

Uzimanje, obrada uzorka i procena adekvatnosti uzorka u citopatologiji pluća

Milosav Kiurski

Služba za kliničku patologiju, KBC Zemun, Srbija

Apstrakt

Konvencionalna citologija dugo ima ulogu u dijagnostici primarnog i metastatskog karcinoma pluća. Mnogi faktori utiču na izbor primenjene tehnike, na primer: mesto lezije, njena veličina, tumačenje radiološke slike, ozbiljnost simptoma, kao i manuelna spretnost i naklonjenost doktora određenoj tehnići. U radu su prikazane najvažnije tehnike uzorkovanja i obrade preparata kao glavni faktor uspešnosti dobre patohistološke analize.

Ključne reči: citopatologija, pluća, uzorak

Uvod

Konvencionalna citologija¹ već dugo ima ulogu u dijagnostici primarnog i metastatskog karcinoma pluća. Ispitivanje histoloških i citoloških uzoraka ima ključnu ulogu u dijagnostici i stadiranju karcinoma pluća. U vreme dijagnoze oko 90% pacijenata ima simptome povezane sa lokalnom zahvaćenošću bronha i pluća, invazijom okolnih struktura ili metastazama, opštim efektima ili paraneoplastičnim sindromom². Posle radiografije grudnog koša, najčešće se koristi fiberoptička bronhoskopija, pomoću koje se vide endobronhijalne lezije i uzimaju uzorci.

Savremene tehnike uzorkovanja koje se koriste u citološkom analizi pluća su date u Tabeli 1.

- Sputum (izazvan ili spontano iskašljan), spada u eksfolijativnu citologiju
- Čelije dobijene bronhoskopijom, spada u abrazivnu citologiju
 - Metoda "četkanja"- engl. *bronchial brushing* (BB)
 - Metoda "pranja - *bronchial washing* (BW)
 - Metoda "ispiranja" - *bronchial lavage* (BAL)
- Čelije dobijene tankom igлом (engl. *fine needle aspiration*) (FNA), spada u aspiracionu citologiju
- Transbronhijalna FNA sa ili bez endobronhijalnog ultrazvuka (EBUS)
- Perkutana transtorakalna FNA
- Metoda otiska plućnog tkiva -"imprint"- spada u intraoperativnu citologiju
- Čelije dobijene iz plućne arterije/kapilara

Tabela 1. Tehnike koje su na raspolaganju za citološku analizu plućnih lezija

Taking, processing sampling and evaluation of the adequacy of the samples in lung cytopathology

Milosav Kiurski

Department of Clinical Pathology, CHC Zemun, Serbia

Abstract

The conventional cytology has a longstanding role in the diagnostics of primary and metastatic lung carcinoma. Multiple factors have influence on the choice of technique used: for example, the location of the lesion, its size, interpretation of the radiological imaging, the seriousness of the symptoms, as well as the manual skill and commitment of the physician to certain technique. In this paper, the most important sampling techniques and sample processing are shown as the most important factors of a successful pathohistological analysis.

Keywords: cytopathology, pulmo, sample

Mnogi faktori utiču na izbor primenjene tehnike, na primer: mesto lezije, njena veličina, tumačenje radiološke slike, ozbiljnost simptoma, kao i manuelna spretnost i naklonjenost doktora određenoj tehnići.

