

Atelier : Aspiration à l'aiguille fine sous EE : de l'aiguille au microscope / Workshop : EUS fine needle aspiration : from the needle to the microscope

Comment réussir une ponction à l'aiguille fine sous échoendoscopie digestive ?

Monique FABRE

*Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Université Paris XI, Hôpital de Bicêtre,
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre (France)*

How to make EUS FNA a success ?

RÉSUMÉ

L'aspiration à l'aiguille fine (FNA) sous EED est une méthode diagnostique qui s'est développée rapidement ces dernières années car elle apparaît à la fois efficace et bien adaptée pour déterminer la nature tumorale ou pseudo-tumorale de lésions pancréatiques, du foie gauche, de la voie biliaire principale, des surrénales, des parois digestives et du médiastin. L'examen cytologique bénéficiera d'une double technique associant l'étalement conventionnel sur lame et la cytologie en milieu liquide (LBC), selon Cytoc®. En effet, la technique de LBC est bien adaptée aux prélèvements pauci-cellulaires rencontrés fréquemment lorsque l'on ponctionne des tumeurs fibreuses, nécrotiques ou kystiques. De même, elle facilite les techniques complémentaires, en particulier l'immunocytochimie. L'étude réalisée sous l'égide de la Société Française de Cytologie Clinique a montré un taux significativement plus bas d'échantillons non représentatifs et une plus grande sensibilité de la technique en LBC par rapport à la cytologie conventionnelle par étalement direct. La préparation d'un bloc cellulaire est une méthode de traitement histologique complémentaire améliorant les performances diagnostiques des FNA, permettant d'enrober dans un gel des micro-fragments tissulaires dispersés dans un caillot qui sont inclus en paraffine. Les coupes sériées seront complétées à la demande par des colorations spéciales et de l'immunohistochimie. Cette procédure est simple, facile à mettre en œuvre dans un laboratoire de pathologie. Le prélèvement comme l'interprétation des lésions nécessitent de l'expérience. Dans le domaine des ponctions d'organes profonds, il faut insister sur l'importance de la collaboration entre le clinicien et le pathologiste.

SUMMARY

EUS-fine needle aspiration (FNA) is a valuable, accurate and rapidly expanding diagnostic method, which can be applied to every tumor or tumor-like lesion of pancreas, left lobe of the liver, common bile duct, adrenal glands, gastrointestinal tract, and mediastinum. Combined conventional cytology and liquid-based cytology (LBC), particularly ThinPrep method are recommended. LBC is essential for paucicellular sampling such as fibrous, necrotic or cystic tumors and for ancillary techniques such as immunodetection. The French Society of Clinical Cytology study has demonstrated significantly lower rates of non-representative samples and higher sensitivity for LBC than for conventional smears. A cell block preparation including tissue fragments and clotted blood in a gel matrix can routinely be used in every histopathology laboratory. This preparation is a complementary, histologic method of improving the diagnostic yield and accuracy of FNA, permitting multiple sections, special stains, and reliable immunohistochemical techniques. Sampling and interpreting FNA require expertise. Close interaction between the clinician and the pathologist is an essential component of the success of FNA in the workup of deep-seated lesions.

INTRODUCTION

La biopsie par voie percutanée est une méthode de choix pour permettre un diagnostic de certitude chez les patients chez qui on suspecte un cancer de siège profond. L'indication la plus fréquente est celle du diagnostic précis d'une tumeur ou d'une pseudo-tumeur découverte lors d'un examen radiologique. En effet, la conduite à tenir avec ou sans abord chirurgical sera fonction du résultat obtenu par la biopsie. Chez les patients ayant un cancer généralisé, cet examen tissulaire permettra de proposer un traitement adjuvant (chimio- ou radiothérapie). Cette analyse est à même de différencier facilement un adénocarcinome, d'une tumeur neuroendocrine ou d'un

lymphome. La biopsie est aussi en mesure d'identifier les patients chez qui un diagnostic supposé de cancer avant la biopsie correspond en fait à une lésion inflammatoire pseudo tumorale, ne nécessitant aucun traitement chirurgical.

A l'heure actuelle, deux techniques sont largement répandues pour obtenir un diagnostic anatomopathologique, la première utilisant une aiguille fine infracentimétrique d'un diamètre de 20 à 25 gauges (G) et ramenant essentiellement un échantillon de cellules analysées avec des techniques cytologiques, la seconde réalisée avec une grosse aiguille de 14 à 18G, ramenant une carotte tissulaire qui est incluse en paraffine et analysée avec des techniques d'histologie [1]. En fait, l'échantillon obtenu avec l'aiguille fine

Tirés à part : D^r Monique FABRE, Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Université Paris XI, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 78, rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre (France).

Mots-clés : aspiration à l'aiguille fine, aspiration à l'aiguille fine sous échoendoscopie digestive, cell block, cytologie, cytologie en milieu liquide, diagnostic, ThinPrep technique.

Key-words : cell block, cytology, diagnosis, endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration, fine needle aspiration, liquid-based cytology, ThinPrep technique.

consiste en cellules isolées et en particules tissulaires. Ce matériel peut aussi bien bénéficier d'une technique cytologique qu'histologique, à condition que l'on utilise pour cette dernière une préparation permettant l'inclusion en paraffine de ces microfragments. La technique du Cytoblock® est parfaitement adaptée à ce type de matériel.

Les meilleurs résultats des FNA sont obtenus quand le prélèvement et l'interprétation sont réalisés par un même acteur. Le meilleur exemple est la ponction mammaire faite et lue par le pathologiste. Mais, pour les lésions des organes profonds, comme celles du pancréas, le repérage ne peut être fait que par un radiologue ou un endoscopiste formé et entraîné à ce type d'examen. Dans le passé, les FNA en pathologie abdominale étaient principalement faites sous repérage radiologique [2-5]. Depuis quelques années, les ponctions guidées sous endoscopie se sont développées. La cholangio-pancréatographie rétrograde endoscopique permet de réaliser par brossage du canal de Wirsung, un diagnostic d'adénocarcinome pancréatique. L'EED permet d'obtenir une détection précise de lésions profondes au sein des parois digestives (œsophage, estomac, grêle, rectum) et des structures adjacentes aux parois digestives comme les adénopathies, le pancréas, le foie gauche, les surrénales et le médiastin. Ces dernières années, le nombre de ponctions sous EED est allé en augmentant, intéressant des tumeurs pancréatiques, gastro-intestinales et médiastinales [5-10]. Cela a été possible grâce au développement de nouveaux échoendoscopes linéaires. L'EED avec la FNA permet aussi bien le diagnostic de la tumeur primitive que celui de lésions secondaires associées (hépatique par exemple), aboutissant à un staging précis du cancer. L'EED est capable de détecter de toutes petites lésions, jusqu'à 3 mm de diamètre et de les ponctionner. Ainsi, la sensibilité et la spécificité de la ponction sous EED pour le diagnostic de cancer du pancréas sont respectivement de 80 % et de 100 %, avec un matériel d'une cellularité adéquate dans 75 à 95 % des cas [6-7, 9-10]. Dans toutes les séries, le pancréas est l'organe le plus ponctionné sous EED [11]. L'usage d'aspiration à l'aiguille fine pour le diagnostic de cancer pancréatique a diminué la morbidité rencontrée jusque-là avec les grosses aiguilles coupantes de 14 à 18G et a ainsi favorisé l'essor de ce type de ponction. Le taux de complications rapporté avec les FNA sous EED est très faible, de 0 à 2 %, seule la ponction des lésions kystiques du pancréas présentant un taux de complications plus élevé peut atteindre 14 % [12-14].

