

Metodiche di biopsia istologica.

Preparazione e conservazione dei campioni istologici

Giorgio Romanelli

Indicazioni per una corretta biopsia

I tratti biopistici devono sempre essere considerati come contaminati da cellule neoplastiche. Per limitare al massimo tale evenienza e le sue possibili conseguenze, è necessario rispettare alcune regole:

1. La biopsia deve essere eseguita usando strumenti affilati per ridurre al minimo la necrosi tissutale locale ed il sanguinamento
2. Lo spazio morto deve essere correttamente oblitterato per limitare la formazione di un seroma intratumorale che potrebbe forzare cellule neoplastiche nelle vene
3. La biopsia deve sempre essere eseguita in modo tale che il tratto biopistico sia poi incluso nella exeresi definitiva
4. Evitare zone chiaramente infette o necrotiche che non sarebbero rappresentative
5. Evitare assolutamente l'uso di strumenti termici perché necrotizzano il tessuto rendendo il campione ininterpretabile

Tecniche di biopsia istologica

Le tecniche di biopsia appartengono a 2 categorie: escissionali ed incisionali. Per biopsia escissionale si intende l'asportazione totale della neoplasia con conseguente esame istologico senza nessun tipo di indagine diagnostica preoperatoria se non citologica. Di conseguenza le indicazioni reali sono relativamente scarse ed è preferibile eseguire sempre almeno un'agoaspirazione prima della terapia definitiva, al fine di conoscere il comportamento neoplastico e poter quindi calcolare l'eventuale dose chirurgica appropriata.

La biopsia escissionale si esegue di solito chirurgicamente anche se è possibile, in caso di neoformazioni particolarmente piccole, l'uso di punch di grosso diametro.

Indicazioni per la biopsia escissionale

Cavo orale

In caso di neoplasia di piccole dimensioni senza o con limitata invasione ossea all'esame radiografico, la scelta di un intervento di mandiblectomia o maxillectomia senza esame preoperatorio è corretta

Cute e sottocute

Neoplasie di dimensioni inferiori a 0.5-1 cm di Ø, quando è possibile, senza conoscere l'istotipo, una resezione chirurgica con un margine di 1,5-2 cm. È evidente che c'è quindi una differenza sostanziale fra una neoplasia di 2 cm di Ø sul torace di un alano ed una di 0.5 cm di Ø sulla palpebra di un gatto. In caso l'istologia dia un esito di exeresi incompleta la biopsia non è deve più considerarsi escissionale ma diventa a tutti gli effetti incisionale.

Fegato

Se la citologia è già indicativa di neoplasia epato o colangiocellulare, e se l'esame ecografico e tomografico indicano la possibilità di una resezione completa, la biopsia preoperatoria è superflua

Intestino

Se la citologia è già indicativa di neoplasia non linfatica, e se l'esame ecografico e tomografico indicano la possibilità di una resezione completa, la biopsia preoperatoria è superflua

Mammella

Nella maggior parte dei casi l'intervento corretto è la mastectomia. Unica eccezione è il sospetto di un carcinoma infiammatorio che non deve essere affrontato chirurgicamente

Milza

In caso di splenomegalia asimmetrica, la possibilità che si tratti di una neoplasia, molto spesso maligna, sono così elevate che il trattamento più corretto è la splenectomia totale. Inoltre anche in caso un esame diagnostico dia come risultato una neoplasia benigna o un ematoma, la splenectomia è sempre indicata per scongiurare una possibile rottura con conseguente emoaddome

Polmone

Le neoplasie polmonari sono difficilmente confondibili con altre patologie dal punto di vista radiografico e tomografico. Se la citologia è già indicativa di neoplasia la biopsia preoperatoria è superflua

Surrenale

L'esame biotico incisionale non è indicato in soggetti con neoplasia secernente ma si deve procedere direttamente all'adrenalectomia.

