

Traitement des biopsies obtenues par ponction-biopsie à l'aiguille fine sous écho-endoscopie (EUS-FNA). Expérience de l'« Hospital Clinic » de Barcelone

M. SOLÉ

Hospital Clinic, IDIBAPS – University of Barcelona (Spain)

The management of specimens obtained by EUS-FNA. Experience of the Hospital Clinic of Barcelona

RÉSUMÉ

La ponction à l'aiguille fine sous échoendoscopie (EUS-FNA) représente un changement radical dans la pratique de nombreux cytopathologistes. Bien qu'ils soient habitués à interpréter des ponctions à l'aiguille fine dans d'autres domaines, l'EUS-FNA est certainement le moyen le plus sophistiqué pour obtenir du matériel cytologique. La procédure prend du temps et son coût est élevé. Par conséquent, la personne qui reçoit le matériel est tenue de s'assurer non seulement qu'il est utilisable à des fins diagnostiques mais également qu'il sera traité de manière correcte de façon à permettre l'application de techniques complémentaires pouvant s'avérer utiles au diagnostic ou à la recherche. Nous abordons dans cet article les différents modes opératoires que nous utilisons pour une bonne prise en charge de ces échantillons, dans notre structure hospitalière de Barcelone.

SUMMARY

Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration represents a very significant change in the way in which many pathologists face their professional activity. Although cytopathologists are used to assist to FNA in other settings, this is probably the most sophisticated way in which cytological specimens can be obtained, it is highly time-consuming, and the pressure produced by the cost of the whole procedure is particularly strong. Thus, the person who receives the sample is urged to assure, not only that the material will be adequate for diagnosis, but also that it will be processed in the proper way to make it useful for any additional technique that could be required for diagnostic or research purposes. In this review we summarize the basis for an efficient management of the samples according to our experience in the Hospital Clínic of Barcelona.

ÉVALUATION IMMÉDIATE

Il est établi que l'évaluation immédiate des prélèvements a un impact majeur sur la performance diagnostique de l'EUS-FNA. Les résultats publiés indiquent une diminution des taux d'échantillons non représentatifs et une augmentation de la sensibilité et la fiabilité globale [1, 2]. Dans une analyse prospective de ponction pancréatique par EUS-FNA, nous avons observé que le nombre moyen de passages de l'aiguille au sein de la lésion et nécessaire à l'obtention du diagnostic avec évaluation en salle d'examen était de 2,36 avec une fiabilité diagnostique de 91 % quand le cytopathologiste est présent en salle d'endoscopie. En revanche, la fiabilité diagnostique n'est que de 79 % quand on effectue 3 passages dans la lésion sans évaluation de l'échantillon en salle. Pour obtenir un taux de fiabilité diagnostique de 91 %, il faut réaliser en moyenne 5 passages dans la lésion (Tableau I). Cela signifie que, si dans certains cas, 5 passages ou plus sont nécessaires, dans de nombreux autres cas, du matériel permettant un diagnostic peut être obtenu

TABLEAU I

FIABILITÉ DIAGNOSTIQUE SELON LE NOMBRE DE PASSAGES DE L'AIGUILLE DANS UNE SÉRIE DE 35 EUS-FNA POUR ADÉNOCARCINOME PANCRÉATIQUE

Cytopathologiste en salle	Nb Passages de l'aiguille	Fiabilité diagnostique
OUI	2,36	91 %
NON	3	79 %
NON	4	89 %
NON	5	91 %

après un ou 2 passages. Un calcul rapide des coûts liés à la prise en charge du patient et en particulier des coûts occasionnés par un temps d'exploration plus long, fait ressortir un bénéfice compensant largement celui attaché à la présence d'un cytopathologiste pour une durée d'environ une heure par cas. La question de savoir si ce bénéfice est pris en compte ou non par le

Tirés à part : D^r M. SOLÉ, S. Anatomia Patologica - Hospital Clinic - Villarroel 170 - 08036 Barcelona (Spain).

Mots-clés : aspiration à l'aiguille fine, échantillon, écho-endoscopie.

Key-words : echo-endoscopy, fine needle aspiration (FNA), specimen.

système de santé en terme de remboursement, n'est pas le sujet de cet article [3].

Une évaluation immédiate peut-être réalisée en salle d'examen par un cytopathologiste ou un cyto-technicien avec ou sans consultation du cytopathologiste ou après transfert immédiat de l'échantillon au laboratoire. Dans notre clinique, un cytopathologiste est présent dans la salle d'endoscopie durant toute la procédure. Outre la rapidité de réponse, cette approche permet d'obtenir une information de premier ordre sur les caractéristiques cliniques et d'imagerie du cas traité et la localisation exacte de l'aiguille durant l'aspiration. Un cytopathologiste expérimenté est capable de donner des conseils au cours de la procédure, par exemple, pour ponctionner sans aspiration des lésions hautement hémorragiques ou changer la position de l'aiguille lorsque celle-ci n'aspire que du tissu nécrotique.