Cinq étapes sont nécessaires pour optimiser les résultats obtenus par la ponction aspiration sous EED.

PREMIÈRE ÉTAPE : RECOMMANDATIONS CONCERNANT LA TECHNIQUE D'ASPIRATION SOUS EED

Après localisation de la cible lésionnelle avec l'échoendoscope, l'aiguille aspirante de 22G de type Olympus, Pentax ou Wilson-Cook est positionnée

dans la masse en temps réel. En présence d'une masse médiastinale, il est possible de se servir d'une aiguille coupante de type Trucut (Wilson-Cook) de 19G qui permet d'obtenir une carotte tissulaire [15]. L'aiguille pourvue de son stylet est enfoncée à travers la paroi digestive en regard de la cible. Le stylet est ensuite retiré et une aspiration continue est appliquée à l'aide d'une seringue de 20 ml. L'aspiration est associée à des mouvements de va et vient de l'aiguille dans la lésion pendant 1 à 2 minutes. Une fois l'aspiration terminée, celle-ci est arrêtée, et la totalité du prélèvement contenu à l'intérieur de l'aiguille est recueilli grâce au stylet mousse qui est réintroduit dans l'aiguille. Plusieurs passages concernant différents territoires de la lésion sont répétés jusqu'à ce que l'on obtienne un matériel en quantité et de qualité suffisantes. Un minimum de 2 passages est recommandé, et un maximum de 4 passages est réalisé par patient et par site. Pour chaque passage, il est préparé une moyenne de 3 étalements sur lame. Si on constate que le matériel aspiré est pauvre, il sera projeté sur une seule lame. Si, au contraire il est épais, il sera étalé à l'aide d'une autre lame pour préparer un maximum de 3 lames.

Pour certaines tumeurs, en particulier les métastases de carcinome à cellules claires du rein, une aspiration douce à l'aide d'une seringue de 10 mL est recommandée pour éviter l'éclatement des cellules [16].

Après la confection des étalements sur lames, la seringue et l'aiguille sont rincées avec un fixateur. Le produit de rinçage est préparé selon la technique de Cytospin® de Shandon (Thermo Electron Corporation) ou selon la technique de LBC de Cytyc® [7, 17-19]. Tous les fragments tissulaires ou particules dans la rinçure sont récupérés avec une pince ou avec la pointe d'une aiguille pour être placés dans une solution de fixation comme l'AFA ou le formol et permettre la confection de Cytoblocks®.

Il faut se souvenir que les FNA sous EED sont opérateur-dépendantes et que plusieurs facteurs peuvent influencer la cellularité comme la qualité de l'image sous l'échoendoscope, sa taille et son siège. Les lésions les plus petites comme celles situées loin de la sonde sont d'accès plus difficile. On sait que plus l'échoendoscopiste est entraîné, travaillant dans un centre ayant un grand volume annuel de ponctions sous EED, plus les ponctions seront cellulaires [20-21]. La fiabilité diagnostique est de 50 à 60 % dans les hôpitaux réalisant 1 à 3 ponctions par semaine, et de 90 à 95 % dans ceux qui en font plus de 5 par semaine. Cette performance est dépendante de la qualité de l'aspiration. Dans certaines séries, le taux d'aspirations non satisfaisantes atteint 6 à 20 % [2, 10, 13]. Il faut noter que la pose d'une prothèse biliaire avant le geste est déconseillée. Dans une étude rétrospective récente, Agarwal *et al.* ont montré que chez les patients ponctionnés pour une tumeur pancréatique après pose d'une prothèse biliaire, la valeur prédictive négative (VPN) de la ponction sous EED est seulement de 38 % en raison d'un mauvais repérage de la lésion, alors que cette VPN atteint 89 % si on exclut les patients porteurs d'une prothèse biliaire avant la ponction [5].

DEUXIÈME ÉTAPE : RECOMMANDATIONS CONCERNANT LA PRÉPARATION DES CELLULES EN SALLE D'ENDOSCOPIE

La fixation immédiate du matériel aspiré est indispensable. Une fixation retardée entraîne des distorsions cellulaires et une perte des détails nucléaires par éclatement des noyaux.

Le fixateur dépend de la coloration cytologique qui sera faite ensuite. Le choix de la coloration dépend de nombreux paramètres prenant en compte l'architecture tissulaire, les détails nucléaires et cytoplasmiques, le stroma tumoral et les sécrétions.

Deux types d'étalements sur lames peuvent être préparés. Ils peuvent être fixés à la laque ou immergés dans une solution alcoolique à 95 % pour être ensuite colorés par le Papanicolaou. D'autres préfèrent la fixation à l'air pour utiliser une coloration de type Romanowsky (MGG ou Diff-Quik®) ou pour colorer avec l'hématoxyline et l'éosine. Dans notre laboratoire, nous demandons la préparation de 3 étalements sur lames qui sont séchés à l'air et colorés en routine avec le Diff-Quik®, le PAS (acide périodique-Schiff) et le bleu alcian (BA).

Pour faciliter la tâche de l'échoendoscopiste, en particulier pour ceux d'entre eux qui sont peu entraînés, le matériel peut être collecté dans une solution de transport, ce qui évite de recevoir d'éventuels étalements de mauvaise qualité ou d'avoir besoin d'un cytotechnicien en salle d'endoscopie. Le matériel aspiré est alors éjecté dans un flacon contenant 20 ml de Cytolyt®, la seringue étant également rincée avec cette solution. Ce flacon sera acheminé au laboratoire où du personnel qualifié préparera les différentes techniques cytologiques. Il est certain que ce choix de traitement du matériel variera en fonction des laboratoires, prenant en compte des paramètres faisant intervenir le coût, la supériorité de telle ou telle technique en fonction de l'expérience du pathologiste.

La présence d'un cytotechnicien ou d'un cytopathologiste dans la salle d'examen reste débattue. Celle-ci permet de réaliser de façon extemporanée l'évaluation de la qualité du geste et même du diagnostic, ce qui facilite la prise en charge du patient par le clinicien. Le nombre de passages au sein de la lésion peut être limité au nombre nécessaire, améliorant les performances diagnostiques et limitant la morbidité. En outre, si la connaissance de ce diagnostic implique une confirmation par la mise en jeu de techniques spéciales (colorations spéciales, immunocytochimie, mise en culture et analyses biochimiques ou cytogénétique), la ponction peut être répétée autant de fois que l'état du patient le permet. Le cytotechnicien en salle est à même de réaliser des fixations et des étalements de qualité et de s'assurer que le bon d'examen est correctement rempli avec tous les éléments cliniques et radiologiques nécessaires à la prise en charge du diagnostic. Mais l'inconvénient de cette stratégie est le temps à consacrer pour le personnel du laboratoire et la prolongation de la durée de l'examen en salle d'endoscopie [22]. L'étude de

Layfield *et al.* a montré que le temps moyen d'un examen d'EED avec ponction est de 56 minutes pour le cytopathologiste ce qui correspond à un coût de 83,30 \$. Ainsi, d'un point de vue purement économique, le temps du pathologiste est plus rentable quand il prend en charge une pièce opératoire que quand il se déplace pour lire une ponction en salle d'endoscopie. Si le déplacement d'un cytotechnicien peut apparaître comme une solution raisonnable, il faut souligner que bien peu de cytotechniciens sont formés dans l'interprétation des ponctions d'organes profonds.

