unor teste suplimentare mai invazive sau intervenția chirurgicală.

Erorile care pot apărea în cazul acestor tehnici sunt reprezentate de: rezultat fals pozitiv atunci când acul de puncție trece printr-o zonă cu displazie de grad înalt de la nivelul mucoasei tractului gastrointestinal; contaminarea acului cu celule glandulare normale sau reactive.

Aspecte tehnice

Unele studii au arătat că tehnica folosită pentru puncția ganglionară influențează celularitatea materialului aspirat.

Wallace și colaboratorii (2001) au arătat că folosirea aspirației comparativ cu puncția fără aspirație crește celularitatea probei dar aceasta va conține o cantitate mai mare de sânge - totuși, nu influențează prea mult posibilitatea obținerii unui diagnostic corect, după cum nu influențează nici localizarea ganglionului, puncția în marginea sau în centrul ganglionului. Tot ei au arătat că materialul celular a fost obținut din primele 3 pasaje. Deci, se recomandă ca în timpul EUS-FNA să se efectueze până la 3 pasaje, fără aspirație, în ganglionii cu dimensiunea cea mai mare.

D. Tumorile hepatice

Puncția fină aspirativă ghidată ecoendoscopic la nivelul leziunilor hepatice este o metodă sigură și sensibilă cu impact semnificativ asupra managementului pacientului.

Sensibilitatea ei pentru diagnosticul de malignitate al leziunilor hepatice variază între 82 - 94%. Prin EUS se pot identifica leziunile hepatice de 5 mm sau chiar mai mici, putându-se astfel modifica managementul pacientului în până la 86% din cazuri.

Astfel, se pot identifica: leziuni benigne (noduli de regenerare, adenomul hepatocelular, hiperplazia nodulară focală); leziuni maligne - carcinomul hepatocelular (HCC - cea mai frecventă neoplazie malignă hepatică). Diagnosticul de HCC poate fi pus în general prin EUS-FNA fără dificultate, iar tratamentul poate fi inițiat pe baza rezultatului citologic; metastaze hepatice: adenocarcinoame cu

originea în diferite organe, melanomul malign, carcinomul cu celule mici și tumorile neuroendocrine.

Din materialul celular aspirat se pot obține frotiuri care se colorează prin colorația MGG sau Papanicolaou, sau se pot efectua blocuri celulare foarte utile pentru efectuarea testelor imunohistochemice suplimentare importante în stabilirea originii celulelor maligne.

E. Tumorile arborelui biliar și veziculei biliare

Ecografia endoscopică este o alternativă mai bună și mai ușor de efectuat față de colangiopancreatografia endoscopică retrogradă (ERCP) și este din ce în ce mai mult folosită în evaluarea inițială a arborelui biliar.

Erickson și Garza (2001) au arătat că efectuarea EUS-FNA ca metodă diagnostică inițială pentru evaluarea icterului obstructiv înlătură necesitatea efectuării ERCP la aproximativ 50% din pacienți. De asemenea, ei au arătat că EUS-FNA s-a dovedit a fi utilă, conducând la un diagnostic final de malignitate, la cazurile în care periajul ductelor biliare ghidat prin ERCP a fost neconcludent (în caz de stricțiuni ale tractului biliar prin compresune extrinsecă).

Datele din literatură sunt insuficiente în ceea ce privește rezultatele obținute prin EUS-FNA în evaluarea neoplasmelor maligne ale veziculei biliare (la fel și în cazul splinei).

Markeri imunohistochimici utilizați în diferențierea tumorilor hepatice primitive de cele metastatice

Markeri IHC	HCC	Colangiocarcinom	ADK metastatic
CEA	+ (canalicular)	+ (citoplasmatic)	+ (citoplasmatic)
AE1/AE3	+/- (de obicei negativ)	+	+
CK 7	-	+	+ (gl. mamară, plămân, pancreas, ovar, endometru)
CK 20	-	+ (în 80% din tumorile nonperiferice și 50% din cele periferice)	+
EMA	-	+	+
TTF-1	-	-	+ (plămân, tiroidă)
Agg asociate mucinelor	-	+ (variabil)	+ (variabil)
AFP	+ (50% din cazuri)	-	-
HepPar-1	+	-	-

F. Tumorile glandelor suprarenale

EUS-FNA poate fi efectuată cu ușurință în caz de leziuni ale glandei suprarenale stângi, putându-se obține material celular pentru diagnostic în 100% din cazuri (față de aproximativ 88% din cazuri când se puncționează leziuni din alte organe abdominale). Această metodă are ca scop diagnosticarea tumorilor benigne (nodulul/adenomul cortical), a neoplasmelor maligne primare (carcinomul adrenocortical, feocromocitomul) sau metastatice (metastaze de la un carcinom pulmonar sau mamar – cel mai frecvent, sau, mai rar, de la un adenocarcinom pancreatic sau melanoma malign).

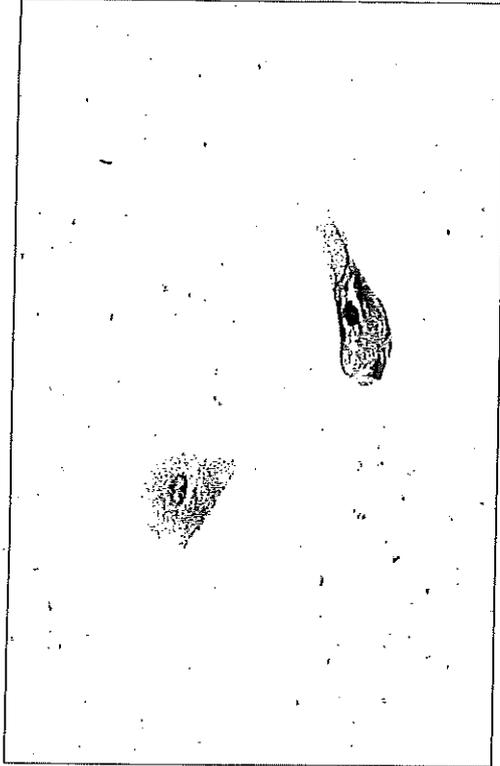
G. Alte neoplazme retroperitoneale pot fi diagnosticate prin EUS-FNA în 1,6% din cazuri și cuprind:

- tumori retroperitoneale primare: limfom, leiomiosarcom, paragangliomul extracortical, leiomiomul și neurilemomiul;
- tumori metastatice;
- rar – fibroză, abcese.

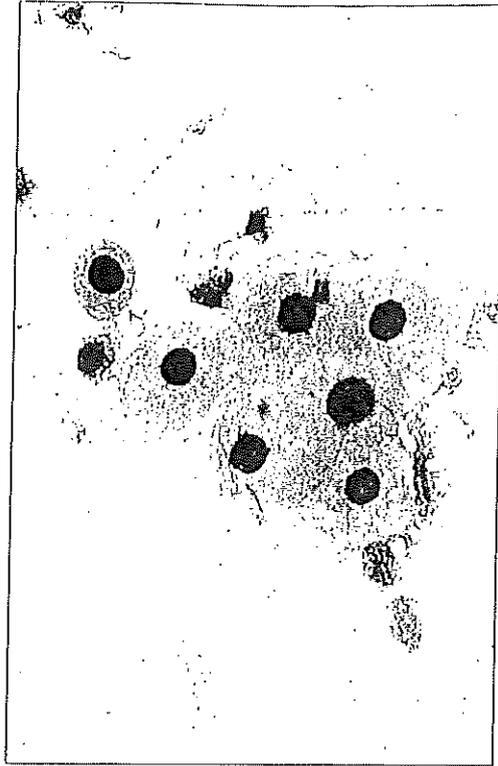
În concluzie, ecoendoscopia (EUS) și puncția fină aspirativă ecoghidată (EUS-FNA) au fost acceptate și folosite din ce în ce mai mult în:

- diagnosticul și stadializarea neoplasmelor maligne esofagiene, pancreatice, pulmonare și rectale;
- evaluarea pacienților cu stricturi extrinseci ale căilor biliare;
- diagnosticarea și diferențierea leziunilor benigne din diferite organe cu scopul de a evita intervențiile chirurgicale inutile și stresante pentru pacienți.

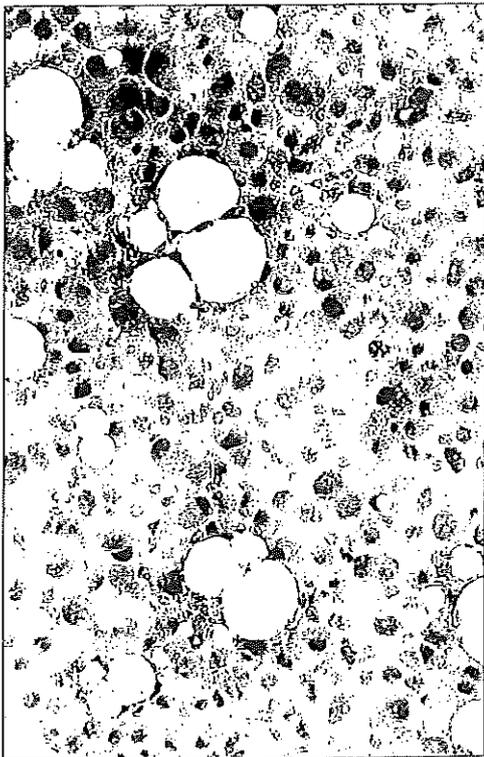
Deși EUS este utilizată de peste 25 ani, iar EUS-FNA de mai puțin de 15 ani, trebuie făcute eforturi considerabile pentru ca aceste metode să devină din ce în ce mai frecvent folosite în practica medicală clinică.



Frotiul urinar – celule uroteliatale superficiale și intermediare,
Colorație MGG, x 400



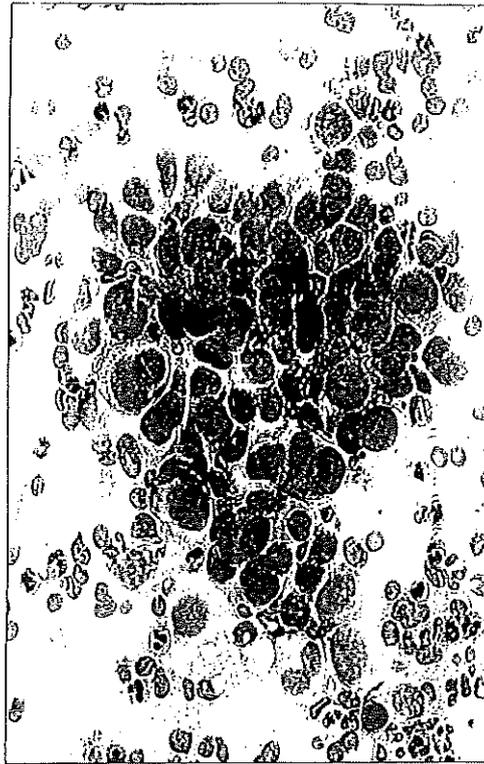
Frotiul urinar – celule uroteliatale superficiale,
Colorație Papanicolaou, x 200



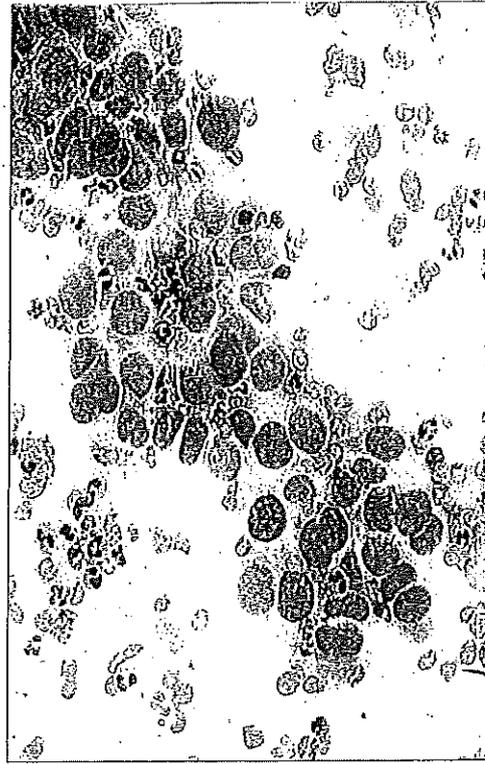
*Carcinom mamar de tip ductal invaziv – puncție fină aspirativă,
Colorație MGG, x 200*