Lokalizacija	Odgovarajuća tehnika
Proksimalna,mukozna, površna	Sputum, BB, BW
Proksimalna, submukozna	Transbronhijalna/trahealna FNA
Periferna	Transkutana FNA, BB,BAL
Peribronhijalna/trahealna/karina	Transbronhijalna/trahealna FNA
Medijastinalna	Transbronhijalna/trahealna, transkutana
ili	Endoskopski ultrasonografski vođena FNA

Tabela 2. Izbor tehnike za dobijanje citoloških uzoraka u zavisnosti od lokalizacije promene

Sputum

Spontana produkcija veće količine sputuma je čest znak oboljenja pluća. Sputum se sastoji od mukoidne supstance, kao i povećanog broja inflamatornih i epitelnih ćelija. Različit broj makrofaga, neutrofila i epitelnih ćelija i njihova morfološka alteracija sigurno ukazuju na postojeći patološki proces. Slično tome, nivo pigmentacije u okviru makrofaga, kao i prisustvo ili odsustvo Karšmanovih spirala, govori više u prilog postojeće plućne patofiziologije.

a. Dobijanje uzorka i procesuiranje

Optimalni uzorci za dijagnostiku su rani jutarnji, spontano produkovani sputumi. Kada se radi o oskudno, spontano produkovanim materijalu, odnosno, kada nema sputuma uzorak se može indukovati inhalacijom slanih rastvora i sredstava za iskašljavanje. Dobijeni materijal se ne fiksira, već se dostavlja u sterilnoj posudi u laboratoriju, gde se nanosi na predmetna stakla. Sledi, sušenje razmaza, a zatim priprema i proces bojenja. Razmaze sputuma standardno bojimo HE metodom, MGG metodom i PAP metodom. Ostala tri neobojena razmaza idu u rezervu, za eventualna dodatna bojenja. Senzitivnost citologije sputuma je optimalna kada se uzimaju uzorci pet uzastopnih dana. U tom slučaju senzitivnost metode u detekciji maligniteta 90-95%^{1,3}. Ipak, tri uzastopna uzorka su opšte prihvaćen standard kao minimum za prihvatljivu senzitivnost metode. Ovaj broj uzoraka identificuje najmanje 65% karcinoma u plućima.

b. Adekvatnost uzorka

Adekvatan uzorak sputuma mora da sadrži alveolarne makrofage. Odsustvo makrofaga govori u prilog da se radi o salivi. Ne postoji mišljenje o tome koji broj alveolarnih makrofaga bi morao da bude prisutan, ali oni moraju biti lako identifikovani kao tip ćelije. Grineberg navodi da "adekvatnost uzorka sputuma je direktno proporcionalna broju alveolarnih makrofaga "⁴. Uzorak sputuma se smatra adekvatnim za evaluaciju ako se minimalno dva razmaza mogu napraviti, a u procesu mikroskopske analize se uočava masa alveolarnih makrofaga. Uz to, citološki materijal mora biti adekvatno čuvan i dobro obojen.

Uzorkovanje tehnikom četkice (engl. brushing) i tehnikom ispiranja (engl. washing)

Tehnika četkanja (BB) i ispiranja (BW) je komplementarna citologiji sputuma u dijagnostici plućnih lezija. Najčešće indikacije za bronhoskopiju su: hronični kašalj, radiografski nalaz novog solitarnog plućnog nodusa, hemoptizije, bronhijalna opstrukcija, atelektaza i dugotrajno, otežano disanje. Bronhoskopija se, takođe, može primeniti u cilju potvrde patološkog nalaza citologije sputuma. Bronhoskopija ima ograničenu

vrednost kod promena koje su lokalizovane u perifernim plućnim poljima. Indikacije za ponavljanje bronhoskopije u cilju dobijanja uzorka za citoanalizu nisu jasno formulisane, ali svakako uključuju prvu negativnu bronhicitologiju sa prethodno pozitivnim nalazom u sputumu, visoko suspektne kliničke i radiografske nalaze uz negativnu sputum citologiju, i negativnu prvu bronhicitologiju. Pojedini autori tvrde da senzitivnost ove metode raste sa 70 na 90%, ukoliko se analize rade na dva uzorka bronhicitologije, umesto na jednom uzorku^{5,6}.