Enfin, aucune étude prospective contrôlée ne démontre un bénéfice réel dans les performances diagnostiques lorsque le cytopathologiste est présent en salle d'examen. Pour des raisons dues aux différences des systèmes de santé, la pratique diffère aux Etats-Unis où un cytopathologiste est présent en salle d'examen et en Europe où le matériel est adressé au laboratoire pour une interprétation retardée par le pathologiste.

TROISIÈME ÉTAPE : RECOMMANDATIONS CONCERNANT LA RÉDACTION DU COMPTE-RENDU D'EED

Toutes les données cliniques (antécédents, symptômes, âge et sexe), radiologiques et endoscopiques comme le siège, la taille, le caractère solide ou kystique et la nature supposée de la lésion sont communiquées au pathologiste. Si le patient a un antécédent de cancer, son type histologique précis doit être connu pour permettre une comparaison avec le produit d'aspiration. Les traitements antérieurs comme la chimiothérapie ou la radiothérapie doivent être également signalés car cela peut induire des atypies nucléaires qui pourraient conduire à un faux positif. Le nombre de passages dans la lésion, la qualité du matériel ramené (couleur, consistance, caractère très sanglant avec ou sans fragments tissulaires), sa quantité, le type d'organes traversés par le passage de l'aiguille doivent être mentionnés. Les cellules de la paroi digestive contaminent fréquemment le matériel aspiré sous EED. De même, les difficultés rencontrées pour atteindre la cible doivent être précisées. Une biopsie négative n'a pas la même valeur si elle correspond à un repérage difficile de l'aiguille de ponction dans la cible où si, au contraire, il s'agit d'un matériel obtenu dans des conditions de centrage de bonne qualité. En outre, un diagnostic de lésion bénigne n'écarte jamais la possibilité que le cancer ait été manqué. Il peut s'agir par exemple d'une ponction faite au sein du stroma fibreux qui accompagne un adénocarcinome du pancréas.

QUATRIÈME ÉTAPE : RECOMMANDATIONS CONCERNANT LA TECHNIQUE AU LABORATOIRE

Une équipe de cytotechniciens entraînés assurera une préparation, une fixation et une coloration optimales des échantillons. L'échantillon cellulaire béné-

ficiera de l'emploi de différentes techniques additionnelles : étalement direct sur lames, cytopspin® après cyto centrifugation ou suspension cellulaire obtenue avec la technique en LBC et inclusion de culot cellulaire en paraffine [23]. La procédure doit être adaptée à l'aspect de l'échantillon. S'il est très sanglant et paucicellulaire, un cytoblock® sera très utile. Ce dernier peut être préparé avec les grumeaux tissulaires comme avec le culot de centrifugation d'un produit liquidien de kyste par exemple. Pour cela, la surface du pot contenant le matériel est examinée soigneusement et tout fragment qui flotte à la surface est remis en suspension dans une solution alcoolique de type AFA pour une post-fixation. Le tube est ensuite centrifugé à 1500 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant est jeté et 2 gouttes de la solution 2 (liquide coloré) puis de la solution 1 (liquide clair) (Shandon cytoblock®, Thermo Electron Corporation) sont déposées sur le culot pour le transformer en un bouton cellulaire ferme qui va pouvoir être saisi pour être inclus entre deux mousses, au sein de cassettes d'inclusion puis incluses en paraffine. Attention, il est important que le fixateur soit en milieu alcoolique pour que le bouton cellulaire se solidifie. Cette technique qui ne prend que quelques minutes est parfaitement adaptée à l'inclusion en paraffine de suspension cellulaire, de grumeaux et de micro carottes tissulaires. Les coupes réalisées montrent que le gel retient les cellules dans ses mailles. Des coupes sériées seront faites. En routine, il est recommandé d'examiner au moins 4 lames, 2 colorées par l'HES, une par le PAS et une autre par le BA. On constate que la matrice du gel se colore avec l'hématoxyline et le bleu alcian. Si on constate une discordance entre le diagnostic attendu et l'analyse au microscope, on n'hésitera pas à débiter le bloc d'inclusion afin d'examiner de nombreux niveaux de coupes. En fonction du diagnostic attendu et du résultat de l'examen cytopathologique, on peut prévoir d'emblée des lames blanches pour permettre des immunodétections.

La prise en charge des ponctions de lésions kystiques, en particulier du pancréas est spécifique, car le diagnostic cyto/histologique de ces lésions est difficile [24-26]. La ponction sous EED n'est faite que chez les patients pour lesquels l'imagerie n'arrive pas à un diagnostic de certitude. Si l'aspiration ramène un liquide clair, il est indispensable de concentrer les cellules du liquide, car le nombre de cellules est trop faible pour espérer les identifier sur un étalement direct sur lames. On s'aidera alors des cytopspins® ou de la LBC par la méthode Cytyc®. Si le liquide ponctionné est épais et gélatineux, il sera alors confectonné des étalements sur lames (1 à 3 lames en fonction de la quantité du matériel, immédiatement fixées à l'air et colorées par le Diff-Quik® ou l'HES, le PAS et le BA). Si possible, la paroi du kyste sera grattée pour permettre une analyse.

Pour quelques diagnostics difficiles, par exemple en présence d'une tumeur indifférenciée, des techniques spéciales seront utiles, comme les colorations spéciales, l'immunohistochimie que l'on peut réaliser sur la LBC comme sur le cytoblock®. Quand on compare ces études à celles qui peuvent être faites à par-

tir de prélèvements obtenus au cours d'une résection chirurgicale, il faut constater que la quantité de matériel analysé comme le nombre de cellules sont faibles, ne permettant pas toujours d'obtenir un culot cellulaire pour réaliser le cytobloc. Le nombre de lames disponibles de cytologie peut être limité également. Le pathologiste est alors amené à décider du choix des anticorps les plus pertinents par rapport à la question posée par le clinicien et par rapport au caractère des cellules identifiées au microscope. L'analyse extemporanée du matériel ramené par la ponction permet dans ce cas de figure de demander un nouveau passage de l'aiguille dans la lésion pour augmenter la réserve cellulaire. De même, des aliquotes pourront être préparés pour permettre des analyses moléculaires. Plusieurs techniques ont été mises au point à partir de ce matériel faisant appel à des protocoles de cytométrie de flux, de PCR et de FISH [27]. L'utilisation d'un diagnostic moléculaire a surtout été proposé pour la cytologie pancréatico-biliaire, avec l'étude de 3 anomalies génétiques moléculaires intéressantes *P53, les télomérases et le codon 12 du gène K-ras* [28-29].

CINQUIÈME ÉTAPE : RECOMMANDATIONS CONCERNANT L'INTERPRÉTATION DU MATÉRIEL DE FNA ET LA RÉDACTION DU COMPTE-RENDU

La ponction est interprétée par un pathologiste qui s'intéresse aux ponctions à l'aiguille fine. En effet, le manque d'intérêt pour ce type d'examen s'accompagne d'un rendement diagnostique bas. Les diagnostics établis par l'analyse de la pièce opératoire doivent être communiqués au cytopathologiste afin de lui permettre une démarche d'assurance qualité. La relecture des lames en cas de discordance permet d'acquiescer de nouveaux critères de diagnostic ou de les affiner.