*Mastoză chistică – metaplazie epocrină, puncție fină aspirativă,
Colorație MGG, x 200*



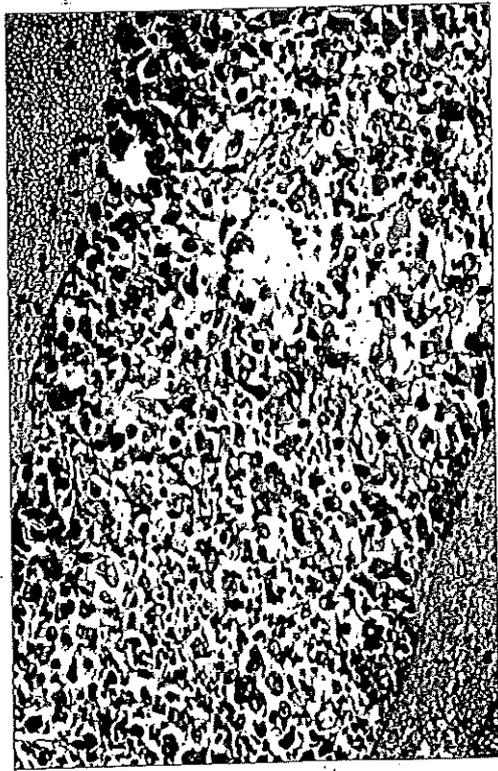
a.



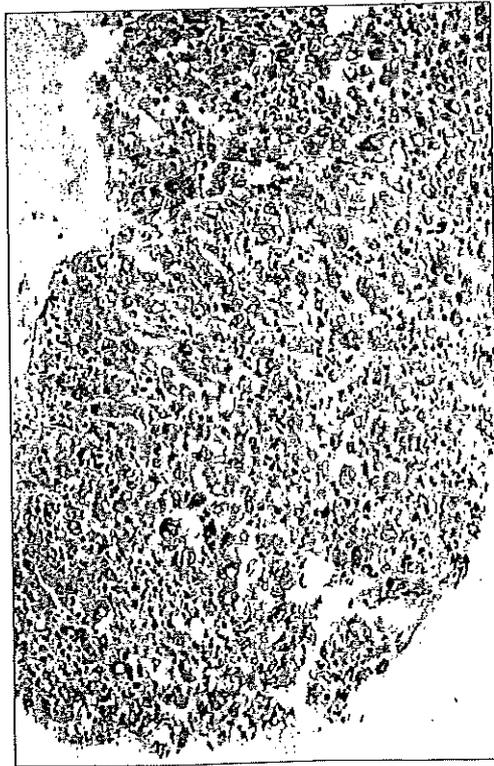
b.

*EUS-FNA – Frotiu pozitiv pentru malignitate – atipii severe (a) și
moderate (b)*

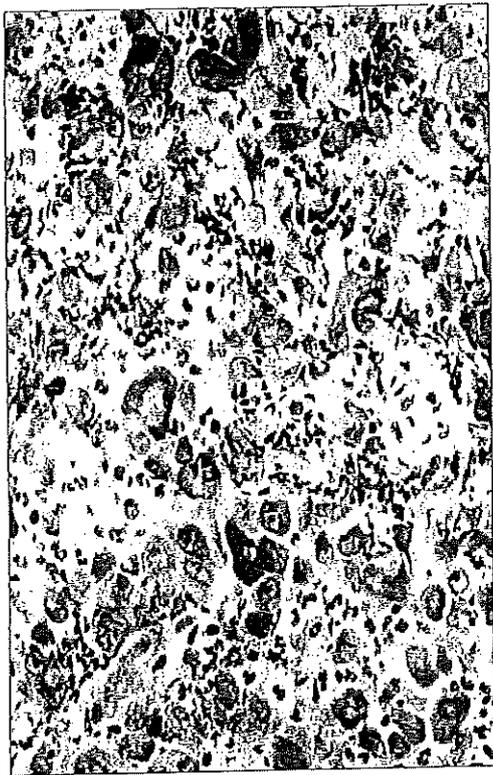
Colorație Papanicolaou, x 200



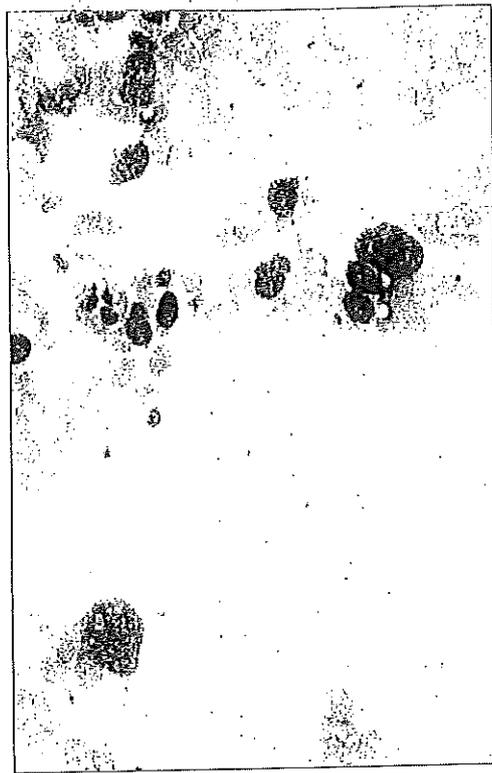
*Adenocarcinom pancreatic slab diferentiat, bloc celular.
Colorație hematoxilină-eozină, x 100*



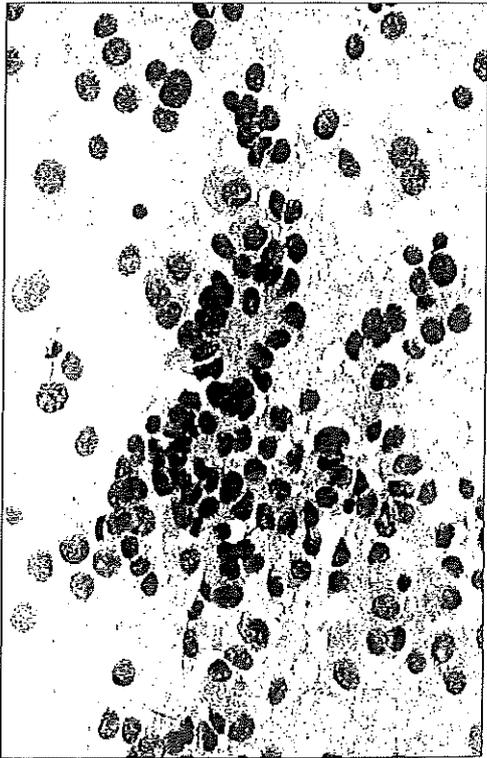
*Adenocarcinom pancreatic
imunomarcaj pozitiv pentru CA 19-9.
bloc celular, tehnica LSAB, x 200*



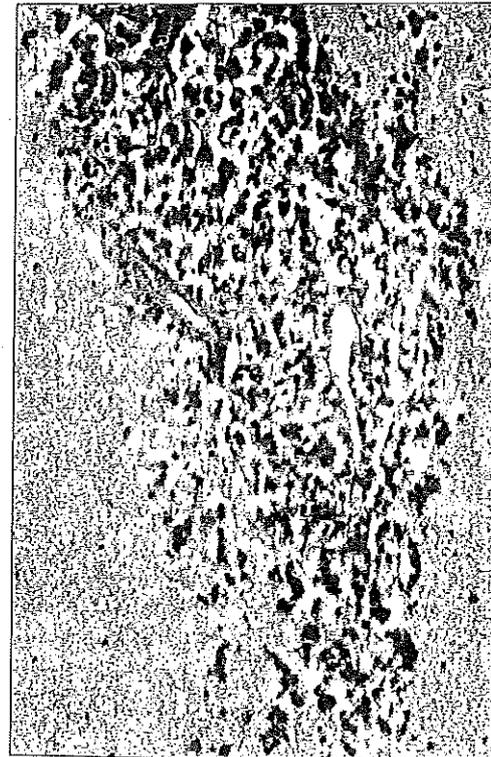
*Adenocarcinom pancreatic - imunomarcaj pozitiv pentru
citocheratinele AE1/AE3, bloc celular, tehnica LSAB, x 200*



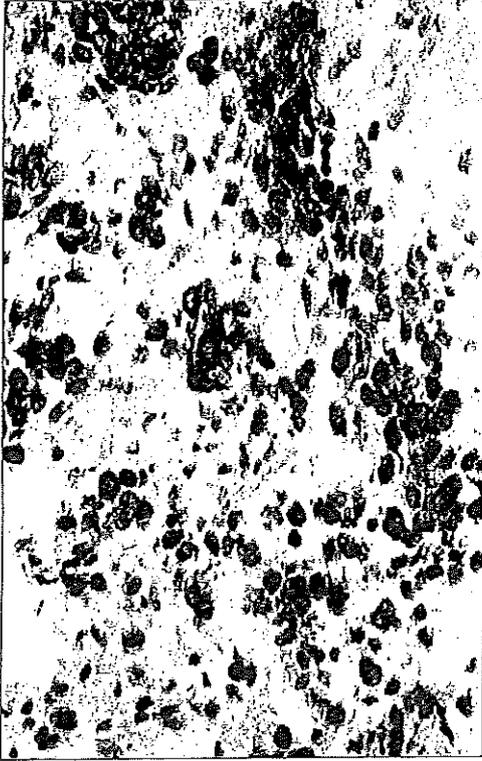
*EUS-FNA - Frotiu pozitiv pentru malignitate (metastază de
melanom malign).
Colorație MGG, x 200*



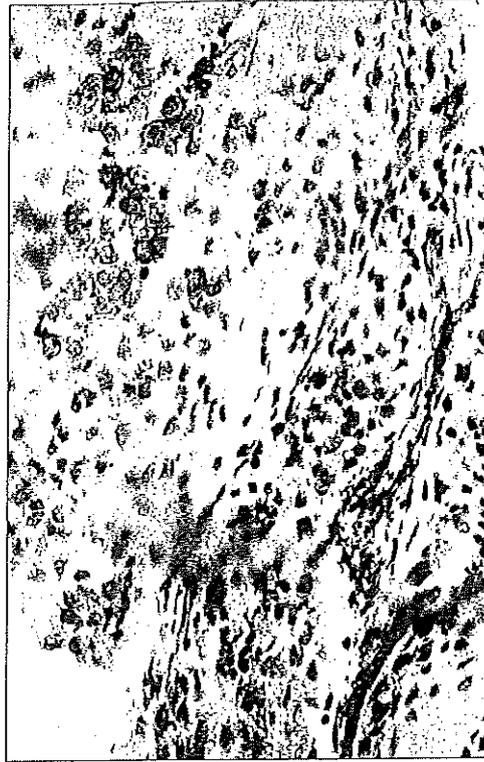
*EUS-FNA în tumoră stromală gastrică – frotiu pozitiv,
Colorație Papanicolaou, x 200*