Testicoli

La biopsia incisionale non è indicata ma è consigliata l'orchietomia

Tiroide e paratiroide

La biopsia incisionale non è indicata per l'elevato pericolo di emorragia. Se la citologia è già indicativa di neoplasia la tiroidectomia e la paratiroidectomia sono l'opzione più corretta

Utero ed ovaie

Se la citologia è già indicativa di neoplasia la biopsia preoperatoria è superflua

Vescica

La biopsia incisionale è solitamente controindicata, per l'elevata possibilità di disseminazione neoplastica

La biopsia incisionale può essere eseguita chirurgicamente, mediante strumenti quali il punch, l'ago di Jamshidi e l'ago di Tru-Cut, endoscopicamente e per via laparo e toracoscopica mediante apposite pinze. Inoltre la biopsia può essere eseguita sotto visione diretta o guidata con ecografo, fluoroscopio, TAC o RMN.

Biopsia incisionale chirurgica

Si esegue usando un bisturi per tagliare un cuneo della neoplasia. Tale tecnica è indicata per tutte le neoformazioni che possono essere visualizzate, siano esse esterne o cavitare ed è semplice ed economica non richiedendo nessuno strumento particolare.

Sono richiesti l'anestesia generale ed una preparazione chirurgica del campo operatorio.

In caso di neoplasie cutanee si campiona direttamente la neoplasia. Per le neoplasie sottocutanee è corretto eseguire un'incisione sulla cute sovrastante per arrivare sulla neoplasia. E' importante che la sezione ottenuta sia sufficientemente spessa e profonda in modo da essere rappresentativa.

Una volta ottenuto il campione sono sufficienti pochi punti di sutura cutanea. Se possibile, si può applicare per qualche giorno un bendaggio moderatamente compressivo.

Punch

E' uno strumento, monouso o risterilizzabile, che permette di ottenere delle sezioni circolari di vario diametro e profondità. L'uso è estremamente semplice. Basta appoggiarlo sulla superficie da biopsare e, con movimenti rotatori, fare affondare il tagliente. Una volta ottenuta la sezione, si afferra con piccole pinze da prese la sezione ottenuta e si taglia la superficie inferiore.

E' lo strumento più indicato per ottenere biopsie cutanee in malattie dermatologiche ma può essere usato anche per biopsie epatiche e biopsie intestinali a tutto spessore. L'uso per le neoplasie cutanee è limitato a quelle di piccole dimensioni. Non ha invece indicazione nella biopsia di quelle sottocutanee, vista la scarsa profondità che è in grado di raggiungere.

Tru-Cut

Strumento estremamente versatile composto di una parte scanalata e da un tagliente che vi scorre sopra. Al momento della penetrazione del tessuto da biopsare, basta far scorrere il tagliente per raccogliere il campione.

Ne esistono di diversi diametri (da 14 a 22G), di diverse lunghezze, con meccanismo manuale o a scatto e con punta ecoriflettente, particolarmente utile per le biopsie ecoguidate

L'ago di Tru-Cut è indicato praticamente per tutte le biopsie tranne quelle ossee e può essere usato sotto visione diretta o guidato con ecografia, fluoroscopia, TAC o RMN.

In caso di neoformazioni di grosse dimensioni è importante campionare più punti cercando di evitare il centro che è normalmente necrotico e non rappresentativo.

L'unica reale limitazione del Tru-Cut sta nelle scarse dimensioni del campione ottenuto, soprattutto usando i diametri più piccoli.

Ago di Jamshidi

E' usato solo per la biopsia ossea ed osteomidollare ed è composto di un tagliente a punta conica e da un mandrino a punta. Dopo aver eseguito una piccolissima incisione cutanea a punta di bisturi si punta l'ago sull'osso, si toglie il mandrino e si avanza il tagliente con movimenti rotatori in modo da ottenere una carota d'osso corticomidollare. L'ago va poi ruotato velocemente su se stesso per staccare il campione dalla base e farlo aderire alle pareti interne dello strumento. Il frammento va poi estratto spingendolo dalla punta e non dall'impugnatura, poiché, essendo la punta conica, se si facesse al contrario non si riuscirebbe ad estrarlo ma lo si impaccherebbe nella punta.