Le cytopathologiste interprète les lames en établissant une « check-list » qui comporte les points suivants : la qualité de la fixation et de la coloration, la cellularité pour juger de la représentativité du matériel (nombre de cellules présentes), la composition cellulaire, la morphologie des cellules isolées, l'architecture des groupements cellulaires ou des micro-fragments et le type de matrice extracellulaire (caractères du stroma, cellules inflammatoires, nécrose, mucine...). Les critères de jugement de la représentativité du produit de ponction dépendent du siège de la lésion et restent souvent subjectifs. Une cytologie est interprétée comme « représentative ou évaluable », si elle comporte un nombre suffisant de cellules provenant de la lésion, par ex. s'il existe des cellules canalaire lors de la ponction d'une lésion pancréatique. A l'opposé, une ponction est considérée comme « non représentative ou non évaluable » si le matériel analysé ne comporte que du sang.

Chaque laboratoire doit établir ses standards en fonction de ses pratiques techniques et de ses corrélations cyto-histologiques. Les caractéristiques du

noyau sont un critère clef dans le diagnostic de malignité. De nombreux paramètres faisant intervenir la taille et la forme du noyau, l'aspect de la chromatine et de la membrane nucléaire, les caractéristiques du nucléole sont analysées avec attention. L'aspect du fond de la préparation varie avec le type tumoral, le type de croissance, de vascularisation, la quantité et le type de stroma, la quantité et le type d'inflammation, et la nécrose.

Quelles sont les raisons des faux-négatifs ?

Les causes principales sont liées à des problèmes techniques : erreur d'échantillonnage par rapport à la cible, aspiration insuffisante et mauvaise technique au laboratoire. Dans les erreurs d'échantillonnage, la ponction sous EED a concerné la région péri-tumorale et non la tumeur. Il arrive que le contaminant de type gastro-intestinal puisse boucher l'aiguille de ponction ou que ce dernier soit impossible à différencier de l'épithélium d'un canal pancréatique ou de la bordure d'un kyste pancréatique.

L'imprécision du geste de ponction peut être liée à la taille exiguë de la cible, sa mauvaise échogénéité, ses marges imprécises. C'est pour cette raison qu'il est recommandé de répéter la ponction si l'analyse des premiers échantillons est en désaccord avec les données cliniques et d'imagerie. D'autres problèmes techniques sont souvent liés au caractère insuffisant du matériel ramené. Il peut être nécessaire de réaliser plus de 3 passages dans la lésion avant d'obtenir un peu de matériel tissulaire.

D'autres difficultés sont en relation avec la nature de la lésion : masse très dure et fibreuse, remaniements nécrotiques et kystiques, tumeurs très bien différenciées [30]. Enfin, des problèmes d'interprétation du pathologiste peuvent conduire à une erreur diagnostique, souvent liée à un manque d'expérience pour tel ou tel type de lésions.

Quelles sont les raisons des faux-positifs ?

Une forte hyperplasie des cellules mésothéliales est une des causes les plus fréquentes de faux positifs en pathologie abdominale. Une autre cause d'erreur consiste à interpréter comme malin des cellules irritées, dégénératives ou métaplasiques. Cette erreur d'interprétation est souvent liée à une mauvaise conservation des cellules ou à une mauvaise information clinique.

Rédaction du compte-rendu

Le but de la ponction est d'obtenir par l'analyse cyto/histologique un diagnostic de certitude sur la nature de la lésion afin de choisir le traitement le mieux approprié.

Le clinicien ne peut se contenter d'une classification des lésions en cinq classes (normal, inflammatoire, réactionnel, suspect, malin) comme celle utilisée autrefois en cytologie cervico-utérine. Cette classification reste trop vague. Quand cela est possible, une nomenclature comparable à celle utilisée

en pathologie chirurgicale est recommandée. Quand un diagnostic précis ne peut être établi, il est important de discuter dans sa conclusion les différents diagnostics possibles étayés par les différents arguments fournis par l'analyse des colorations de routine et des techniques spéciales. En particulier, une conclusion indiquant l'absence de cancer doit clairement indiquer si ce résultat négatif est dû à une erreur d'échantillonnage ou au caractère bénin de la lésion.

RÉSULTATS DE L'ÉTUDE SUR LA LBC SOUS L'ÉGIDE DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE CYTOLOGIE CLINIQUE

Si la FNA reste un test sensible pour le diagnostic des lésions des organes profonds des erreurs de prélèvement et d'interprétation sont observés chez 15 à 30 % des patients. Il est apparu nécessaire de développer de nouveaux outils et des techniques alternatives pour réduire ces erreurs en s'intéressant à la cytologie en milieu liquide.

Dans cet essai, nous avons comparé les performances diagnostiques de deux techniques différentes de cytologie, la première correspondant à la cytologie conventionnelle par étalement direct, la seconde correspondant au recueil des cellules en milieu liquide selon la technique Cytyc®. Pour cela, nous avons mené une étude prospective et multicentrique entre juin 2000 et juin 2001 analysant des ponctions sous EED réalisées chez des patients qui avaient donné leur consentement à cette étude qui avait reçu l'approbation du comité d'éthique et était financée par un contrat de recherche obtenu auprès de l'Association de Recherche contre le Cancer. Trois centres cliniques (deux à Paris, un à Marseille) faisant intervenir six échocardiographes (G. Amouyal, P. Amouyal, A. Dancour, M. Giovannini, O. Marty, L. Palazzo) et trois pathologistes (N. Ben Lagha, M. Fabre, G. Monges) participaient à cette étude. Les ponctions concernaient des lésions médiastinales et abdominales. Le prélèvement était partagé. Une moitié était étalée sur lame, séchée à l'air et colorée par le Diff-Quik® ou l'HES. La seconde moitié était versée dans un pot contenant 20 mL de Cytolyt® (solution de transport qui contient un mucolytique et un hémolytique). Ensuite, l'échantillon était fixé dans le PreservCyt® (qui contient 50 % de méthanol), puis technique dans l'automate ThinPrep 2000 (Cytyc Corp, Boxborough, MA). Cet automate permet d'obtenir une pastille de cellules en monocouche, qui se détache sur un fond clair débarrassé de sang et de mucus, facilitant la reconnaissance des cellules d'intérêt. Une seule lame ThinPrep contenant une pastille cellulaire concentrée dans un cercle de 20 mm de diamètre était colorée par le Papanicolaou ou l'HES. Les lames étaient lues selon une grille standardisée qui précisait pour chaque technique la représentativité du spécimen, le nombre de lames évaluables, le diagnostic cytologique final (normal, inflammatoire, suspect malin et malin). La paire de lames pour chaque lésion et par patient était évaluée de façon indépendante par deux pathologistes. Après la

première lecture, si le diagnostic correspondant à chaque technique était différent, une 2^e voire une 3^e lecture était organisée par échange des lames entre les pathologistes pour la 2^e lecture, par relecture sur un microscope multi-tête pour la 3^e lecture. Le diagnostic final pour chaque technique était comparé au « gold standard », qui était le diagnostic histologique final obtenu à partir des biopsies ou des pièces opératoires. Pour quelques lésions histologiquement bénignes, le diagnostic cytologique final était corrélé avec le follow-up. 241 FNA sous EED étaient évaluables (pancréas : 60 %, ganglion : 17 %, foie : 8 %, siège varié : 15 %). Le nombre de cytologie non représentative était significativement plus élevé pour la cytologie conventionnelle que pour celle en milieu liquide (15,8 % vs 4,7 %, $p < 0.0001$). La sensibilité de la LBC était significativement plus élevée que celle de la cytologie par étalement (95,3 % vs 91,4 %, $p < 0.007$) [31-33].

CONCLUSION

Un travail en étroite collaboration entre le clinicien et le pathologiste est la meilleure façon d'assurer une bonne prise en charge des FNA d'organes profonds.