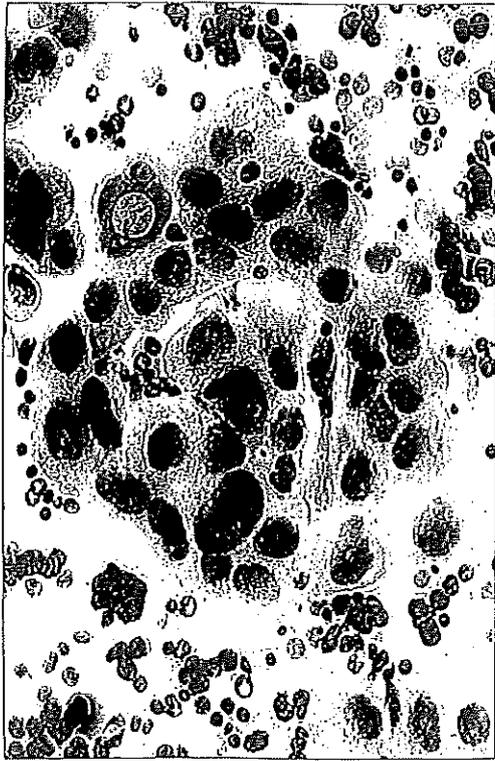
*Tumoră gastrică stromală – bloc celular,
Colorație hematoxilină-eozină x 100*



*Tumoră gastrică stromală – imunomarcaj pozitiv pentru CD 117,
bloc celular, tehnica LSAB, x 200*



*Tumoră gastrică stromală – imunomarcaj pozitiv pentru actina specifică
muşchiului neted în celulele tumorale și în vase – bloc celular,
tehnica LSAB, x 200*



*EUS-FNA în tumoră metastatică – frotiu pozitiv (atipii severe),
Colorație Papanicolaou, x 200*



*EUS-FNA în adenopatie metastatică – frotiu pozitiv,
Colorație Papanicolaou, x 200*

CAPITOLUL XII

METODE DE COLORARE A FROTURIILOR

După fixare, froturile trebuie colorate prin una din metodele de colorare: May-Grünwald-Giemsa, colorația Papanicolaou, Hematoxilină-Eozină și, opțional, colorația PAS.

1. METODA MAY – GRUNWALD - GIEMSA

Deși, în alte țări, metoda de colorație May-Grünwald-Giemsa nu se mai folosește, la noi rămâne încă cea mai ieftină și accesibilă metodă în majoritatea laboratoarelor.

Această metodă folosește două soluții colorante: soluția May-Grunwald care este eozinat de albastru de metilen dizolvat în metanol absolut, soluția Giemsa care este un amestec de doi coloranți (un colorant bazic Azur II și un colorant neutru Azur II eozină) dizolvați în metanol absolut și glicerină.

Există mai multe variante de colorare prin această metodă:

a. Metoda I:

- a. fixare în alcool metilic – 15 minute
- b. uscarea în aer – 15 minute
- c. colorare cu soluția May-Grunwald buffer (soluție tamponată) timp de 5 minute,
- d. spălare în soluție tamponată – 2 minute,
- e. colorare cu soluția Giemsa tamponată – 25 minute
- f. spălare sub jet de apă de robinet – 5 minute
- g. uscarea.

Reactivi:

- alcool metilic;
- soluție „Sorenszen” tamponată:
 - soluție A – 9,078g KH_2PO_4 / l;
 - soluție B – 11,876g $\text{NO}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / l;
- soluție May-Grunwald modificată pentru microscopie (soluție de eozinat de albastru de metilen);
- soluție Giemsa pentru microscopie (soluție de azur eozină și albastru de metilen).

Soluțiile de lucru se prepară astfel:

- soluția tamponată pentru lucru: 20 ml soluție A + 21 ml soluție B + 960 ml apă distilată → se aduce la pH de 7;
- soluție tamponată May-Grunwald: 50 ml soluție May-Grunwald + 50 ml soluție tamponată (se prepară săptămânal).
- soluție Giemsa tamponată: 10 ml soluție Giemsa + 90 ml soluție tamponată (se prepară zilnic).

b. Se mai poate folosi o **metodă de colorare May-Grunwald - Giemsa** modificată care utilizează soluții concentrate (soluții stoc). Astfel, în acest caz se folosesc următoarele soluții:

- reactiv May-Grunwald (stoc) - amestec de Eozină - Albastru de metilen (0,5 g) și metanol 100g (se schimbă la 2 săptămâni),
- soluție Giemsa (stoc) (se schimbă zilnic)
 - Azur II eozină - 0,6 g
 - Azur II - 0,16 g
 - Glicerină - 50 g
 - Metanol - 100 g.

Din aceste două soluții stoc se prepară soluțiile de lucru:

- May-Grunwald - 2 / 3 soluție stoc May-Grunwald + 1 / 3 metanol
- Giemsa - 1 / 10 soluție stoc Giemsa + 9 / 10 apă distilată.

Pentru colorare sunt necesare 5 etape:

- colorare cu soluție de lucru May-Grunwald - 5 minute (după fixarea prealabilă a frotiurilor prin uscare în aer urmată de postfixare în metanol,
- spălare în apă de robinet,
- colorare cu soluție Giemsa de lucru - 15 minute,
- spălare abundentă în apă de robinet,
- e. uscare în aer.

Rezultatul colorației: nucleii violet, citoplasmele cu nuanțe de albastru sau roșu în funcție de tipul de celulă.

2. METODA DE COLORARE PAPANICOLAOU

Această metodă a fost introdusă pentru vizualizarea optimă a celulelor maligne exfoliate de la nivelul suprafețelor epiteliale ale corpului. Ea nu are specificitate pentru nici o substanță întâlnită în aceste celule; mai mult, este o reacție de colorare policromă care evidențiază multiplele variații ale morfologiei celulare ce prezintă diferitele grade ale maturității celulare și ale activității metabolice.

Metoda de colorare policromă Papanicolaou a dobândit acceptul unanim în lume pentru probele citologice.

Papanicolaou a definit o metodă de colorare în care se evidențiază bine detaliile nucleare, asigura transparența citoplasmatică atunci când celulele erau suprapuse astfel că tipurile celulare puteau fi diferențiate unele de altele. La acestea

se mai poate adăuga avantajul stabilității colorației și a culorilor o perioadă lungă de timp și al reproductibilității rezultatelor.

Principalele avantaje ale acestei colorații sunt:

- evidențierea detaliului nuclear - printr-o fixare corespunzătoare și o colorare corespunzătoare a nucleilor,
- transparența citoplasmatică - prin folosirea coloranților alcoolici și o clarificare optimă,
- posibilitatea evidențierii diferențierii celulare - datorită coloranților policromatici.

Modificările acestei tehnici variază de la un laborator la altul, existând diferențe atât din punct de vedere vizual cât și analitic. Atât metoda de bază cât și variantele sale necesită patru etape principale, și anume:

- fixarea,
- colorarea nucleilor,
- colorarea citoplasmelor,
- clarificarea.

Între acestea se interpun o serie de etape secundare cu soluții care hidratează (pentru a favoriza fixarea coloranților nucleari), deshidratează (pregătind celulele pentru fixarea coloranților citoplasmatici) și spală celulele.

Colorarea nucleilor.

Diagnosticul de malignitate se bazează în primul rând pe pattern-ul cromatinian caracteristic. Pentru a evidenția cel mai bine acest detaliu nuclear se folosește hematoxilina care are afinitate pentru nucleoproteine. Formulele, cel mai des folosite pentru probele citologice sunt Hematoxilina Harris și Gill.

Există două modalități de a colora nucleii:

1. **Metoda regresivă.** Prin această metodă, în mod deliberat, se realizează supracolorarea nucleilor cu o hematoxilină neacidifiată; apoi se îndepărtează excesul de colorant cu acid clorhidric diluat. Acest acid trebuie la rândul lui îndepărtat prin spălarea frotiurilor într-o baie de apă tamponată.

2. **Metoda progresivă** - realizează colorarea nucleilor la intensitatea dorită, cu hematoxilină în care s-a adăugat acid acetic glacial. Selectivitatea hematoxilinei pentru nucleii este crescută datorită prezenței acizilor în soluție. Nu este necesară spălarea frotiurilor după colorare; unii autori (Catherine Keebler, 2001) susțin că este necesară spălarea acestora pentru a preveni precipitarea sărurilor pe lamă.

Toate formulele de hematoxilină, cu sau fără acid acetic glacial, sunt inițial acide, având un pH mai mic de 3. În acest moment colorantul este roșu. Pentru a modifica culoarea din roșu în albastru dorit, pH-ul trebuie crescut până la valoarea de 8 - 8,5. Acest lucru poate fi obținut fie prin spălarea frotiurilor în apă tamponată al cărei pH este în aceste limite, fie prin „albăstrirea” frotiurilor cu soluții diluate de hidroxid de amoniu, carbonat de litiu, substituent Scott, acetat de sodiu 0,5%, acetat de potasiu 1% sau bicarbonat de sodiu 0,1%.

Colorarea citoplasmelor.

Deoarece unorii pe frotiuri majoritatea celulelor se suprapun, iar grupurile de celule apar tridimensionale, coloranții citoplasmatici trebuie să permită

transparența celulelor. Prin folosirea soluțiilor cu un bogat conținut alcoolic, se permite vizualizarea clară a celulelor în arile cu suprapuneri celulare, cu mucus sau cu detritus. Toți coloranții citoplasmatici sunt sintetici, derivați de gudroni de cărbuni, ale căror formule chimice sunt standardizate:

- Orange G (OG 6) - este primul colorant citoplasmatic folosit în metoda Papanicolaou care colorează intens keratina în portocaliu strălucitor. Keratina nu este prezentă în mod normal la nivelul epitelului vaginal sau cervical, dar poate fi întâlnită în carcinomul keratinizant sau în leucoplazie.

- EA (EA 50 sau 65) - al doilea colorant citoplasmatic. Este un amestec policrom compus din eozină, verde de lumină și brun Bismarck. Eozina colorează citoplasma celulelor scuamoase mature, nucleolii și cili. Verdele de lumină colorează citoplasma celulelor metabolice active, cum ar fi parabazale, intermediare și cilindrice. Brun Bismarck nu adaugă citoplasmei o culoare caracteristică. Este foarte importantă durată colorării în hematoxilină și în colorantul policrom EA.

Clarificarea este etapa finală care are ca rezultat transparența celulelor. Cea mai folosită soluție pentru clarificare este xilenul (xilolul) - substanță incolară, cu indice de refracție de 1,494 (asemănător cu indicele de refracție al sticlei). Atunci când se folosește oricare din variantele metodei Papanicolaou, se recomandă standardizarea cât mai mult posibil a metodei de colorare, folosită pentru a obține rezultate reproductibile.

Există câțiva factori care influențează reacția de colorare Papanicolaou dintre care îi redăm pe cei mai importanți:

- tipul de fixator folosit,
- formula de hematoxilină selectată,
- formulele celorlalți coloranți,
- durata timpilor de colorare,
- numărul frothurilor colorate în fiecare colorant în parte,
- pH și conținutul chimic al apei de robinet folosite (cum ar fi excesul de clor),
- temperatura apei,
- pH coloranților,
- vârsta coloranților utilizați,
- prezența particulelor de colorant în soluțiile nefiltrate,
- variabilitatea metodei de colorare,
- posibila contaminare a soluțiilor de deshidratare,
- tipul metodei de colorare folosită (regresivă sau progresivă),
- calitatea frothurilor obținute de clinician (groase sau subțiri, fixate prin uscare sau fixate corespunzător),
- pH-ul probei recoltate,
- prezența sau absența modificărilor celulare inflamatorii.