Indicazioni per un approccio bioptico ai vari organi

Cavo orale

Ago aspirazione od ago infissione. Incisionale con bisturi, punch o Tru-Cut. Ottenere più frammenti da punti diversi cercando di evitare le zone evidentemente necrotiche. Escissionale (mandibolectomia e maxillectomia)

Cute e sottocute

Ago aspirazione od ago infissione. In caso di aspirazione di liquido, anche questo va esaminato. L'aspirazione va poi ripetuta da zone solide. Escissionale se di piccole dimensioni. Incisionale con bisturi, punch o Tru-Cut. In caso di neoformazioni di grosse dimensioni spesso l'uso di un punch non permette di ottenere campioni sufficientemente rappresentativi. E' preferibile un'ampia biopsia incisionale con bisturi. Usando un Tru-Cut, è necessario evitare la zona centrale che spesso è necrotica e non rappresentativa.

Cervello e cervelletto

Ago aspirazione e Tru-Cut TAC o RM guidato attraverso una piccola trapanazione cranica

Fegato

Ago aspirazione ed ago infissione usando aghi molto sottili (25 o 26G). Tru-Cut ecoguidato o TAC guidato. Monitorare attentamente per emorragia. Biopsia laparoscopica. Incisionale durante esplorazione chirurgica con Tru-Cut, punch o metodo a ghigliottina. Escissionale (epatectomia)

Linfonodi

Ago aspirazione o, preferibilmente, ago infissione. Escissionale, incisionale o Tru-Cut.

Mammella

Ago aspirazione od ago infissione spesso scarsamente diagnostiche e poco indicate. Preferibilmente biopsia escissionale (mastectomia). Punch od incisionale con bisturi in caso di sospetto di carcinoma infiammatorio

Midollo spinale

Ago aspirazione usando aghi molto sottili (25 o 26G).

Midollo osseo

Ago aspirazione con ago apposito. Biopsia osteomidollare con ago di Jamshidi

Milza

Ago aspirazione od ago infissione usando aghi molto sottili (25 o 26G). No biopsia se non escissionale (splenectomia)

Osso

Ago di Jamshidi. Ottenere più campioni ponendo particolare attenzione a non indebolire troppo l'osso in caso di neoplasie particolarmente litiche.

Parete toracica ed addominale

Ago aspirazione od ago infissione. Incisionale con bisturi, punch o Tru-Cut. In caso di neoformazioni di grosse dimensioni spesso l'uso di un punch non permette di ottenere campioni sufficientemente rappresentativi. E' preferibile un'ampia biopsia incisionale con bisturi. Usando un Tru-Cut, è necessario evitare la zona centrale che spesso è necrotica e non rappresentativa. In caso di neoplasie costali, usare ago di Jamshidi con le stesse modalità usate per l'osso.

Polmone

Ago aspirazione ed ago infissione usando aghi molto sottili (25 o 26G). Tru-Cut ecoguidato, solo se la neoformazione è attaccata alla pleura parietale, o TAC guidato.

Monitorare attentamente l'evenienza di un pneumotorace. Biopsia toracoscopica. Escissionale (lobectomia parziale o totale)

Prostata

Ago aspirazione ed ago infissione transaddominali, preferibilmente ecoguidati. Ago aspirazione transrettale. Tru-Cut ecoguidato, usando aghi non più grossi di 18G. A

Rene

Ago aspirazione ed ago infissione, preferibilmente ecoguidati. Tru-Cut ecoguidato o TAC guidato, usando aghi non più grossi di 18G. Escissionale (nephrectomia)

Salivari

Ago aspirazione ed ago infissione. Incisionale con bisturi, punch o Tru-Cut.