Le prélèvement comme l'interprétation nécessitent de l'expérience. Les conséquences graves (chirurgie majeure) d'un diagnostic de malignité favorise auprès des pathologistes non entraînés un nombre élevé de faux-négatifs ou de suspects. La sensibilité diagnostique des FNA prises en charge dans des centres entraînés, atteint un taux proche de 95 % et une spécificité de 100 % pour le diagnostic de cancer. Le taux de faux négatif peut même atteindre moins de 1 à 4 % parmi les échantillons représentatifs. La réalisation de suspensions cellulaires en milieu liquide est simple et permet à la fois le diagnostic cytologique de routine et la mise en jeu de techniques complémentaires. Cette technique permet des analyses moléculaires pour déterminer la population de patients qui pourrait bénéficier de la recherche de marqueurs pronostiques et prédictifs de réponse à telle ou telle chimiothérapie [34]. Un bloc de cellules incluses en paraffine, dont les fragments tissulaires dispersés dans le sang sont englobés dans un gel, est facile à préparer. Une étude combinée d'étalements directs sur lames, de cytologie en milieu liquide et de coupes histologiques de micro fragments inclus en cytoBlock[®] augmente la quantité d'informations disponibles et permet de fournir au clinicien un diagnostic plus précis et plus fiable pour la prise en charge du traitement du patient.

RÉFÉRENCES

1. Stewart CJ, Coldewey J, Stewart IS. Comparison of fine needle aspiration cytology and needle core biopsy in the diagnosis of radiologically detected abdominal lesions. *J Clin Pathol* 2002; 55: 93-7.
2. David O, Green L, Reddy V, Kluskens L, Bitterman P, Attal H, Prinz R, Gattuso P. Pancreatic masses: a multi-institutional study of 364 fine-needle aspiration biopsies with histopathologic correlation. *Diagn Cytopathol* 1998; 19: 423-7.
3. Zech CJ, Helmberger T, Wichmann MW, Holzknicht N, Diebold J, Reiser MF. Large core biopsy of the pancreas under CT fluoroscopy control: results and complications. *J Comput Assist Tomogr*. 2002; 26: 743-9.
4. Gupta S, Ahrar K, Morello FA JR, Wallace MJ, Hicks ME. Masses in or around the pancreatic head: CT-guided coaxial fine-needle aspiration biopsy with a posterior transcaval approach. *Radiology*. 2002; 222: 63-9.
5. Agarwal B, Abu-Hamda E, Molke KL, Correa AM, Ho L. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration and multidetector spiral CT in the diagnosis of pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 844-50.
6. Harewood GC, Wiersema MJ. Endosonography-guided fine needle aspiration biopsy in the evaluation of pancreatic masses. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1386-91.
7. Chhieng DC, Jhala D, Jhala N, Eltoun I, Chen VK, Vickers S, Heslin Mj, Wilcox CM, Eloubeidi MA. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy: a study of 103 cases. *Cancer* 2002; 25 [96]: 232-9.
8. Larghi A, Verna EC, Stavropoulos SN, Rotterdam H, Lightdale CJ, Stevens PD. EUS-guided trucut needle biopsies in patients with solid pancreatic masses: a prospective study. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 185-90.
9. Ylagan LR, Edmundowicz S, Kasal K, Walsh D, Lu DW. Endoscopic ultrasound guided fine-needle aspiration cytology of pancreatic carcinoma: a 3-year experience and review of the literature. *Cancer* 2002; 25 [96]: 362-9.
10. Shin HJ, Lahoti S, Sneige N. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration in 179 cases: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer* 2002; 25 [96]: 174-80.
11. Arcidiacono PG, Carrara S. Endoscopic ultrasonography: impact in diagnosis, staging and management of pancreatic tumors. An overview. *JOP* 2004; 5: 247-52.
12. O'Toole D, Palazzo L, Arotcarena R, Dancour A, Aubert A, Hammel P, Amaris J, Ruszniewski P. Assessment of complications of EUS-guided fine-needle aspiration. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 470-4.
13. Eloubeidi MA, Chen VK, Eltoun IA, Jhala D, Chhieng DC, Jhala N, Vickers SM, Wilcox CM. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy of patients with suspected pancreatic cancer: diagnostic accuracy and acute and 30-day complications. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2663-8.
14. Varadarajulu S, Eloubeidi MA. Frequency and significance of acute intracystic hemorrhage during EUS-FNA of cystic lesions of the pancreas. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 631-5.
15. Varadarajulu S, Fraig M, Schmulewitz N, Roberts S, Wildi S, Hawes RH, Hoffman BJ, Wallace MB. Comparison of EUS-guided 19-gauge Trucut needle biopsy with EUS-guided fine-needle aspiration. *Endoscopy* 2004; 36: 397-401.
16. Bechade D, Palazzo L, Fabre M, Aigayres JP. EUS-guided FNA of pancreatic metastasis from renal cell carcinoma. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 784-8.
17. Maksem JA, Weidmann J. Specialized preparative devices are not needed for liquid-based, thin-layer cytology: an alternate manual method using a metastable alcoholic gel. *Diagn Cytopathol* 2001; 25: 262-4.
18. Suen KC. Introduction and general considerations, chap1, p1-15 in: Atlas and text of aspiration biopsy cytology. Baltimore: William Wilkins; 1990.
19. Centeno BA, Pitman MB. Fine needle aspiration biopsy of the pancreas. Woburn: Butterworth-Heinemann; 1999.

20. Harewood GC, Wiersema LM, Halling AC, Keeney GL, Salamao DR, Wiersema MJ. Influence of EUS training and pathology interpretation on accuracy of EUS-guided fine needle aspiration of pancreatic masses. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 669-73.
21. Mertz H, Gautam S. The learning curve for EUS-guided FNA of pancreatic cancer. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 33-7.
22. Layfield LJ, Bentz JS, Gopez EV. Immediate on-site interpretation of fine-needle aspiration smears: a cost and compensation analysis. *Cancer* 2001 25; 93: 319-22.
23. Chiu KW, Chang-Chien CS, Chen L, Liaw YF. Ultrasonically-guided needle aspiration with preparation of cell blocks in the diagnosis of liver tumors. *Hepatogastroenterology* 1994; 41: 30-3.
24. Fabre M. Diagnosis of cystic pancreatic lesions by EE-guided fine-needle aspiration- Which sampling and Why? Utility of cyst and microbiopsy and fluid analysis by monolayered processing. *Acta Endoscopica* 2002; 1: 71-83.
25. Frossard JL, Amouyal P, Amouyal G, Palazzo L, Amaris J, Soldan M, Giostra E, Spahr L, Hadengue A, Fabre M. Performance of endosonography-guided fine needle aspiration and biopsy in the diagnosis of pancreatic cystic lesions. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98: 1516-24.
26. O'Toole D, Palazzo L, Hammel P, Ben Yaghlene L, Couvelard A, Felce-Dachez M, Fabre M, Dancour A, Aubert A, Sauvanet A, Maire F, Levy P, Ruzsniwski P. Macrocystic pancreatic cystadenoma: The role of EUS and cyst fluid analysis in distinguishing mucinous and serous lesions. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 823-9.
27. Ribeiro A, Vasquez-Sequeiros E, Wiersema LM, Wang KK, Clain JE, Wiersema MJ. EUS-guided fine-needle aspiration combined with flow cytometry and immunocytochemistry in the diagnosis of lymphoma. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 485-91.
28. Fukushima N, Suzuki M, Fukayama M. Analysis of Ki-ras mutation directly applied to atypical cell clusters on cytological smear of bile and pancreatic juice. *Pathol Int* 1998; 48: 33-40.
29. Inoue H, Tsuchida A, Kawasaki T, Fujimoto Y, Yamasaki S, Kajiyama G. Preoperative diagnosis of intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas with attention of telomerase activity. *Cancer* 2001; 91: 35-41.
30. Lin F, Staerckel G. Cytologic criteria for well differentiated adenocarcinoma of the pancreas in fine-needle aspiration biopsy specimens. *Cancer* 2003; 25 [99]: 44-50.
31. Fabre M, Meyer L, Klijanienko J, Monges G, Ben Lagha N, Cosyn S, Dorel C, Padoy E, Vielh P. How ThinPrep compares with conventional cytology for non-gynecological specimens? Preliminary analysis of 620 breast and deep-organs lesions. 28th European Congress of Cytology. *Cytopathology* 2002 : 82-83.
32. Fabre M, Palazzo L, Amouyal P, Giovannini M, Amouyal G, Marty O, Dancour A, Ben-Lagha N, Monges G. La cytologie en milieu liquide peut-elle remplacer la cytologie conventionnelle pour le diagnostic des ponctions à l'aiguille fine sous EE? Résultats d'une étude prospective multicentrique. *Gastroenterol Clin Biol* 2003; 27, A66.
33. Fabre M, Vielh P. Protocole de la Société Française de Cytologie Clinique, chap. 11, p143-153 In : *Cytopathologie non gynécologique en milieu liquide*, collection « le Pathologiste », Paris : Elsevier ; 2003.
34. Tisserand P, Fouquet C, Marck V, Mallard C, Fabre M, Vielh P, Soussi T. ThinPrep-processed fine-needle samples of breast are effective material for RNA- and DNA-based molecular diagnosis: application to p53 mutation analysis. *Cancer* 2003; 25 [99]: 223-32.