a. Dobijanje uzorka

Generalno, BW tehnika se primenjuje na bilo koju klinički sumnjivu leziju. Ispiranje se radi ponovljenom instilacijom 3-5 ml sterilnog, slanog rastvora kroz bronhoskop i reaspiracijom tečnosti. Za četkanje promene se koristi mala, okrugla četkica sa tvrdim dlakama. Četkanje promene mora da prethodi uzimanju bioptičkim uzorka malim forceps klještim, zbog mogućeg krvarenja. Uzorci se pripremaju direktnim nanošenjem materijala nakupljenog na četkici po površini predmetnog stakla. Razmaz se odmah fiksira u 95% etanolu. Odložena fiksacija bi rezultirala artefaktima nastalim u procesu sušenja vazduhom i dobijanju uzorka nepodesnog za interpretaciju. U mnogim ustanovama sama četkica, odnosno njen kraj, se odvaja (seče) i uranja u sterilnu tubu sa slanim rastvorom ili Sakomanovim fiksativom (engl. Saccomanno) i transportuje u laboratoriju. U laboratoriji se četkica rola između dva zamrznuta predmetna stakla. Četkica se vraća u tubu i zajedno sa njom ide u centrifugu. Nakon centrifugiranja četkica se vadi, a sediment priprema za parafinski blok, ili kao tečnost obogaćena ćelijama koristi za razmaze za citologiju. Aspiriranu tečnost bi trebalo odmah poslati u citološku laboratoriju, gde će nakon centrifugiranja sediment biti pripremljen u vidu citološkog razmaza za analizu, ili može biti fiksiran u 10% neutralnom, puferizovanom formalinu i uklopljen u agar, pa u parafinski kalup. Kombinacija navedenih tehnika doprinosi povećanju dijagnostičke senzitivnosti.

b. Adekvatnost uzorka

Generalno, adekvatan uzorak bi trebalo da sadrži veliki broj dobro očuvanih, optimalno obojenih cilijarnih epitelnih ćelija sluznice bronha i makrofage. Uzorak koji sadrži malo ćelija ili je kontaminiran velikim brojem ćelija pločasto slojevitog epitela sluznice orofarinks ili oralnim saprofitima, treba smatrati neadekvatnim. Takođe, uzorci kontaminirani eritrocitima ili masom granulocita ili artefaktima nastalim u procesu vazdušnog sušenja trebaju se smatrati neadekvatnim za definitivnu evaluaciju. Svi navedeni razlozi neadekvatnosti moraju biti dokumentovani u izveštaju. Uzorak se može smatrati i manje adekvatnim ukoliko su kliničke informacije neadekvatne.

c. Dijagnostička tačnost

Bronhoskopski uzorci postižu senzitivnost do 90% kada se u okviru jedne bronhoskopije učini veći broj četkanja i dobije veći broj uzorka. Ovo ne samo da povećava dijagnostičku senzitivnost, već istovremeno smanjuje potrebu za rebronhoskopijom ili drugim invazivnim metodama uključujući i FNA. Uvećanje senzitivnosti zavisi od mnogo faktora uključujući veštinu endoskopiste, lokalizaciju, veličinu i histološki tip neoplazme.

Uzorkovanje tehnikom bronchoalveolarnog ispiranja (engl. bronchoalveolar lavage)

Iako invazivna, BAL ima toliko nizak morbiditet da se sa sigurnošću može primeniti kod visoko rizičnih bolesnika. BAL sa FNA tehnikom predstavljaju jedine citološke metode koje imaju pristup sadržaju i sastavu većini terminalnih vazdušnih prostora. Dok FNA citologija, generalno, zahteva lokalizovanu i ograničenu promenu, BAL citološka metoda uspešno može da eksploriše difuzne plućne bolesti. Mada postoje varijacije u tehnici BAL metode, standardni parametri su da se radi u lokalnoj anesteziji bronhoskopom 5 mm. Za ispiranje se koristi zagrejani fiziološki rastvor, a količinu rastvora najčešće određuje sama promena koja se ispituje. Veoma je važna standardizacija količine tečnosti, zbog toga što direktno utiče na rezultat citološke analize. Sama tehnika aplikovanja ponovljenih ispiranja i reaspiracije standardizovanom količinom rastvora, omogućava optimalno razdvajanje materijala dobijenog iz bronhijalnog stabla od materijala iz alveolarnih prostora. Uzorci dobijeni BAL metodom trebalo bi da se što brže transportuju do citološke laboratorije, i dalje obrade za citoanalizu.