Stomaco ed intestino

Ago aspirazione ed ago infissione, preferibilmente ecoguidati. Tru-Cut ecoguidato, usando aghi non più grossi di 18G. Biopsia endoscopica. Escissionale (gastrectomia ed enterectomia)

Surrenale

Ago aspirazione ed ago infissione, preferibilmente ecoguidati. La citologia non è in grado di differenziare fra forma maligne e benigne. Tru-Cut ecoguidato o TAC guidato, usando aghi non più grossi di 18G e ponendo estrema attenzione ai grossi vasi vicini. Escissionale (adrenalectomia) consigliata

Testicoli

Ago aspirazione ed ago infissione usando aghi molto sottili (25 o 26G). Escissionale (orchietomia)

Tiroide e paratiroide

Ago aspirazione ed ago infissione. La citologia non è in grado di differenziare fra forma maligne e benigne. Campioni normalmente molto ematici ma che vanno ugualmente esaminati. Evitare biopsia se non escissionale (tiroidectomia e paratiroidectomia)

Timo

Ago aspirazione ed ago infissione, preferibilmente ecoguidati. Tru-Cut ecoguidato o TAC guidato, usando aghi non più grossi di 18G e ponendo estrema attenzione ai grossi vasi vicini. Escissionale (timestomia)

Utero ed ovaie

Ago aspirazione ed ago infissione, preferibilmente ecoguidati. Tru-Cut ecoguidato, usando aghi non più grossi di 18G. Escissionale (ovarioisterectomia)

Vescica

Brush con spazzola. Biopsia aspirativa con catetere. Biopsia cistoscopica. L'ago aspirazione transvescicale e la biopsia incisionale possono essere accompagnate da disseminazione neoplastica sul tratto.

Preparazione e conservazione dei campioni istologici

Una volta ottenuto il campione, è importante seguire una scaletta corretta che passa attraverso delle fasi fisse: campionatura, ricostruzione, orientamento e colorazione, fissazione e compilatura della scheda di accompagnamento.

Campionatura

Tranne rare eccezioni (es. tumori splenici), i campioni da sottoporre ad esame istologico devono essere fissati interi in modo che il patologo possa esaminare i margini d'exeresi chirurgica. I pezzi di piccole e piccolissime dimensioni, le biopsie ottenute con aghi di Jamshidi, Tru-Cut e Punch e le biopsie endoscopiche possono essere fissati senza ulteriore lavorazione. E' bene che siano però correttamente orientati e fissati appoggiati su un cartoncino o, meglio ancora, usando un'apposita

cassetta da fissazione con una spugna. L'uso della cassetta permette di evitare di ricercare un pezzo, a volte microscopico e spesso ricoperto di sangue, nel vaso di fissativo e di potere procedere a fissazione, colatura di paraffina e taglio senza che sia toccato.

Ricostruzione

Nella lavorazione di alcune neoplasie, soprattutto di quelle cutanee e sottocutanee, è importante ristabilire i corretti rapporti anatomici onde evitare che la valutazione dei margini di escissione da parte del patologo, risulti non veritiera.

Dopo l'exeresi, infatti, i tessuti profondi, soprattutto gli strati muscolari e fasciali tendono a scivolare sui lati, non essendo più connessi alle parti vicine. E' quindi necessario ristabilire i corretti rapporti anatomici, fissando con alcuni punti di sutura, le fasce ed i muscoli nella giusta posizione.

Orientamento e colorazione

Prima della fissazione è necessario, in caso di pezzi chirurgici, colorare i margini di escissione, affinché il patologo possa correttamente controllare la completezza della exeresi. I coloranti usati sono l'inchiostro di china e la tempera. Quest'ultima ha il vantaggio di lasciare uno strato più spesso e quindi più facilmente individuabile. La colorazione è basilare per poter individuare il margine una volta che il campione, immerso nel fissativo, tende ad accartocciarsi su se stesso. Prima della colorazione è necessario lasciare asciugare la superficie per qualche minuto in modo da aumentare la tenuta. I coloranti si stendono usando dei cotton-fiocci o le dita in caso di neoformazioni di grosse dimensioni. Prima di introdurre i pezzi colorati nel fissativo bisogna lasciarli all'aria fino a che il colore non è asciutto per evitare che si diluisca nel liquido.