INTRODUCTION

The management of patients with suspected neoplastic disease of deep-organs is dependent on obtaining an accurate tissue diagnosis, usually via percutaneous biopsy. The most common indication for a deep organ sampling is the need for the documentation of malignancy in a patient with a malignant-appearing mass or the finding of an atypical mass on imaging. The surgical approach as well as the overall management of the patient will often be altered depending on the results of the biopsy. A tissue diagnosis is particularly important in patients with unresectable cancer in order to program adjuvant therapy (chemotherapy or radiotherapy). The analysis of aspirated material can readily differentiate between adenocarcinoma, neuroendocrine tumor, and lymphoma. Biopsy can also be used for identifying patients with suspected cancer who do not have cancer, thereby avoiding surgery.

At present, there are two widely used and accepted methods for obtaining diagnostic material, namely fine needle aspiration (FNA), and needle core biopsy (NCB). FNA specimens are usually acquired using 20-25 gauge needles and generally provide a sample for cytological examination, whereas NCB specimens are obtained using larger 14-18 gauge needles, and primarily provide a tissue core for histological assessment [1]. In fact, the FNA specimen represents an aspirate consisting of single cells and tissue fragments. This material is evaluated with cytological techniques and any visible tissue fragments or particles in the rinse are

transferred to fixative for cell block preparation (CytoBlock®) which are processed for histology. So, FNA allows both methods of cytology and histology.

The best results of FNAs are obtained when the individual who interprets the aspirate also performs the puncture. At many institutions, superficial masses such as breast lesions are aspirated by pathologists, but deep-seated masses, such as pancreatic lesions, require an experienced radiologist or endoscopist. If FNA are performed under radiologic guidance [2-5], they are also performed via flexible endoscopy. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) with pancreatic duct brushings have been used for detecting pancreatic adenocarcinoma. For the last several years EUS allows for detailed imaging of the esophageal, gastric, duodenal, and rectal walls as well as adjacent structures such as lymph nodes, pancreas, left lobe of the liver, adrenal glands and the mediastinum. EUS-FNA has emerged as a promising diagnosis adjunct for diagnosing pancreatic, gastrointestinal, and mediastinal malignancies [5-10]. The development of a linear-array echoendoscope has made it possible to perform FNA. The potential indications for EUS-FNA include diagnosis of the primary lesion, lymph node staging, and biopsy of distant metastatic sites, such as the liver. EUS is able to identify lesions with a diameter of 3mm and can guide the biopsy of the lesion. EUS-FNA sensitivity and specificity of pancreatic cancer are 80 % and 100 % respectively with an adequate cellularity of the specimen in 75-95 % of the cases [6-7, 9-10]. In all series the pancreas is the most commonly

aspirated site [11]. The use of a small gauge needle for aspiration cytology of the pancreas has increased the safety and ease of FNA compared to the traditional core tissue biopsy using 14, 16, or 18 gauge cutting-type large needles. The complication rate of EUS-FNA has been reported very low, ranging from 0 to 2 %, except in cases of pancreatic cystic lesions where a complication rate of up to 14 % has been reported [12-14]. Five steps are necessary to ensure optimal results of EUS-FNA.

THE FIRST STEP: RECOMMENDATIONS CONCERNING THE ASPIRATION TECHNIQUE UNDER EUS

After localizing the target lesion with endosonography, a 22 gauge aspiration needle (Olympus, Pentax, Wilson-Cook) device is placed into the mass under real-time control. For mediastinal lesions, Trucut biopsy-needle with a cutting procedure which allows core biopsy is available. Wilson-Cook commercializes a 19 gauge needle [15].

A metallic central stylet crosses the entire length of the needle catheter assembly. The catheter is passed through the biopsy channel of the endosonoscope and the needle with the stylet is advanced through the gastrointestinal wall. The stylet is then removed and continuous suction is applied using a 20-mL syringe. Then the needle is moved back and forth within the lesion for 1-2 minutes. When aspiration is complete, suction is released and the catheter system is removed through the biopsy channel. All the content of the needle is collected with the stylet which is reintroduced in the needle. Multiple punctures from different sites of the lesion ensure adequate representative samples. A minimum of two passes and a maximum of 4 passes per site are performed per patient. Usually an average of three smears can be made per puncture. If a smear is scanty, it should be expressed directly only onto one slide without further manipulation. If a smear is too thick, it should be spread out onto a maximum of three slides with another glass slide.

For some tumors such as metastases from renal cell carcinoma, effective sampling requires a modified technique, namely short aspiration with low negative pressure using a 10 mL syringe [16].

After slide preparation, the syringe with the needle is then thoroughly rinsed with a fixative and is used for Shandon Cytospin® preparation (Thermo Electron Corporation) or liquid-based cytology (Cytoc technique) [7, 17-19]. Any visible tissue fragments or particles in the rinse should be gently removed with forceps or the tip of the needle and transferred to formalin or AFA fixative for cell block preparation as needed.

We have to remember that FNA-EUS is operator-dependent and several factors can influence adequate sampling, such as size, ultrasonographic quality of the lesion, and location of the mass. Smaller lesions and those that are more distant from the digestive tract are technically more difficult to target. The puncture

should be performed by someone familiar with the technique. EUS-FNA is technically challenging and requires long training in centres with a high volume of EUS procedures [20-21]. This effect of specialization is very important. Hospital accuracy rate ranges from 50 to 60 % in centres with 1 to 3 EUS-FNA per week whereas, a percentage ranging from 90 to 95 % is reported in centres diagnosing (treating) more than 5 FNA per week. The accuracy of FNA is dependent on the adequacy of the tissue aspiration. In some series, inadequate tissue was obtained in 6-20 % of the cases [2, 10, 13]. The EUS-FNA must always be performed before a therapeutic palliative ERCP procedure. In a recent retrospective study, Agarwal et al. showed that the negative predictive value (NPV) of EUS-FNA was only 38 % due to the inability to identify the target lesion secondary to the stent, in patients with a visible mass on EUS and a stent in the common bile duct. The same authors showed that by excluding all patients with stent placement, the EUS-FNA NPV rose to 89 % [5].