a. Adekvatnost uzorka

Veliki broj cilijarnih ili ćelija pločasto slojevitog epitela (više od 5%) je indikacija da se radi o kontaminaciji i ukazuje da uzorak nije reprezentativan za analizu promena distalnih delova respiratornog trakta. Čemberlejn i saradnici sugerisu specifične kriterijume za ocenjivanje uzorka dobijenih BAL metodom u smislu reprezentativnosti za ocenjivanje promena u distalnim partijama respiratornog trakta⁷.

Kriterijumi za odbacivanje uzorka su sledeći:

1. Mali broj alveolarnih makrofaga na preparatu (predmetnom staklu)- manje od 10 alveolarnih makrofaga na 10 vidnih polja velikog uveličanja, ili manje od 25 alveolarnih makrofaga na velikom uveličanju u kombinaciji sa kriterijumima pod tačkom 2. ili 3.

2. Izuzetno veliki broj epitelnih ćelija, bilo sa degenerativnim promenama, bilo sa izuzetno velikim brojem alveolarnih makrofaga.

3. Mukopurulentni eksudat polimorfonuklearnih neutrofila.

4. Veliki broj eritrocita u kombinaciji sa bilo kojim (najmanje jednim) od navedenih kriterijuma za neadekvatnost uzorka.

5. Degenerativne promene ili artefakti koji ne dozvoljavaju identifikaciju prirodu ćelija.

Ipak, uzorak se može smatrati adekvatnim ukoliko je njegovom analizom moguće utvrditi specifični, patološki proces (virusnu infekciju, neoplaziju ili gljivične i bakterijske bolesti).

Uzorkovanje tehnikom aspiracije tankom iglom (engl. Fine Needle Aspiration)

Ova citološka tehnika (FNA) je najzastupljenija metoda u dijagnostici lokalizovanih plućnih lezija i najefektivnija citološka tehnika u postavljanju definitivne dijagnoze karcinoma pluća⁸.

Transtorakalna perkutana FNA je uspešna, kako u dijagnostici primarnih, tako i metastatskih tumora sa senzitivnošću između 75-95% ⁹⁻¹³. I transtorakalna perkutana FNA i transbronhijalna (Wang) FNA se koriste u ispitivanju plućnih nodusa.

A. Perkutana transtorakalna FNA

Ova metoda je zastupljenija od metode transbronhijalne FNA. U mnogim centrima ukoliko je citologija sputuma negativna, a plućna lezija perzistira na periferiji ili u vrhu pluća, transtorakalna FNA će se primeniti bez bronhoskopije. U većini slučajeva se koristi Čiba ili Grin igla kalibra 22. Tanka igla se plasira i navodi do željene lokacije pod fluoroskopijom ili pod skenerom. U momentu kada vrh igle dođe u željenu poziciju, koplje se izvlači , a zatim aktivira vakum sisaljka. Igla se naglo zabada u promenu, a zatim povlači unazad. Vakum se isključuje, igla izvlači dok pacijent zadržava dah. Dobijeni uzorak se nanosi na predmetna stakla i priprema za bojenje. Nekada se uzorci suše na vazduhu, nekada fiksiraju u 95% etanolu. Igla se ispira ili slanim rastvorom ili formalinom,a ispirak priprema za citološku analizu. Uzorci sušeni na vazduhu mogu odmah da se boje MGG metodom. Brza evaluacija se može postići odgovarajućom fiksacijom i bojenjem po brzoj PAP metodi ili zaledivanjem uzorka i bojenjem HE metodom (ex tempore). Ukoliko se materijal, neophodan za dijagnostiku, ne nalazi na preparatima, aspiracija tankom iglom se ponavlja do dobijanja zadovoljavajućeg uzorka ili dok radiolog ili pacijent ne odluče da prekinu proceduru. Brza mikroskopska analiza dobijenog materijala omogućava procenu neophodnosti drugih specijalnih analiza, uključujući imunohistohemiju, flou citometriju, elektronsku mikroskopiju i drugo. Ostatak materijala može se procesuirati citocentrifugom i dalje uklopiti u parafinski blok. Krvni koagulumi i vidljivi fragmenti tkiva se fiksiraju 10% formalinom i obrađuju do parafinskog bloka.