Tehnica de colorare prin metoda Papanicolaou progresivă:

1. Fixarea umedă a frothurilor - etanol 95% (10 - 15 minute) sau izopropanol 80% (30 minute) sau fixare cu spray-ul fixator pentru citologie. În cazul fixării cu spray, înainte de colorare trebuie îndepărtat stratul de Carbowax de la suprafața frothurilor prin două metode:
 - introducerea în izopropanol 95% - 30 - 60 minute sau
 - trecerea acestora prin două băi de etanol 95%, timp de 30 minute și, respectiv, 10 minute.
2. Hidratare (pentru pregătirea colorării cu colorantul apos) - metode:
 - apă tamponată - 2 băi, 10 scufundări în fiecare, sau
 - 3 băi de etanol 80%, 70% și, respectiv, 50% - 10 scufundări în fiecare, sau
 - 1 baie etanol 70%, 10 scufundări, și apoi 10 scufundări în apă distilată sau apă de robinet, până când dispare aspectul sticlos.
3. Colorare cu Hematoxilina (supracolorare) - se poate folosi:
 - Hematoxilina Harris (concentrată) cu acid acetic - 2 - 4 minute,
 - Hematoxilina Gill parțial oxidată - 2 - 4 minute,
 - Hematoxilina Mayer - 4 minute.
4. Spălare în apă tamponată sau apă distilată (pentru îndepărtarea excesului de hematoxilină) - 2 băi, câte 10 scufundări în fiecare.
5. Decolorare cu soluție de acid clorhidric 0,25 %.
6. Diferențiere în:
 - substituent Scott (substituent de apă tamponată), 1 minut, sau
 - soluție aposă de hidroxid de amoniu 0,5%, 30 secunde (5 ml hidroxid de amoniu în 1000 ml apă distilată).
- Substituentul Scott se obține după formula:
 - 10 g sulfat de magneziu anhidru + 2 g bicarbonat de sodiu, în 1000 ml apă tamponată.
7. Spălare în apă de robinet tamponată - pentru îndepărtarea excesului de acid.
8. Deshidratare - se poate face în mai multe moduri:
 - în alcool etilic 95%, 2 băi, 10 scufundări în fiecare,
 - în 4 băi de alcool etilic: 50%, 70%, 80% și 95%, câte 10 scufundări în fiecare.
9. Colorare cu OG 6 - 1 - 2 minute.
10. Spălare în alcool etilic - 3 băi, 10 scufundări în fiecare.
11. Colorare cu EA - 2 - 6 minute, sau 10 minute cu EA modificat.
12. Spălare în 2 sau 3 băi de alcool etilic 95%, 10 - 20 scufundări în fiecare.
13. Deshidratare - 3 băi alcool etilic absolut, 10 scufundări în fiecare.
14. Clarificare - 3 - 4 băi xilen, sau 1 baie amestec alcool - xilen în părți egale și 2 - 3 băi xilen, câte 1 minut în fiecare.
15. Montare.

Tehnica de colorare prin metoda Papanicolaou regresivă parcurge aceleași etape, cu unele modificări:

Pentru colorarea nucleilor se recomandă folosirea hematoxilinei Harris (fără acid acetic), timp de 4 - 6 minute.
Diferențierea se face cu carbonat de lînu diluat: 20 picături carbonat de lînu apos saturat în 100 ml apă, timp de 2 minute, iar apoi se face controlul vizual al frotului.

Caracteristici generale ale coloranților

A. HEMATOXILINA

Descoperită în 1840 și utilizată prima dată de Bömer în 1865, hematoxilina, colorantul nuclear folosit în metoda Papanicolaou, este dificil de controlat și de standardizat. Deficiențele colorării cu hematoxilină depind de calitatea fixării și de modul în care sunt folosite soluțiile de hematoxilină.

De-a lungul anilor au fost folosite mai multe formule de hematoxilină. Hematoxilina Harris se folosește de obicei în metodele de colorare regresivă, în timp ce în metodele progresive se utilizează de obicei Hematoxilina Mayer, Delafield, Gill-Baker-Mayer și Gill-parțial oxidată.

Perioada scurtă de valabilitate a hematoxilinei duce la o calitate inferioară a froturilor colorate. Este important să se noteze data când a fost primită hematoxilina în laborator deoarece colorantul se poate oxida cu timpul, mai ales în mediile umede. Cu cât cristalele sunt mai deschise la culoare, cu atât hematoxilina este mai puțin oxidată, iar cu cât sunt mai întunecate cu atât este prezentă mai multă hemateină (sau hematoxilină oxidată). Supraoxidarea este una din cauzele principale ale unei colorații slabe cu hematoxilină.

Informația oferită de manufacturier poate să nu indice perioada de valabilitate a coloranților de aceea trebuie notată data primirii în laborator a colorantului și data când recipientul acestuia a fost deschis. Acest lucru poate ajuta la stabilirea unui control propriu de calitate pentru soluțiile stoc și soluțiile de lucru.

Anumite componente din formulele de hematoxilină pot transforma hematoxilina într-un colorant nuclear corespunzător. Acestea sunt: un agent oxidant, un mordant, un solvent și o substanță folosită pentru acidifiere.

Agentul oxidant, este folosit pentru a începe procesul de maturizare care transformă hematoxilina într-un agent de colorare activ (hemateină). Agenții oxidanți cei mai des folosiți sunt iodatul de sodiu și oxidul de mercur. Acesta din urmă folosit oxidarea și maturizarea Hematoxilinei Harris, precum și cloral hidratul adăugat pentru conservare (recomandat de Mayer) sunt produși toxici și ar trebui evitați. *Mordantul* este o substanță care determină culoarea substanței. Sulfatul de aluminiu, prin încălzirea de ioni pozitivi pe care o conține, acționează ca o punte ce leagă chimic hemateina (încărcată negativ) de acidul fosforic din lanțul de ADN (încărcat tot negativ). În acest scop, în unele formule se folosește etilen glicol. Solventul acționează ca un agent de omogenizare și ajută la reducerea ratei de oxidare. *Acidifierea* asigură selectivitatea materialului nuclear și previne oxidarea

colorantului prin stabilizarea complexului hemateină - aluminiu. Pentru aceasta se folosește acidul acetic glacial sau acidul citric.

După unii autori (Soost HJ, Falter EW, Otto K, 1979), metoda de colorare progresivă este mai bună pentru măsurarea celulelor, întrunește necesitățile pentru sistemele automatizate și oferă o corelație mai bună a pattern-urilor cromatiniene descrise vizual cu datele cantitative. De asemenea, cantitatea totală de colorant care se fixează în nucleu nu este diferită în grupurile de celule față de celulele izolate.

Există mai multe formule de hematoxilină. Hematoxilina Gill jumătate este cel mai ușor de preparat, este stabilă în soluție, eficientă din punctul de vedere al costului și poate fi folosită imediat.

Formule de hematoxilină

Ingrediente	Gill, parțial oxidată	Harris	Mayer
Hematoxilină	2 g	5 - 8 g	1 g
Metanol absolut	-	50 - 80 ml	-
Apă distilată	730 ml	1000 - 1680 ml	1000 ml
Etilen glicol	250 ml	-	-
Agent chimic de maturare	Iodat de sodiu 0,2 g	Oxid mercuric (2,5 g) sau iodat de sodiu (0,55 g)	Iodat de sodiu 0,2 g
Sulfat de aluminiu anionic	23,5 g (sau 17,6 g sulfat de aluminiu)	100 - 160 g	50 g
Acid acetic glacial	20 ml (sau 1 g acid citric)	20 - 40 ml (sau deloc)	40 ml sau 1 g acid citric (sau deloc)
Agent de conservare	-	-	50 g cloral hidrat
Perioada de valabilitate	Peste 1 an	Luni sau ani	2 - 3 luni

B. ORANGE G (OG) ȘI AMESTECUL POLICROM EA

În prepararea substanțelor Orange G și EA, este foarte important să se verifice conținutul în colorant. OG conține de obicei 80% colorant, iar EA conține 65% verde de lumină, 80% eozină Y și 45% brun Bismarck Y.

Informația oferită de *Biological Stain Commission* (Comisia pentru Coloranți Biologici) evidențiază diferențele dintre cantitățile curente de colorant din aceste formule: OG conține 89% colorant, iar EA: verde de lumină 71% și eozină 92 - 94%. Pentru a compensa variațiile în conținutul de colorant, unii împart cantitatea donată la conținutul total de colorant cerut de procentul din tabelele corespuzătoare. Protocolurile de lucru publicate pentru diferite coloranți nu conțin de obicei această informație și, astfel, atunci când se încearcă o metodă de colorare este necesară obținerea acestei informații direct de la sursa originală.

De exemplu, pentru a calcula cantitatea de colorant necesară pentru o anumită formulă se procedează astfel:

Cantitatea de colorant cerută / Procentul de colorant din formulă = cantitatea actuală de colorant pentru a fi folosită în obținerea cantității corespunzătoare de colorant necesară.

Ex.: $OG\ 10\ mg\ (CI\ 16230) / 89\% \text{ sau } 0,89 = 11,2\ mg$
 $OG\ 10\ mg\ (CI\ 16230) / 80\% \text{ sau } 0,80 = 12,5\ mg$

Cu cât este mai mare conținutul de colorant, cu atât mai puțin colorant va fi necesar pentru a se obține conținutul de 100% de colorant cerut.

a. **Orange G** este un colorant acid ("G" este abrevierea cuvântului nemțesc "gelb" care înseamnă "galben"). El colorează keratina în portocaliu intens și strălucitor. De asemenea, mai colorează granulațiile din celulele superficiale eozinoflice (posibil cele care conțin eleidină). Deoarece Keratina, care în mod normal nu este prezentă în celulele epiteliale scuamoase, poate fi întâlnită în cancerle scuamoase keratinizante, prezența unei intense orangeofilii în importanță pentru diagnostic.

În formula OG modificată, conținutul de colorant este controlat cantitativ. OG este ușor solubil în etanol 95% și chiar mai solubil în apă. Când se adaugă acid acetic glacial în formulă, soluția colorează rapid și intens.

Când sunt adăugați ioni pozitivi de hidrogen la aminoacizii proteinelor celulare se realizează o încărcătură acidă a acestora și este favorizată legarea de situsurile la care OG încărcat negativ se poate atașa. În acest caz, timpul de colorare trebuie redus sau colorarea ulterioară cu eozină Y va fi inhibată.

Adăugarea acidului fosforungstic, un mordant care se leagă strâns de proteine, ajută la intensificarea culorii obținute.

Colorantul Orange G modificat se prepară astfel:

1. **Soluția stoc.** Se prepară o soluție stoc apoasă de OG (CI 16230), cu conținut total de colorant de 10%. În flaconul de OG conținutul de colorant este de 80%.

10 mg / 80% sau 0,80 = 12,5 mg; astfel, se dizolvă 12,5 mg OG 6 în până la 100 ml apă distilată încălzită la 70-80 grade.

2. **Soluția de lucru:**

- OG, soluție apoasă 10% 20 ml
- Acid fosforungstic 0,15 mg
- Alcool etilic 95% 980 ml
- Acid acetic glacial (optional) 10 ml

Se combină ingredientele și se filtrează înainte de folosire.

Soluția poate fi folosită imediat după preparare și trebuie filtrată după fiecare folosire. Soluția de lucru poate fi reumplută zilnic pentru a se obține rezultate satisfăcătoare. De obicei, ea se aruncă după colorarea a 2000 froiuri.

b. **Amestecul EA** este un colorant policrom. El este o combinație de verde de lumină, eozină Y și, în unele cazuri, brun Bismarck Y.

Verdele de lumină este un colorant acid. El colorează în verde citoplasma celulelor metabolice active, a celulelor scuamoase intermediare, parabazale și cilindrice, a histiocitelor, a leucocitelor, a celulelor carcinoamelor nediferențiate (cu celule mari și mici) și a celulelor derivate din adenocarcinoame. Este foarte sensibil la lumină (dintre toți, cel mai sensibil).