THE SECOND STEP: RECOMMENDATIONS CONCERNING THE PREPARATION OF ASPIRATED MATERIAL IN THE ENDOSCOPIC ROOM

Immediate fixation of aspirate is crucial. Delay in fixation results in cellular distortion and in poor preservation of nuclear detail. The fixative depends on the choice of stain.

The choice of stain should allow for an evaluation of the architectural pattern of the tissue fragments, a proper nuclear morphology, details of cytoplasmic characteristics, visualisation of stroma and secretions. Two types of smears are prepared. Some labs prefer a spray fixative or wet fixation (95 % ethyl alcohol) used for Papanicolaou stain. Others use air-dried slides for Romanowsky stainings (MGG, Diff-Quik®) or for hematoxylin and eosin. In our lab, three slides are left air-dried. The routine stainings we use are Diff-Quik®, periodic-acid-Schiff (PAS) and alcian blue (AB).

In order to enable more physicians to perform FNA, the specimen may be collected in a liquid preservative solution. The aspiration is performed in the usual manner. The aspirated material is then ejected directly into a container filled with 20ml of Cytolyt® transport solution, and the syringe also is flushed thoroughly with Cytolyt®. This circumvents the necessity of having a cytotechnologist present at the time of the aspiration and permits transportation of the specimen at the convenience of the aspirator to a laboratory, where proper smears can be prepared by trained personnel. Cost/benefit issues and personal preferences influence the choice.

There is a debate regarding the presence of the cytotechnologist/cytopathologist in the endoscopic room to assist the endoscopist. With rapid processing of cytologic material in the endoscopic room, a tissue diagnosis may be provided to the physician in a timely

manner and aid the decision making. Another advantage is derived from the idea that aspirated material has to be directly examined by microscope; this could minimize the number of FNA passages and eventually improve the accuracy of the procedure, reducing the number of inadequate specimens. If more material is needed for special procedures, such as special stains, immunocytochemistry, bacteriologic culture, and cytogenetic or biochemical analyses, the puncture can be repeated many times according to the patient's general condition. It also enables the cytotechnologist to ensure optimal specimen fixation and preparation and to make certain that the requisition form contains all the relevant information necessary for interpretation of the FNA. The disadvantage of this strategy is the time-consuming nature of the process and the prolongation of the endoscopic time [22]. The study of Lester et al. has shown that the average time spent by cytopathologist for on-site FNA-EUS required 56 minutes with an associated cost for the pathologist of \$83.30. Hence, from a purely economic standpoint, a pathologist's time is spent better ruling out surgical patients than performing immediate, on-site evaluation on FNA specimens. The use of cytotechnologists would appear to be a reasonable alternative if sufficient cytotechnologists are available. In fact, the number of available cytotechnologists who have experience in deep-organ lesions is very low.

There are no data available which assess any significant beneficial effect on accuracy results when the cytopathologist is present during EUS-FNA procedures. For this reason, US teams usually prefer to have a cytopathologist present on site, while European experts send the smears directly for final diagnosis.

THE THIRD STEP: RECOMMENDATIONS CONCERNING THE EUS REPORT

All relevant clinical (a good history, the age and sex of the patient), radiological and endoscopic data, and the site, the size and the nature of the lesion, whether solid or cystic, are communicated to the pathologist. If the patient has a previous documented cancer, the precise histological type of cancer must be known and compared with the current cytologic smears. Previous treatment of cancer with chemotherapy or radiation may lead to bizarre nuclear atypia, which may cause confusion with malignancy. This information should always be indicated on the requisition to prevent a potential false-positive diagnosis. The number of passes, the quality (color, consistancy, clots with small cohesive fragments) and the quantity of the aspirate such as the normal tissue that get right through the needle are mentioned. Contaminants from the digestive wall are frequent.

The difficulties for targeting the nodule may be described. A negative biopsy is less significant if the aspirator is uncertain of the precise location of the needle relative to the lesion than if he or she is certain that the nodule was entered and adequately sampled. Moreover, a benign tissue diagnosis does not exclude

malignancy; a marked desmoplastic reaction is often present in pancreatic adenocarcinoma, so tissue sampling can be difficult and may give a false negative result.

THE FOURTH STEP: RECOMMENDATIONS CONCERNING THE PROCESS OF SAMPLING IN THE PATHOLOGY LAB

A devoted cytotechnical staff ensures optimal preparation, fixations, and staining of the specimens. The aspirate is processed by a number of methods, including direct smearing, cytocentrifuge or liquid-based preparation, and cell block [23]. The procedure depend of the aspect of the aspirate. If the aspirate is very bloody with only a few clumps of cells, a cell block preparation is essential. A cell block is prepared with tissue core fragments and of fluid sample sediment. The slide surfaces of the Coplin jar where the contents of the needle has been expelled, are examined carefully; any thick tissue fragments observed are scraped from the surface and resuspended in the AFA solution for postfixation. The sample is transferred to a centrifuge tube and centrifuged at 1,500rpm for 20 minutes. The supernatant is decanted, and two drops of reagent 2 (colored fluid) and of reagent 1 (clear fluid) (Shandon cytoblock[®], Thermo Electron Corporation) are added for obtaining a firm cell button which is processed as microbiopsies, embedded in paraffin mold. Warning: fixative should be alcohol to get the solidification of the gel. This system is designed to facilitate the preparation of paraffin-embedded cell suspensions, cell aggregates, and tissue fragments. These sections retain the gel matrix around the cells. This simple procedure takes a few minutes. Serial paraffin sections are cut routinely. Two are stained with hematoxylin-eosin-safron (HES), one with PAS and another one with AB. The matrix of the gel stains faintly with hematoxylin and AB. Systematically, four slides per puncture are read. If a discordance appears between the endoscopist diagnosis and the interpretation of the slides, new serial sections are required. When immunohistochemistry is anticipated from the microscopic examination of the smears, further sections are cut for this purpose.

Cystic fluid analysis of pancreatic cystic lesions is an important diagnostic tool [24-26]. EUS-guided FNA can be helpful in patients in whom the diagnosis still remains uncertain. If the aspirate concerns a cystic lesion, a proper cytological handling is used. If the fluid is watery, fluid concentration methods must be used. No conventional smears are used because the cellularity is too low to allow a diagnosis. Fluid concentration is obtained by using cytopspins[®] preparation or Cytoc[®] method. If the fluid content is thick, gelatinous, some drops of fluid are smeared onto one or three glass slides, immediately air-dried fixed, and stained by Diff-Quik[®] or HES, PAS and AB. If possible, the wall of the cystic lesion must also be aspirated by the needle.

For some difficult diagnoses such as undifferentiated tumors, other specialized diagnostic techniques are available, e.g. histochemistry or immunohistochemistry. Immunocytochemistry may be performed on both LBC and cell blocks. As compared to surgical pathology specimens, cytological specimens are very often of limited quantity and cellularity and do not always permit cell block preparation. Smears may be few in numbers. It is imperative that pathologists be selective regarding the choice of antibodies, although a smear negative for one antibody may be processed for another one. It is prudent to anticipate that the time of biopsy procedure be done when immediate interpretation is rendered, so that additional material can be aspirated and appropriate immunostains may be requested if necessary. Similarly, an aliquot may be saved for molecular studies. Several molecular techniques are being used to identify genetic abnormalities such as flow cytometry, polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization [27]. The use of molecular diagnosis as a diagnostic adjunct to pancreaticobiliary cytology has mainly focused on three molecular-genetic abnormalities: P53, telomerase and K-ras codon 12 [28-29].