Fissazione

Il fissativo più usato è la formalina tamponata al 10%. E' consigliabile usare la formalina pronta per istologia piuttosto che prepararla partendo da liquidi più concentrati che non sono additivati con tampone. E' bene ricordare che la formalina ha un potere ridotto di penetrazione e che si deve sempre rispettare un rapporto di almeno 10:1 col campione da fissare.

Anche i contenitori devono rispettare alcuni requisiti: devono essere di materiale infrangibile, non di vetro, ed avere un collo più ampio della base in modo da permettere la corretta manipolazione del campione senza doverlo forzare

dall'imbocatura o, peggio ancora, senza dovere richiedere la rottura del vaso per poterlo estrarre.

I campioni devono permanere nella formalina almeno 24 ore per una corretta fissazione.

Meno usati sono il fissativo di Buin e la glutaraldeide che è usata per fissare campioni da esaminare mediante microscopia elettronica.

Preparazione, colorazione e conservazioni dei diversi tessuti

Cavo orale

Colorare i margini chirurgici compresa la superficie di taglio dell'osso. Orientare con punti o coloranti diversi. Praticare ogni centimetro dei tagli non completi sulla superficie opposta a quella colorata per permettere la penetrazione della formalina. Fissare il pezzo intero.

Cute e sottocute

Riposizionare in modo anatomico i tessuti profondi e fissarli con qualche punto di sutura in modo da impedire lo slittamento. Colorare i margini chirurgici. Orientare con punti o coloranti diversi. (fig 15) Praticare ogni centimetro dei tagli non completi sulla superficie opposta a quella colorata per permettere la penetrazione del fissativo. Fissare il pezzo intero. In caso di neoplasie di dimensioni rilevanti è ammesso isolare la zona marginale e fissarla a parte con campioni del tumore

Cervello e cervelletto

Colorare e fissare interi

Intestino

Colorare i due margini di resezione e fissare il pezzo intero. In alternativa, resecare un ulteriore mezzo centimetro di intestino sano da entrambe le parti, colorare il margine verso la neoplasia e fissare margini e neoplasia intera.

Mammella

Isolare ogni singolo nodulo con un margine di tessuto attorno ed identificarlo con punti di sutura. Isolare i linfonodi inguinali nel grasso. Fissare i pezzi interi

Midollo spinale

Colorare e fissare i pezzi interi

Milza

Campionare 4 o 5 frammenti di 1-2 cm³ da punti diversi, evitando la parte più emorragica, per assicurarsi di avere un campione rappresentativo e fissare. Conservare tutta la neoformazione fino al ricevimento dell'esito dell'istologico, onde evitare di avere un risultato non conclusivo e non avere più tessuto a disposizione

Ossso

Isolare il frammento osseo dai tessuti molli, tagliare in sezioni di 1 cm e fissare. In caso di trapianto osseo il frammento escisso deve essere colorato e tagliato per permettere la penetrazione del fissativo.

Allegare la superficie di taglio

Nervi periferici

In caso di neoplasie del plesso, identificare e segnare con un punto ogni radice nervosa per permettere una corretta indagine sui margini

Parete toracica ed addominale

Colorare i margini di taglio, escludendo la superficie pleurica e peritoneale che non sono dei reali margini. Riposizionare in modo anatomico i tessuti profondi e fissarli con qualche punto di sutura in modo da impedire lo slittamento. Orientare con punti o coloranti diversi. Praticare ogni centimetro dei tagli non completi sulla superficie opposta a quella colorata per permettere la penetrazione del fissativo. Fissare il pezzo intero.