Eozina Y este un colorant acid; pot fi prezenți sau nu, diferiți atomi de brom. Când sunt prezenți toți cei 4 atomi de brom, colorantul are culoarea cea mai roșie; la un conținut mai mic de brom, culoarea este gălbuie. Eozina Y colorează mai ales citoplasma celulelor scuamoase superficiale, nucleolii, eritrocitele și cilii.

Amestecul EA modificat permite ca eozina și verdele de lumină să coloreze diferit citoplasma. Când culoarea citoplasmei scade de la verde la verde-albăstrui este un indiciu că EA este expirat și trebuie schimbat. Colorantul ar trebui filtrat zilnic și păstrat la întuneric într-o sticlă bine închisă.

EA are trei formule separate: 36, 50 și 65. EA 36 a fost inițial preparat pentru colorarea froiturilor gimnologice dar se poate folosi și pentru alte probe celulare. Formula originală a fost modificată în 1954. EA 65 este o modificare a formulei 36 și a apărut pentru colorarea froiturilor mai groase. EA 50 este o soluție comercială; ea s-a vrut a fi similară cu EA 36, dar formula sa poate varia de la un producător la altul.

Amestecul EA modificat este rezultatul experimentelor lui Gill. Substanța brun Bismarck Y a fost eliminată din formula lui Gill și prezența sa în formula originală este controversată. Se știe că brun Bismarck Y precipită acidul fosforungstic, ingredient responsabil pentru colorația diferențială cu verde de lumină și eozină. Acest amestec poate fi folosit pentru probele gimnologice sau de altă natură. Solubilitatea sa mai redusă în alcool îi oferă probabilitatea redusă de a fi îndepărtat din celule.

Amestecul EA modificat se prepară astfel:

1. **Soluții stoc.** Sunt două soluții stoc conținute în colorantul EA modificat: a). o soluție apoasă 3% de verde de lumină gălbui, b). o soluție apoasă 20% de eozină Y. Se dizolvă greutatea corectată din fiecare colorant în apă distilată până la 100 ml fiecare, la 70-80 grade.

Se păstrează în recipiente închise la culoare.

2. **Soluția de lucru:** - 95 % etanol 700 ml
- metanol absolut 250 ml
- acid acetic glacial 20 ml
- sol. stoc verde de lumină 10 ml
- eozină stoc 20 ml
- acid fosforungstic 4 g.

Rezultatul colorației:

- celule epiteliale: - nucleii albastru închis sau violet închis
- citoplasma roz - roșu (celulele eozinoflice) sau verde albastru (celulele bazoflice).

- hematitele - roșu strălucitor (dacă nu sunt hemolizate).
- leucocitele : albastru deschis cu nucleii albastru închis - negru.
- bacteriile : cenușii.
- trichomonadele : albastru cenușiu palid.
- monilia: hifele roz, sporii roșu strălucitor.
- mucus - benzi bleu sau roz.

În 1995, Yang și Alvarez au descris **colorația Papanicolaou ultrarapidă** a cărei durată este de 90 secunde și prin care calitatea citomorfologiei s-a îmbunătățit foarte mult. Astfel, s-au făcut trei modificări în metoda standard, și anume:

- se pot folosi și froiuri fixate prin uscare în aer, dar acestea trebuie rehidratate înainte cu soluție salină normală,
- fixarea se realizează cu o soluție de formaldehidă 4% și etanol 65%,
- colorarea se face cu hematoxilina Richard-Allan 2.

Etaplele acestei colorații sunt:

1. Rehidratare cu soluție salină normală - 30 secunde,
2. Fixare în etanol 95% (opțional, pentru depozitare sau transport),
3. Fixare în formalină alcoolică - 10 secunde,
4. Spălare în apă - 6 scufundări încet,
5. Colorare cu hematoxilină Richard-Allan 2 (soluția a) - 2 scufundări încet,
6. Spălare în apă - 6 scufundări,
7. Etanol 95% - 6 scufundări,
8. Colorare cu Soluția Richard-Allan b - 4 scufundări ușoare,
9. Etanol 95% - 6 scufundări,
10. Etanol absolut - 6 scufundări,
11. Xilen - 10 scufundări,
12. Montare.

Soluția Richard-Allan b este un amestec alcoolic de: orange G, cozină Y, verde de lumină și albastru de anilină, iar soluția a este un colorant comercial produs în laboratoarele Richard-Allan, Inc. din SUA.

Rezultatul acestei colorații constă în obținerea unor froiuri policromatice, cu detalii nucleare și citoplasmice foarte bine păstrate. Citoplasma apare colorată în diferite nuanțe de albastru deschis, cromatina nucleară în albastru închis, nucleolii în roșu, celulele scuamoase în oranj, roz sau albastru, coloidul în oranj și hemostiderina în galben.

3. METODA DE COLORARE DIFF-QUICK

Este o colorație diferențială rapidă ale cărei rezultate sunt similare cu cele din colorația Wright-Giemsa. Această metodă folosește trei soluții: un fixator pe bază de metanol, un colorant pe bază de cozină și un amestec constituit din tiazină, xantănă și triarilmelan.

4. COLORAȚII SUPRAVITALE

Colorațiile supraviviale sunt colorații rapide care se utilizează în special pentru froiturile obținute din probele neginecologice.

Colorația supravitală a unei picături de sediment proaspăt cu o picătură de soluție de colorare, fără fixare prealabilă a froiului, poate oferi informații utile care să ajute citopatologul:

- să evite contaminarea soluțiilor de colorare cu celule maligne atunci când sunt prezente,
- să anticipeze necesitatea unor colorații speciale atunci când există o potențială problemă de diagnostic diferențial,
- să observe prezența cristalelor și cilindrilor în urină care dispar după fixarea în etanol,
- să decidă tipul de metodă pentru prelucrarea ulterioară: filtrare, froiuri directe sau citocentrifugare,
- să realizeze mai multe froiuri în scopuri didactice sau de cercetare.

Albastru de toluidină oferă un bun detaliu nuclear, favorizând evidențierea structurilor tridimensionale și a vacuolelor proeminente. Soluția de lucru se păstrează bine la frigider și nu necesită filtrare frecventă.

Tionina este de asemenea un excelent colorant nuclear, dar necesită filtrare frecventă pentru îndepărtarea cristalelor care pot obstrua examinarea microscopică.

Albastru de metilen se folosește pentru colorarea sedimentului urinar pentru vizualizarea celulelor maligne.

Se mai poate folosi colorația cu verde metil și pironină care colorează cromatina în albastru-verde și citoplasmele în roșu, precum și alte colorații supraviviale utile pentru diferențierea histiocitelor și a leucocitelor de celulele mezoteliale și de celulele maligne din revărsatele seroase.

Metoda cu albastru de toluidină

1. Se pune o picătură de sediment (din stratul cel mai de sus al acestuia) pe o lamă de sticlă.
 2. Lângă ea, se pune o picătură de soluție de albastru de toluidină.
- Pentru prepararea acestei soluții se dizolvă 0,5 mg albastru de toluidină în 20 ml etanol 95%, apoi se adaugă 80 ml apă distilată; soluția se filtrează și se păstrează la frigider într-un recipient întunecat.
3. Se amestecă cele două picături.
 4. Se aplică o lamelă de 24 x 30 mm.
 5. Se examinează la microscop.

Dacă se dorește păstrarea froiului astfel obținut, se înconjoară lamela cu o jă (putându-se asfel păstra timp de câteva ore) sau se introduce froiul cu tot cu lamelă în etanol 95% pentru fixare.

Ca substituenți pentru albastru de toluidină se pot folosi: albastru de tionină și albastru de metilen.

Soluția de albastru de tionină se obține astfel:

- 1 mg albastru de tionină,
- 100 ml etanol 25%,
- 2 picături de acid acetic glacial.

Se dizolvă albastrul de tionină în alcool, se adaugă acidul acetic, apoi se lasă 30 minute, după care se filtrează și se păstrează la frigider într-un recipient înfundat. Soluția trebuie filtrată frecvent deoarece are tendința să formeze cristale. Albastrul de tionină nu colorează hematiile.

Soluția de albastru de metilen se obține prin dizolvarea a 1,5 mg albastru de metilen în 30 ml etanol 95%, după care se adaugă 2 ml hidroxid de potasiu (KOH) 0,1 N. Soluția se filtrează și se păstrează la frigider într-un recipient înfundat.

Pentru identificarea agentului oportunist *Pneumocystis carinii* se pot folosi următoarele colorații:

- colorația rapidă Diff-Quick (sensibilitate 76%),
- colorația Diff-Quick și cresyl-violet (sensibilitate peste 76%),
- colorația Grocott-Gomori cu argint-metenamină,
- colorația Gram-Weigert.

Metoda de colorare Grocott - Gomori

Această metodă de colorare se folosește pentru depistarea *Pneumocystis carinii* în produsele de lavaj bronhic sau bronhoalveolar, utilizează mai multe soluții care trebuie preparate proaspăt și anume:

- Acid cromatic 5%: - acid cromatic - 5 mg,
- apă distilată - 100 ml.
- Borat de sodiu 5% (Borax): - borat de sodiu - 5 mg,
- apă distilată - 100 ml.
- Soluție de nitrat de argint - metenamină (soluție stoc):
- soluție 5% de nitrat de argint - 5 ml,
- soluție metenamină 3% - 100 ml.
- Soluție de nitrat de argint - metenamină (soluție de lucru):
- soluție stoc nitrat de argint-metenamină - 25 ml,
- apă distilată - 25 ml,
- soluție borat de sodiu 5% - 2 ml.
- Soluție bisulfid de sodiu 1%: - bisulfid de sodiu - 1 mg,
- apă distilată - 100 ml,
- clorură de aur - 10 ml,
- apă distilată - 90 ml.
- Soluție tiosulfat de sodiu 2%: - tiosulfat de sodiu - 2 mg,
- apă distilată - 100 ml.

Tehnica de colorare:

- Frotiurile, fixate în prealabil prin uscarea sau în alcool, se introduc într-un recipient cu apă distilată.
- Oxidare cu acid cromatic 5%, 15 minute, în baie de apă la 43°C,

- Spălare în apă de robinet - câteva secunde,
- Spălare cu soluție de bisulfid de sodiu timp de 1 minut pentru îndepărtarea acidului cromatic rezidual,
- Spălare în apă de robinet - 5 minute,
- Spălare în apă distilată - 3 - 4 băi,
- Colorare cu soluție de nitrat de argint-metenamină (soluție de lucru), timp de 3 minute, în baie de apă la 43°C,
- Transferul frotiurilor într-o baie de apă la 56°C, timp de 23 minute,
- Spălare în 6 băi de apă distilată,
- Colorare în soluție de clorură de aur, 2 - 5 minute,
- Spălare în apă distilată,
- Îndepărtarea argintului neredus cu soluție de tiosulfat de sodiu, 3 - 5 minute,
- Clarificare,
- Montare.

Rezultatul colorației: *Pneumocystis*, fungii, *Actinomyces*, *Nocardia* și anumite bacterii încapsulate apar colorate în negru; fondul este verde, iar mucusul în diferite nuanțe de gri.