THE FIFTH STEP: RECOMMENDATIONS CONCERNING THE FNA INTERPRETATION AND REPORT

The puncture is interpreted by a pathologist interested in FNA. A disinterested pathologist will render the technique totally useless. All surgical tissue diagnoses that have been obtained after FNA diagnoses should be available to the cytopathologist for quality controls purposes. Review of the FNA diagnoses in light of the surgical diagnoses helps the pathologist to formulate new, and to improve on existing cytologic criteria.

The cytopathologist should routinely go through a mental check list that includes the following points: the quality of fixation and staining, the cellularity for adequacy (number of cells present), the cellular composition, the morphology of individual cells, the architectural pattern of tissue fragments (arrangement of cells), and the extracellular material (background in which the cells are found such as stromal characteristics, inflammatory cells, necrosis, mucin...). The criteria for adequacy are site specific and very often subjective. A cytology is interpreted as "adequate for evaluation" if there is a sufficient number of representative cells from the target lesion, e.g. ductal epithelial cells for the pancreas. A cytology is interpreted as "unsatisfactory" if only blood is present.

Each lab should establish standards based on its own cytologic preparations, fixations, stains, and results of cyto-histologic correlation. Nuclear morphology is the most important feature which allows the differentiation between benign and malignant lesions. Various parameters such as nuclear size, shape, chromatin pattern, nuclear membranes, and nucleolar

morphology must be properly evaluated. The background features are dependent on the tumor itself, e.g. growth pattern and type of stroma, vascularity, excessive stroma and type of stroma, amount and type of inflammation, and necrosis.

Reasons for false-negative results

The main technical problems are sampling errors, inadequate suction and improper processing. In sampling errors, EUS-FNA concerns some tissue adjacent to the targeted mass lesion. Gastrointestinal epithelium is also a common contaminant in FNA which may clog up the channel of the needle. It may be impossible to distinguish gastrointestinal type epithelium from pancreatic ductal epithelium or from the epithelial border of a pancreatic cyst.

The precision of targeting will be limited by the size of the lesion, the ultrasound beam width and the definition of the margin of the lesion under ultrasound. It is therefore advisable that FNA should be repeated when the initial result in these small lesions does not agree with the suspicion raised by other investigations.

Other technical problems are due to insufficient material for diagnosis. It may be justifiable to increase the number of FNA attempts to more than three and to aim at obtaining at least one tissue fragment as the end point of biopsy.

Other difficulties are in relation with the nature of the lesions: densely fibrotic masses, necrosis or cystic changes, extremely well-differentiated tumors [30]. Lastly, the pathologist's misinterpretation may be the cause of the diagnostic failure, such as the pathologist's inexperience with some lesions.

Reasons for false-positive results

Markedly reactive mesothelial cells are a major pitfall of false positive diagnoses in aspirations of abdominal mass. Another error is the failure to recognize reactive, degenerative, or metaplastic changes. The misdiagnosis may be based on poorly preserved cells or on clinical misinformation.

Reporting

In many instances, FNA represents the definitive diagnosis on which treatment will be based; it is obvious the numerical system, class I to V, traditionally used in gynecologic smears does not provide sufficient information to the clinicians. Hence, nomenclature comparable to that in surgical pathology should be used whenever feasible. If a definitive interpretation is not possible, statements indicating the differential diagnosis possibilities should be included.

A negative report should be clearly stated as to the effect that the biopsy is negative because they are only normal cells intrinsic to the site of aspiration or because the aspirate is strongly suggestive of a benign lesion. In the former instance, the finding might well be the result of a sampling error.

RESULTS OF THE FRENCH SOCIETY OF CLINICAL CYTOLOGY STUDY ON LIQUID BASED CYTOLOGY IN EUS-FNA

If FNA is a sensitive test for diagnosing deep-organ lesions, errors in sampling and interpretation occur in 15 to 30 % of patients. Research to develop new tools and techniques to reduce such errors has been on the way for some time. Liquid-based technology is still a procedure under evaluation.

In this study, we aimed to compare the performance of two different techniques, namely the conventional cytology by direct smearing and liquid-based cytology (LBC) by Cytoc technique. This was a prospective study performed between June 2000 and June 2001. Informed consent of patients was taken and the study was approved by the French Ethics Committee. This study was supported by Grants from the Cancer Research Association. Three clinical centres (two in Paris, one in Marseille) with 6 endoscopists (G. Amouyal, P. Amouyal, A. Dancour, M. Giovannini, O. Marty, L. Palazzo) and 3 pathologists (N. Ben Lagha, M. Fabre, G. Monges) participated in this study. FNA of mediastinal and abdominal masses were performed under EUS guidance. The samples were split. The first half of the aspirate was submitted for direct smearing, thereafter they were air-dried and stained with Diff-Quik® or HES. The second half was rinsed into a vial containing 20mL of Cytolyt® for transport which is mucolytic and hemolytic. After having been fixed in PreservCyt® (50 % methanol), the sample was loaded on the ThinPrep 2000 automated processor (Cytoc Corp, Boxborough, MA). This processor provides a monolayered cell population with a cleaner background, facilitating cytologic evaluation. A single ThinPrep slide with a 20mm-diameter circle was stained either with Papanicolaou or HES. Slides were reviewed systematically according to a preformed format which included specimen adequacy, the number of representative and inadequate slides, the final cytological diagnosis (normal, inflammatory, suspicious malignant cells, and malignant cells). The pair of slides for each lesion per patient was evaluated independently by different pathologists. After the first

review, if the diagnosis of each technique was different, a second reading of the cytologic pair was made. If necessary, a third reading by both pathologists was organized for a final diagnosis. The final cytological diagnosis for each technique was compared with the gold standard, which was the final histological diagnosis, obtained on biopsies or surgical resections. For some benign histological cases, the diagnoses were correlated with follow-up. 241 EUS-FNA could be evaluated (pancreas: 60 %, lymph-node: 17 %, liver: 8 %, miscellaneous: 15 %). The number of non-representative cytologies was significantly higher for direct, conventional smears than for LBC slides (15.8 % vs 4.7 %, $p < 0.0001$). The sensitivity for LBC was also significantly higher than for conventional cytology (95.3 % vs 91.4 %, $p < 0.007$) [31-33].

CONCLUSION

Close interaction between the clinician and the pathologist is an essential component for the success of FNA in the workup of deep-seated lesions. Sampling and interpreting EUS-FNA require expertise. A diagnosis of malignancy may result in debilitating surgery causing pathologists to potentially be hesitant in rendering a definitive diagnosis. However, in the hands of experienced pathologists, FNA in conjunction with ancillary techniques can reach a diagnostic sensitivity approaching 95 % and a specificity of 100 % for the diagnosis of malignancy. Reported false-negative rate is ranging from less than 1 % to 4 % for adequate specimen. Sample collection and storage of liquid-based cytology are simple and permit the collection of cells for both routine cytologic diagnosis and ancillary studies. This technique allows molecular analysis for selecting appropriate treatment with prognostic and predictive markers [34]. A cell block preparation including tissue fragments and clotted blood in a gel matrix can routinely be used in every histopathology laboratory. A combined evaluation of conventional smears, LBC and microhistological sections increases the amount of information obtained from EUS-FNA and renders the report issued more accurate and clinically useful.