Polmone, fegato e stomaco

Colorare il margine di escissione. Praticare ogni centimetro dei tagli per permettere la penetrazione del fissativo. Fissare il pezzo intero

Tiroide e paratiroide, timo, surrenale, ghiandole salivari, rene

Colorare l'intera superficie. Identificare con un punto la vena tiroidea, giugulare, frenico addominale o renale se invase da trombi. Tagliare se di dimensioni superiori ai 2 cm di Ø e fissare

Testicoli

Incidere la fascia in più punti per permettere la penetrazione del fissativo. In caso di noduli di piccole dimensioni, identificarli con un punto. Non è necessario colorare. In caso di invasione del funicolo, identificarne il margine di taglio con un punto

Utero ed ovaie

Colorare il margine di taglio sul moncone. Esaminare sempre entrambe le ovaie anche se una è morfologicamente normale

Vescica

In caso di cistectomia parziale colorare il margine di taglio e fissare intero

Scheda d'accompagnamento

I contenitori devono essere correttamente etichettati in modo indelebile per evitare scambi ed è bene che campioni diversi dello stesso soggetto (es. tumore, linfonodo drenante e sospetta metastasi epatica) siano posti in contenitori diversi o, se posti nello stesso recipiente, correttamente identificati con un colorante diverso od un punto di sutura.

Tutti i pezzi istologici devono obbligatoriamente essere correlati di una scheda accompagnatoria completa che deve comprendere almeno:

- Specie, razza, sesso ed età
- Sito anatomico del tumore
- Dimensioni ed aspetto clinico
- Aspetto radiografico
- Trattamenti farmacologici effettuati
- Modalità d'accrescimento
- Presenza d'eventuali metastasi a distanza
- Tipo di prelievo (biopsia/escissione completa)

Se la spedizione è effettuata per posta, è necessario controllare la perfetta tenuta dei contenitori ed è bene che i fogli d'accompagnamento siano protetti con una busta impermeabile

Interpretazione dei risultati

Il compito del patologo è quello di determinare:

- Se è un tumore o meno
- Se è benigno o maligno
- L'istotipo
- Il grado
- La completezza d'escissione

Un referto corretto deve quindi comprendere:

- Descrizione macroscopica del campione ricevuto
- Descrizione microscopica
- Diagnosi
- Completezza d'escissione in caso di biopsia escissionale
- Grado quando indicato

Nel momento in cui si riceve il referto, la cosa più importante è capire se la diagnosi patologica si adegua correttamente alla presentazione clinica.

In caso contrario od ogni volta ci sia un dubbio è basilare interpellare il patologo per discutere la diagnosi ed il clinico non deve esitare a richiedere una seconda opinione né il patologo deve sentirsi offeso per tale richiesta.

E' importante ricordare che, come ogni interpretazione clinica, l'istologia non è scevra da errori (fra il 5 ed il 10%), che possono cambiare completamente sia l'approccio clinico sia la prognosi e che la percentuale d'errore può essere molto più alta se i campioni sono esaminati da un patologo umano, soprattutto in caso di mastocitoma, istiocitoma cutaneo, tumore venereo trasmissibile ed adenoma perianale che non esistono in medicina umana.

Una biopsia correttamente ottenuta, conservata, presentata ed interpretata è una delle parti più importanti della diagnosi, del trattamento e della prognosi conseguente in soggetti con neoplasia.

Troppo spesso i tumori asportati non sono sottoposti ad esame istologico perché si suppone che il proprietario non voglia pagarlo. A questo riguardo ci deve convincere che non solo l'esame deve far parte dell'intervento ed il costo deve essere incluso nella parcella del trattamento chirurgico, ma che la sua mancanza potrebbe in teoria creare problemi medico legali in caso di contestazione per l'operato del medico

Il testo è tratto con il permesso dell'editore dal libro: Oncologia del cane e del gatto
Masson