5. ERORI DE COLORARE ȘI MODALITĂȚI DE EVITARE A ACESTORA

- Dacă se folosește ca agent de albăstrire o soluție de sare numită STWS, aceasta trebuie îndepărtată de pe frotiu deoarece, în caz contrar, după montare va apărea o peliculă albă ce împiedică examinarea frotiului.
- Pentru a se evita desprinderea celulelor de pe lamă în momentul colorării, este necesară spălarea cu atenție a frotiurilor în diferitele soluții.
- Se recomandă ca lamele să nu stea prea mult timp în soluțiile alcoolice după OG și EA deoarece există riscul ca prin aceasta să fie îndepărtat colorantul care a penetrat celulele.
- Xilenui trebuie filtrat zilnic.
- Xilenui nu trebuie aruncat în chiuvetă, ci trebuie colectat în niște recipiente speciale atunci când capătă culoarea roz, când conține mici bule (contaminarea cu apă) sau când are aspect lăptos. Este necesar ca fiecare laborator să respecte anumite reguli pentru evacuarea xilenui sau a altor soluții toxice.
- Lamele (frotiurile) trebuie bine scurse (după fiecare substanță) astfel încât să nu contamineze următoarea soluție.
- Nivelul soluțiilor ar trebui menținut constant pe durata tuturor etapelor de colorare. Se recomandă ca nivelul soluțiilor după amestecul EA să fie mai mare decât al celorlalte pentru a obține o delimitare completă înainte de introducerea frotiurilor în soluțiile de clarificare.
- Dacă pH-ul apei după hematoxilină nu este suficient de alcalin, atunci rezultatele colorării vor varia de la un laborator la altul.
- Pentru a se obține rezultate foarte bune, pH-ul amestecului policrom EA trebuie să fie între 4,5 - 5.
- Atunci când nu sunt folosite, soluțiile trebuie păstrate în recipiente închise la culoare și etanșe.

6. METODE DE DECOLORARE

Decolorarea și recolorarea unui frotiu colorat prin metoda Papanicolaou pot fi realizate în majoritatea cazurilor, dar rezultate optime se produc doar atunci când proba celulară originală a fost fixată corespunzător.

Primul pas constă în îndepărtarea lamelii. Acest lucru se poate obține fie prin introducerea preparatului în xilen până când lamela se desprinde singură, fie prin așezarea preparatului într-un congelator timp de câteva minute, fie prin plasarea acestuia pe un dispozitiv metalic încălzit la 60°C timp de 3 - 4 ore.

Apoi urmează îndepărtarea mediului de montare care poate dura câteva ore; cu cât preparatul este mai vechi, cu atât această etapă va fi mai lungă. În general, timpul depinde de cantitatea și tipul mediului de montare folosit.

În etapa următoare se îndepărtază colorantul nuclear prin imersia lamei într-o soluție apoasă sau alcoolică de acid clorhidric. Îndepărtarea hematoxilinei se face de obicei în 5-20 minute sau mai mult în funcție de grosimea probei celulare. Preparatul se spală apoi ușor în apă curgătoare tamponată timp de 10-15 minute.

Metoda I:

- Se pune preparatul în xilen până când lamela se desprinde singură; această etapă poate dura câteva ore sau zile în funcție de vechimea preparatului și de mediul de montare utilizat.
- Se introduce preparatul într-o baie de xilen curat până la îndepărtarea mediului de montare.
- Se efectuează decolorarea.

Metoda II:

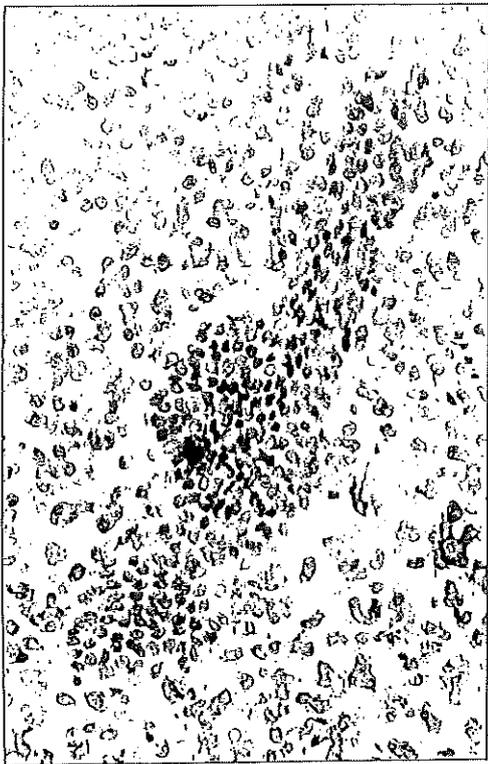
- a. Se introduce lama de sticlă (pe care se găsește frotiul) în congelator, cu lamela așezată direct pe gheață.
- a. Se așteaptă 10 - 15 minute sau până la înghețarea periferiei lamei.
- a. Se pun mânuși și ochelari de protecție.
- a. Se introduce lama unui bisturiu între lamelă și materialul celular. Dacă lamela a fost înghețată corespunzător, aceasta va aluneca de pe lamă.
- a. Se introduce frotiul în xilen până la îndepărtarea mediului de montare.
- b. Se efectuează decolorarea.



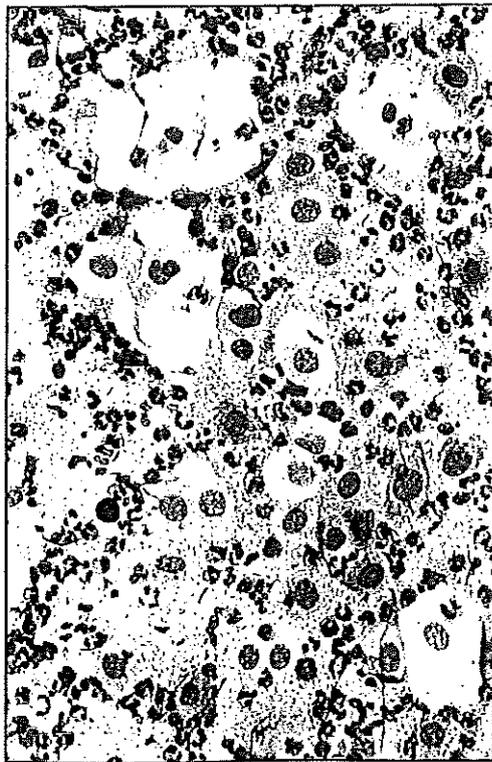
*Frotiu convențional - celule pavimentoase superficiale și intermediare,
Colorație MGG, x 200*



*Frotiu convențional - celule pavimentoase din straturile profunde,
Colorație MGG, x 200*



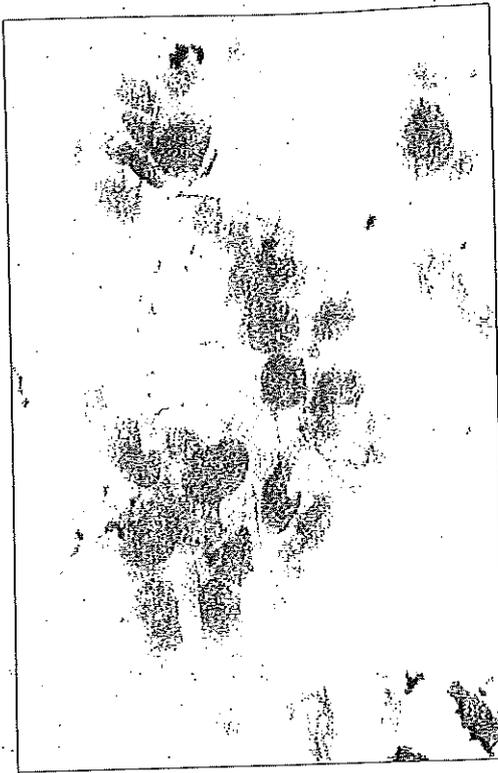
*Frotiu convențional – celule endometriale,
Colorație Papanicolaou, 200x*



*Frotiu convențional – celule pavimentoase cu distarizioze moderate,
Colorație MGG, 200x*



*Frotiu convențional – citologie malignă,
Colorație MGG, x 400*



*Frotiu convențional – celule endocervicale,
Colorație Papanicolaou, x 200*

CAPITOLUL XIII

AUTOMATIZAREA ȘI ALTE METODE CITOLOGICE MODERNE

În zilele noastre, citologia se confruntă cu numeroase întrebări: *seamă laboratoarele de citologie de acum 20 ani cu cele de astăzi? cum vor fi integrate noile metode citologice în practica curentă? care din noile metode va fi mai bună? viitorul necesită mai mulți sau mai puțini citopatologi?*

În general, scopurile oricărei metode citologice automatizate sunt:

- reducerea și îndepărtarea tehnicile obositoare și generatoare de erori;
- creșterea acurateții și reproductibilității citodiagnosticului;
- realizarea economiei de timp;
- cost eficient.

Unele metode automatizate sunt deja folosite în citologie de câțiva ani.

Cercetarea în cadrul metodelor de screening automatizat a început în 1950, la puțin timp după introducerea screening-ului pe scară largă. Unul din primele dispozitive a fost *Cytomalyzer*-ul descriș de cercetătorii de la Airborne Instruments Laboratory din Mineola, New York; acesta a folosit tehnici de analiză a imaginii pentru diferențierea frotiurilor anormale de cele negative, dar trialurile clinice au eșuat. Totuși, eforturile au continuat apărând astfel *Sistemul Taxonomic de Analiză Intracelulară* pentru identificarea celulelor din sfera ginecologică. Unele sisteme au combinat analiza imaginii cu metode histochimice, imunohistochimice sau fluorescențe. Recent însă, doi factori principali au contribuit la dezvoltarea citologiei automatizate și la introducerea unor metode mai sensibile: introducerea pe scară largă a computerelor din ce în ce mai sofisticate, precum și creșterea alarmantă a rezultatelor fals negative (mai ales în domeniul citologiei exfoliative cervico-vaginale).

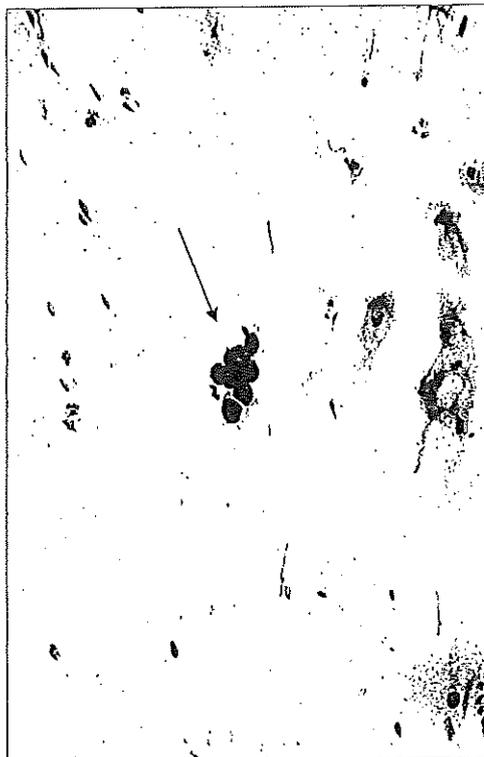
Una dintre cele mai moderne metode de citodiagnostic este *Telmica citologiei lichide în monostrat* care a fost descrisă ca o alternativă a frotiului Pap direct convențional în citologia exfoliativă cervico-vaginală. Aceasta este o metodă mai performantă de prelevare și prelucrare a produsului recoltat, cu obținerea în final a unui monostrat celular, asigurându-se astfel condiții mai bune de citire și de interpretare a frotiurilor.

Tehnica în monostrat se bazează pe agitare dispozitivului de prelevare într-un recipient care conține lichid de conservare, după care frotiurile sunt obținute din acest lichid prin prelucrarea lui în laboratorul de citologie cu ajutorul unor dispozitive speciale.