B. Transbronhijalna (engl. Wang) FNA

Ova metoda se prvenstveno koristila za dijagnostiku metastaza mediastinalnih limfnih čvorova. Tokom vremena postala je veoma popularna metoda u dijagnostikovanju nodularnih promena pluća u blizini glavnih bronha¹⁴⁻¹⁶. Ova procedura se redje koristi zbog dužeg vremena primene i zato što zahteva dobro obučenog bronhoskopistu. Sama tehnika nosi nizak stepen rizika i može da pruži dijagnostičke informacije kada druge tehnike, kao BW i BB ili biopsija, to nisu u mogućnosti. Metoda je korisna za ispitivanje ekstraluminalnih, bronhijalnih kompresivnih procesa, submukoznih lezija ili za ispitivanje mediastinalnih limfnih čvorova u procesu stadiranja bronhogenih karcinoma. Bronhoskopija u kombinaciji sa transbronhijalnom iglenom biopsijom dostiže senzitivnost od skoro 100% za tumore lokalizovane u velikim bronhijama¹⁷. Sam proces i tumačenje uzorka su identični metodi perkutane transtorakalne aspiracione iglene metode. Adekvatan

uzorak obično sadrži veliki broj dijagnostičkih ćelija. Neadekvatni uzorci uključuju one sa mnogo krvi, sa malom celularnošću ili sa mnogo benignih bronhijalnih mukoznih ćelija i makrofaga, što govori u prilog kontaminacije traheobronhijalnim sekretom površine sluznice bronha. Maligni aspirat može biti kontaminiran tumorskim ćelijama koje vode poreklo iz distalnijih partija disajnih puteva. Zbog svega toga citopatolog mora sa povećanom pažnjom da tumači nalaze sa oskudnim brojem tumorskih ćelija, uz obilje respiratornih ćelija i sluzi.

a. Komplikacije udružene sa FNA

Najčešće komplikacije udružene sa FNA su pneumotoraks (češći kod perkutane transtorakalne FNA nego kod transbronhijalne), intratorakalna hemoragija sa hemoptizijom i vazdušna embolija. Kod trećine pacijenata može doći do signifikantnog pneumotoraksa, ali samo 5-10% zahteva tretman. Hemoptizija se javlja kod 2-8% pacijenata, ali nije klinički značajan problem. Vazdušna embolija je izuzetno retka komplikacija koja može biti fatalna.

b. Adekvatnost uzorka

Uzorak koji sadrži tumorske ćelije smatra se adekvatnim. Ne postoji umiverzalno prihvaćeni morfološki kriterijumi za adekvatnost uzorka ukoliko tumorske ćelije nisu prisutne. Svaki etiološki agens koji objašnjava prisustvo bolesti u isto vreme može afirmisati adekvatnost, ali u isto vreme ne mora da reprezentuje primarni patološki proces (kao primer: uzročnici zapaljenja i samo zapaljenje). Zbog toga se preporučuje uzimanje većeg broja uzoraka. Dva do tri ponovljena uzorkovanja su optimalni za komfor pacijenta i nivo adekvatnosti uzorka. Kada uzorak sadrži materijal (ćelije) reprezentativan za patološki proces on se smatra adekvatnim. Uzorak koji sadrži benigne respiratorne ćelije, makrofage i zapaljenske ćelije, a u kontekstu kliničkih i radioloških nalaza, suspektnih na malignitet, smatra se neadekvatnim, bez obzira na visinu celularnosti. Adekvatnost ili neadekvatnost uzorka bi trebalo, uglavnom, da se postavi u toku procesa aspiracije i što pre definiše, kao i da se obavezno navede u finalnom nalazu.