Principalul avantaj al citologiei lichide în monostrat este acela că nu se pierde nimic din produsul recoltat, observația bazându-se pe concluziile unor studii



Frotiu convențional - celule metaplazice,
Colorație Papanicolaou, x 200



Frotiu convențional - adenocarcinom ovarian,
Colorație Papanicolaou, x 100

care au arătat pierderea a aproximativ 30% din produs prin metoda convențională odată cu anucarea dispozitivului de prelevare (una din sursele rezultatelor fals negative). De asemenea, metoda determină o mai bună omogenizare a produsului biologic, reduce suprapunerile celulare și elementele care pot obstrucționa interpretarea celulelor (sânge, inflamație, mucus), îmbunătățind astfel modul de prezentare al frotiului. Întrucât celulele sunt fixate imediat după recoltare prin introducerea lor în fluidul de conservare, sunt eliminate și artefactele de uscare în aer. Frotiurile pot fi refăcute fără a fi necesară o nouă recoltare, iar din produsul rămas se pot efectua, opțional, o serie de teste suplimentare incluzând teste imunocitochimice sau depistarea HPV-ADN.

În prezent, se cunosc trei metode de citologie lichidă: Cytoscreen, Cytyc ThinPrep 2000 și AutoCyte PREP (Tripath).

Metoda CYTOSCREEN, care se folosește și în Laboratorul de Anatomie Patologică și Citologie din cadrul Spitalului Clinic de Urgență - Craiova, are la bază patru etape principale, și anume:

- prelevarea probei în mediul lichid,
- citirea automată a densității celulare a probei cu ajutorul unui nefelometru (standardizare),
- depunerea celulelor în monostrat pe lama de sticlă,
- citirea și interpretarea frotiurilor, cu posibilitatea examinării de preparate cvasiidentice obținute ulterior din același produs de prelevare (screening morfologic) sau a efectuării de teste complementare.

Recoltarea se efectuează cu dispozitiv adecvat (Cytotrep) care să permită recoltarea din toate zonele colului uterin. Capătul acestui dispozitiv se imersează în lichidul de conservare CYTeasy conținut într-un recipient corespunzător, obținându-se o suspensie celulară reprezentativă.

Flaconul cu produsul recoltat se introduce apoi într-un agitator (shaker) în care se agită puternic timp de 20 minute la 2200 rotații / minut pentru detașarea celulelor de pe dispozitivul de prelevare și obținerea unei suspensii celulare omogene și reprezentative.

Standardizarea constă în citirea fotometrică a densității celulare cu ajutorul unui nefelometru. Acest aparat încadrează probele celulare în cinci clase conform cantității de celule recoltate:

- clasa A - densitate celulară foarte mică,
- clasa A2 - densitate celulară mică,
- clasa B - densitate celulară medie,
- clasa B2 - densitate celulară mare,
- clasa C - densitate celulară foarte mare.

Acestor clase le corespund anumite cantități de produs (notate în protocolul de lucru) care va fi depus pe lama de sticlă.

Etapa următoare constă în depunerea celulelor în monostrat pe lama de sticlă prin centrifugare, într-o cameră citologică specială care se atașează lamei. Se utilizează numai lame pretratate cu pöllizină. Această etapă implică mai mulți pași și anume:

- montarea lamei într-un suport special,

- fixarea camerei citologice pe lamă, în care se pun 1,5 ml soluție adeziv și o cantitate de probă conform densității celulare citite la nefelometru,
- centrifugare 10 minute la 3200 rotații / minut,
- anucarea lichidului rămas în camera citologică după centrifugare,
- demontarea lamelor din suport (se obține un frotiu rotund cu diametrul de 1,7 cm),
- uscarea frotiurilor la temperatura camerei,
- dezinfectarea și spălarea camerelor citologice,
- colorarea frotiurilor prin metoda Papanicolaou.

Această metodă poate fi aplicată și altor produse decât cele ginecologice care sunt prelucrate în mod asemănător, cu deosebirea că se folosesc alte camere citologice (cu trei spoturi).

Interpretarea citologică a frotiurilor se face numai cu ajutorul Sistemului Bethesda.

Avantajele metodei sunt următoarele:

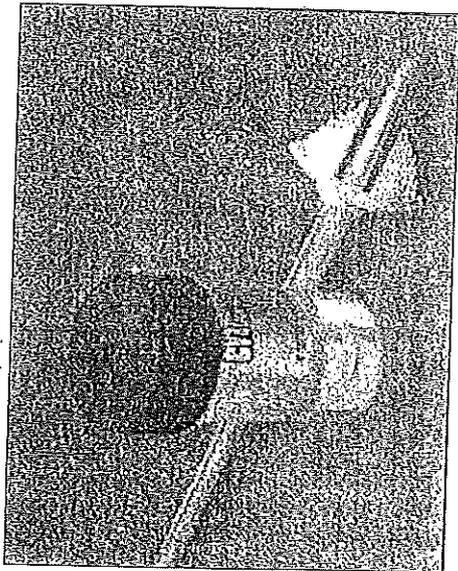
- utilizarea numai a unui dispozitiv pentru recoltarea atât de la nivelul exocolului, cât și de la nivelul endocolului,
- prelevarea fără pierdere de celule,
- eșantionul de examinat este reprezentativ și conține toate elementele necesare diagnosticului,
- reducerea semnificativ a timpului de examinat (de la 20 minute la 5 minute) datorită suprafeței mici a frotiului,
- păstrarea caracteristicilor diagnostice ale agregatelor celulare (papile, placarde) și în cazul tendinței la disociere celulară,
- rămâne o abundență cantitate de material recoltat care poate fi folosit pentru refacerea frotiurilor (prin dihuare sau concentrare) sau pentru teste complementare,
- creșterea sensibilității și specificității,
- amortizarea cheltuielilor aferente într-o perioadă scurtă de timp.

Sistemul CYTYC THINPREP 2000, bazat pe o metodă de filtrare, a fost primul dispozitiv aprobat de FDA (Food and Drug Administration) pentru probele ginecologice. Recoltarea se poate face cu o periuță exo-endocervicală sau combinat cu o spatulă de plastic și o periuță endocervicală. Dispozitivul este agitat într-un recipient ce conține fixatorul PreservCyt și apoi trimis la laborator. Procesorul ThinPrep 2000 introduce în acest recipient un cilindru cu filtru detașabil și amestecă proba, dispersează mucusul, sângele și detritusul. Suspensia celulară trece printr-un filtru policarbonat cu ajutorul unui sistem de aspirație în vid până la depozitarea unei cantități suficiente de celule la suprafața filtrului. Filtrul se detașează apoi și celulele sunt depuse pe o lamă de suclă prin amprentare, obținându-se un frotiu circular cu diametrul de 20 mm. Colorarea se face tot prin metoda Papanicolaou, iar interpretarea conform Sistemului Bethesda.

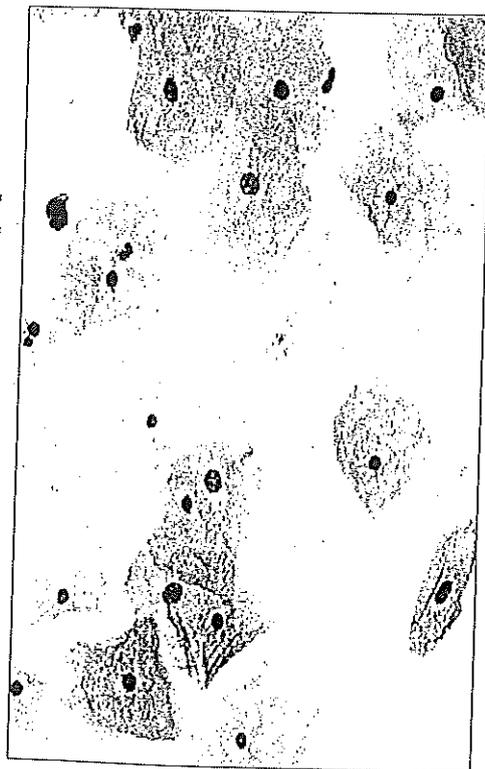
AUTOCYTE PREP (Tripath) folosește metoda sedimentării conform gradientului de densitate. Dispozitivul de recoltare este introdus în lichidul de conservare Cytorich. Mixarea și omogenizarea probei se efectuează manual cu ajutorul unei seringi. Un gradient de densitate separă hematiile, celulele

inflamatorii sau detritusul de celulele utile pentru diagnostic. Suspensia celulară este apoi centrifugată, iar celulele sunt depuse pe lama de sticlă, rezultând în final un frotiu circular cu diametrul de 13 mm.

Datele din literatură sugerează că introducerea citologiei lichide în monostat în practica medicală va reduce frecvența froturilor inadecvate de la 10% la 1-2%.

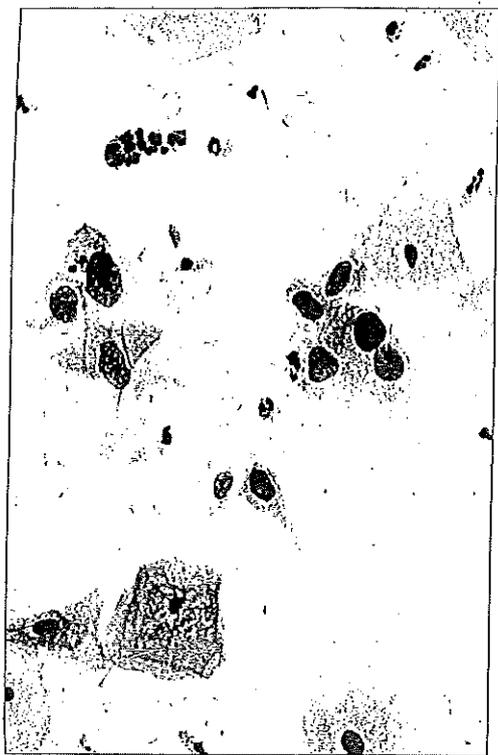


Flacon CytEasy cu dispozitiv Cytotrap

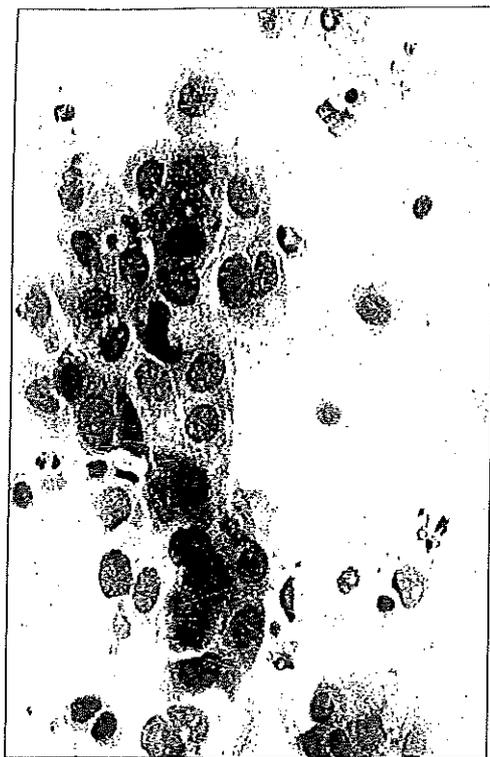


*Frotiu monostat (Sistemul Cytoscreen)
Colorație Papanicolaou, x 200*

222

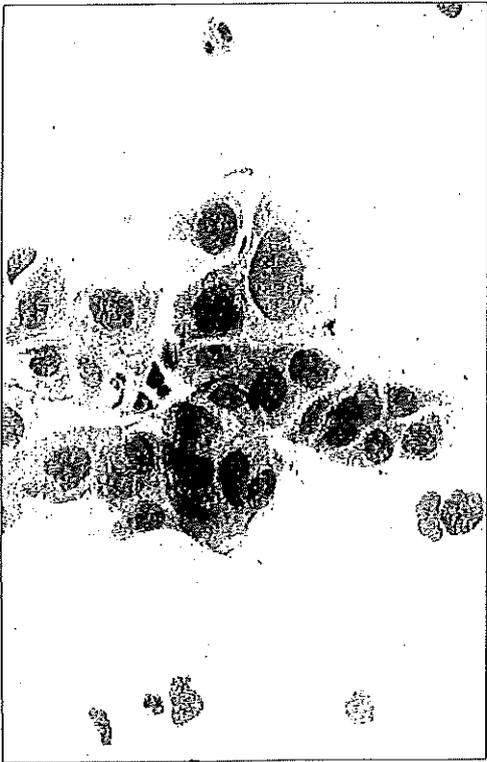


*Frotiu monostat (Sistem Cytoscreen) –
Leziune intraepitelială scuamoasă de grad scăzut (LSIL)
Colorație Papanicolaou, x 200*



*Frotiu monostat (Sistem Cytoscreen)
Leziune intraepitelială de grad înalt (HSIL)
Colorație Papanicolaou, x 400*

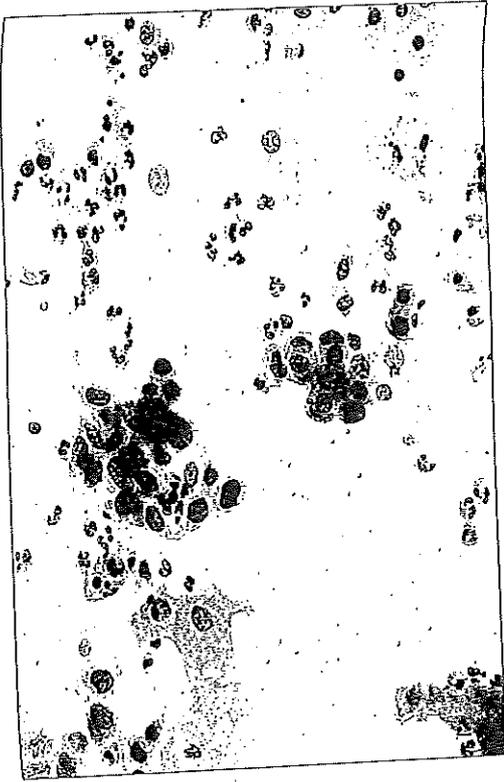
223



*Frotiu monostrat (Sistem Cytoscreen)
Leziune intraepitelială scuamoasă de grad înalt (HSIL) – carcinom in situ
Colorație Papanicolaou, x 400*



*Frotiu monostrat – celule glandulare atipice
cu semnificație nedeterminată (AGUS)
Colorație Papanicolaou, x 100*



*Frotiu monostrat – carcinom scuamos
Colorație Papanicolaou, x 200*



*Frotiu monostrat – carcinom scuamos
Colorație Papanicolaou, x 200*

CAPITOLUL XIV

ASIGURAREA ȘI ÎMBUNĂTĂȚIREA CALITĂȚII ÎN CITOLOGIE

Asigurarea calității diagnosticului citologic (QA) presupune o monitorizare sistematică a parametrilor de calitate și a rezultatelor controlului calității, cu rolul de a asigura că toate sistemele funcționează într-o manieră corespunzătoare menținerii vieții. Aceasta presupune un efort coordonat în realizarea diferitelor activități în cadrul laboratorului destinate depistării, controlului și prevenirii apariției erorilor (depistarea și evitarea rezultatelor fals negative). Programul complet de asigurare a calității presupune controlul factorilor mecanici, de mediu, tehnici și umani, eforturi continue pentru îmbunătățirea tehnicii, precum și metode pentru atingerea standardelor de calitate dorită.

Toate acestea sunt cuprinse în programul de creștere continuă a calității (*continuous quality improvement program*) care implică un efort multidisciplinar. Calitatea recoltării frotiului având efect direct asupra performanței laboratorului de citologie. Astfel, în citopatologie, procesul de creștere continuă a calității cuprinde toate etapele din momentul recoltării unui produs și până la finalizarea diagnosticului citologic. Elementele specifice care se monitorizează includ:

- etichetarea probei,
- informația clinică,
- timpul scurs până la aducerea probei în laborator,
- calitatea și timpul necesar prelucrării citologice,
- calitatea interpretării frotiurilor de către citopatolog (incluzând acuratețea, claritatea diagnosticului și timpul necesar elaborării acestuia),
- calitatea și timpul scurs până la eliberarea rezultatelor.

Se recomandă criteriile minime pentru acceptarea sau respingerea frotiurilor care cuprind:

- numele și prenumele pacientei sau alte date de identificare,
- vârsta sau data nașterii,
- istoric de frotiuri anormale în antecedente, biopsie sau tratament; precizarea zonei de unde s-a recoltat frotiul și data recoltării (criterii recomandate de *US Government Printing Office, Superintendent of Documents in Federal Register, vol. 57, no. 40, 2-28-92, Washington, DC*). Este necesară precizarea pe biletul de trimitere a istoricului de frotiuri anormale în antecedente deoarece în acest mod se poate face o revizuire ierarhică a acestora sau rescreening țintit. Menționarea datei

ultimei menstruații nu mai este obligatorie deoarece nu se mai recomandă precizarea pe froțiuni a celulelor endometriale la femeile în premenopauză.

Programul de creștere continuă a calității include o serie de termeni statistici:

1. *Rezultate real pozitive (TP)* – cazurile maligne diagnosticate citologic și histologic (prin biopsie sau necropsie).

2. *Rezultate real negative (TN)* – cazurile benigne diagnosticate citologic și histologic.

3. *Rezultate fals pozitive (FP)* – cazurile maligne diagnosticate citologic pozitive și histologic negative.

4. *Rezultate fals negative (FN)* – cazurile maligne citologic negative, iar histologic pozitive.

5. *Frecvența rezultatelor fals negative:* $FN \times 100 / (FN + TP)$.

6. *Frecvența rezultatelor fals pozitive:* $FP \times 100 / (FN + TP)$.

7. *Sensibilitatea:* posibilitatea citodiagnosticului pozitiv la un pacient cu o anumită boală; se calculează prin raportul: $TP \times 100 / (TP + FN)$.

8. *Specificitatea:* posibilitatea citodiagnosticului negativ la un pacient fără boală; se calculează prin raportul: $TN \times 100 / (TN + FP)$.

9. *Valoarea predicativ pozitivă:* posibilitatea ca un rezultat citologic pozitiv să reprezinte existența reală a bolii; se calculează prin raportul: $TP \times 100 / (TP + FP)$.

10. *Valoarea predicativ negativă:* posibilitatea ca un rezultat citologic negativ să reprezinte absența reală a bolii: $TN \times 100 / (TN + FN)$.

11. *Eficiența (acuratețea)* este posibilitatea ca rezultatul testului citologic să fie corect; se calculează cu formula:

$$(TP + TN) \times 100 / (TP + FN + TN + FP)$$

12. *Raportul de probabilitate (LR)* este raportul a două probabilități (în cazul rezultatului pentru același test): probabilitatea ca boala să fie prezentă și probabilitatea ca boala să fie absentă. LR poate fi exprimat ca pozitiv (LR +) sau negativ (LR -).

LR (+) este expresia probabilității ca un diagnostic să fie pus la un pacient cu boală, față de un pacient fără boală și se calculează cu formula: TP / FP .

LR (-) este probabilitatea ca diagnosticul să nu fie pus la un pacient cu boală, față de un pacient fără boală și poate fi exprimat astfel: FN / TN .

Raporturile de probabilitate sunt utile pentru clinicienii în luarea deciziei deoarece ele pot fi utilizate împreună cu pretesul clinic de posibilitate a existenței bolii pentru a calcula posttesul clinic de posibilitate a prezenței bolii.

Erorile depistate în timpul metodelor de asigurare a calității se pot clasifica în patru categorii generale:

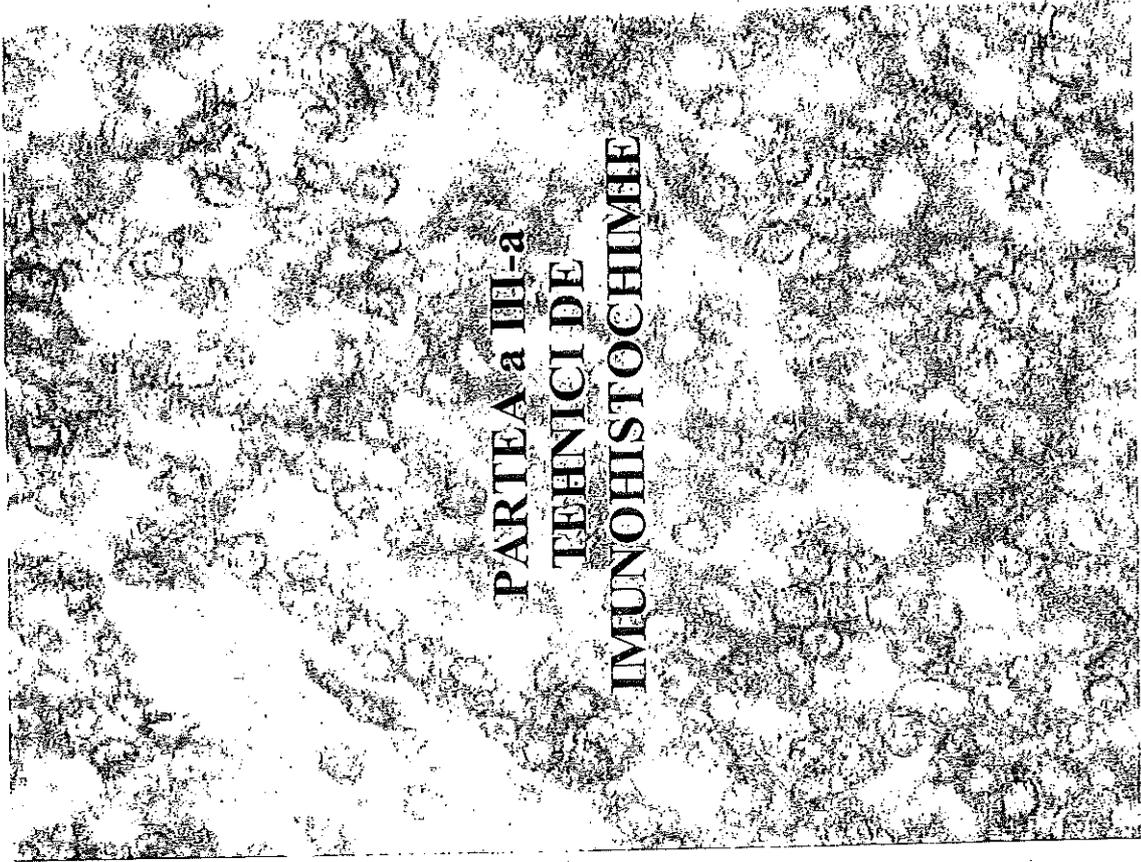
a. *Categoria I* include erorile administrative.

b. *Categoria a II-a* include erorile minore fără impact asupra îngrijirii pacientului; erorile gramaticale care determină rapoarte citologice confuze sau ambigue; imposibilitatea realizării unor colorații speciale, teste de imunocitochimie, blocuri celulare sau flow citometric.

c. *Categoria a III-a* include discrepanțele între diagnosticul inițial și diagnosticul ulterior (după revizuirea preparatelor).

d. *Categoria a IV-a* include erorile majore de diagnostic care pot determina un management necorespunzător atunci când nu sunt corectate imediat.

Programul de creștere a calității interne ar trebui să asigure calificări minime pentru personalul laboratorului și să ofere modalități prin care acest personal să-și poată îmbunătăți atât calitatea muncii depuse cât și satisfacția profesională (legate una de cealaltă).

The image shows a microscopic view of tissue, likely a histological section, with a grainy, high-contrast appearance. The text is overlaid on the center of the image.

PARTEA a III-a
TEHNICI DE
IMUNOHISTOCHEMIE