Literatura

1. Leopold G. Koss, Myron R. Melamed. *Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases*. 5 th ed. New York: Lippincott & Wilkins; 2006.
2. Piaton E, Djelid D, Duvert B, Perrichon M, Saugier B. Sequential use of bronchial aspirates, biopsies and washings in the preoperative management of lung cancers. *CytoJournal*, 2007;4:11.
3. Yener S, Erozan, Ibrahim Ramzy. *Pulmonary cytopathology*. Springer Science + Business Media, LLC 2009.
4. Greenberg SD. Recent advances in pulmonary cytopathology. *Hum Pathol* 1993;14:901–912.
5. Ng ABP, Horak GC. Factors significant in the diagnostic accuracy of lung cytology in bronchial washing and sputum: I: Bronchial washings. *Acta Cytol* 1983;27:391–396.
6. Ng ABP, Horak GC. Factors significant in the diagnostic accuracy of lung cytology in bronchial washing and sputum samples: II: Sputum samples. *Acta Cytol* 1983;27:397–402.
7. Chamberlain DW, Braude AC, Rebuck AS. A critical evaluation of bronchoalveolar lavage. Criteria for identifying unsatisfactory specimens. *Acta Cytol* 1987;31:599–605.
8. Johnston WW. Fine needle aspiration biopsy versus sputum and bronchial material in the diagnosis of lung cancer: a comparative study of 168 patients. *Acta Cytol* 1988;32:641–648.
9. Alonso P, Sanchez S, Ramirez E, Cicero R. Transthoracic needle biopsy in neoplastic and non-neoplastic pathology: experience in a general hospital. *Diagn Cytopathol* 1986;2:284–289.
10. Bocking A, Close KC, Kyll HJ, Hauptmann S. Cytologic versus histologic evaluation of needle biopsy of the lung, hilum and mediastinum. *Acta Cytol* 1995;39:463–471.
11. Caya JG, Clowry LJ, Wollenberg NJ, Tien TM. Transthoracic fine-needle aspiration cytology: analysis of 82 patients with detailed verification criteria and evaluation of false-negative cases. *Am J Clin Pathol* 1984;82:100–103.
12. Johnston WW. Percutaneous fine-needle aspiration biopsy of the lung: a study of 1,015 patients. *Acta Cytol* 1984;28:218–224.

-
-
- 13. Zarbo RJ, Fenoglio-Preiser CM. Interstitial data base for comparison of performance in lung fine-needle aspiration cytology: A College of American Pathologists Q-probe study of 5,264 cases with histologic correlation. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:463–470.
 - 14. Wang KP, Terry P, Marsh B. Bronchoscopic needle aspiration biopsy of paratracheal tumors. *Am Rev Respir Dis* 1978;118:17–21.
 - 15. Wang KP, Brower R, Haponik EF, Siegelman S. Flexible transbronchial needle aspiration for staging of bronchogenic carcinoma. *Chest* 1983;84:571–576.
 - 16. Wang KP, Brower R, Haponik EF, Siegelman S. Flexible transbronchial needle aspiration for staging of bronchogenic carcinoma. *Chest* 1983;84:571–576.
 - 17. Rosenthal DL, Wallace JM. Fine-needle aspiration of pulmonary lesions via fiberoptic bronchoscopy. *Acta Cytol* 1984;28:203–210.