L'examen macroscopique de l'échantillon peut aider à orienter le diagnostic, en particulier pour les lésions kystiques. Bien que l'apparence du liquide ne puisse pas à elle seule conclure au diagnostic, elle ne doit cependant pas être négligée car c'est souvent la meilleure preuve de la nature mucoïde d'un kyste [4]. L'examen extemporané du liquide est rarement nécessaire sauf si se pose le diagnostic différentiel avec un foyer infectieux, auquel cas la nature inflammatoire du liquide doit être établie de façon à envoyer un échantillon au laboratoire de microbiologie pour faire une culture. En cas de kyste pancréatique, une partie du liquide aspiré est envoyé au laboratoire de biochimie pour analyse de l'amylase et dosage des marqueurs tumoraux [5].

L'examen immédiat en salle d'endoscopie est réalisé en utilisant une coloration rapide, en général de type Romanowski telle que le Diff-Quik®. Des protocoles rapides sont également disponibles pour les colo-

rations à l'hématoxyline et l'éosine ou pour le Papanicolaou, mais leur application en salle d'endoscopie s'avère difficile. Nous utilisons des étalements sur lames en partageant en deux l'échantillon : une partie pour coloration rapide et l'autre partie, fixée à l'alcool pour une coloration ultérieure de type Papanicolaou. Un des écueils les plus fréquents de l'évaluation immédiate est la possibilité d'une contamination sur le trajet de l'aiguille. Au début de notre expérience, nous avons pu observer que de la muqueuse digestive apparaissait fréquemment sur les étalements (Figure 1). La contamination gastro-intestinale était particulièrement problématique en raison de la confusion possible entre muqueuse gastrique et cystadénome muqueux et entre muqueuse duodénale et épithélium canalaire du pancréas. Par conséquent, contrairement à d'autres domaines de cytopathologie, l'analyse immédiate du matériel de ponction sous EE nécessite d'évaluer la cellularité mais également de vérifier que les cellules obtenues correspondent bien à celles attendues au niveau de la lésion. Il sera impossible par la ponction sous EE de faire la stadification d'un cancer colorectal car la ponction est contaminée par la muqueuse néoplasique. Dans d'autres cas, il sera extrêmement difficile de décider en quelques minutes si un étalement contient de la muqueuse normale ou du matériel correspondant à un adénome bien différencié.

MÉTHODE

Le traitement classique appliqué en cytologie s'applique également aux échantillons obtenus par EUS-FNA. Les étalements directs de lésions solides, ou les lames préparées selon la technique de Cytospin® des lésions kystiques sont fixées immédiatement dans l'alcool à 96°. Cette méthode permet une excellente morphologie cellulaire avec la coloration de Papani-

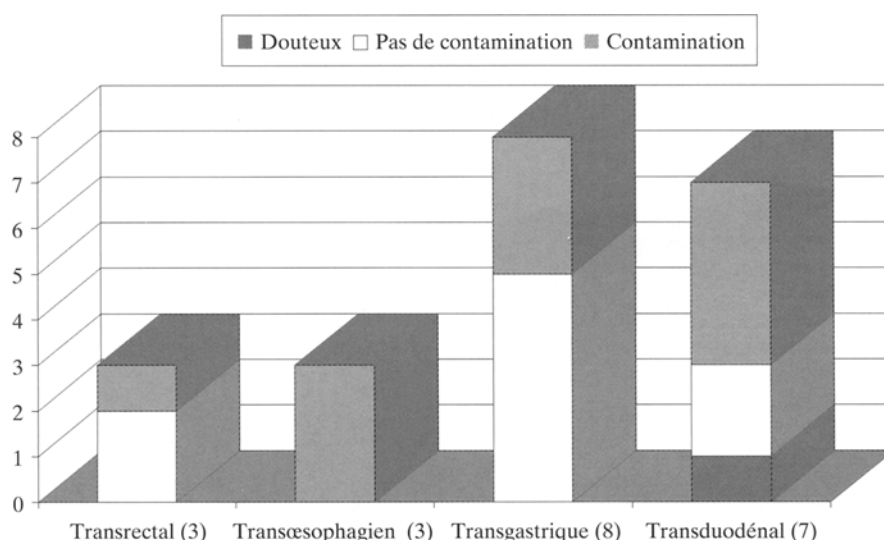


Figure 1
Fréquence de la contamination par de la muqueuse normale sur le trajet de l'aiguille dans une série de 21 cas d'EUS-FNA.

colaou et elle permet à la demande, l'immuno-histochimie (ICC). Les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) en sont un bon exemple avec le *c-kit*.

L'étalement fixé comme celui séché à l'air utilisé pour une évaluation rapide, permettent l'analyse de l'ADN par grattage des lames.

Il faut être particulièrement vigilant et récupérer tous les fragments de tissu et caillots lors de l'étalement direct sur lame pour constituer un cytobloc. Dans la plupart des cas, les rinçures d'aiguilles sont centrifugées et traitées en cytobloc. Bien que les détails cytologiques ainsi obtenus soient de faible définition, des coupes sériées peuvent être effectuées pour réaliser une immunohistochimie et cela même en cas de faible cellularité.

Une alternative simple mais plus coûteuse pour une conservation adéquate des spécimens est la technique d'application en couche mince. Le système le plus répandu est le ThinPrep[®], qui permet de préserver la morphologie cellulaire et les acides nucléiques. Le système fournit des lames propres et représentatives avec un excellent détail cellulaire [5]. Cependant, certains critères diagnostiques fréquemment utilisés sur échantillons à l'aiguille fine doivent être réinterprétés lorsque l'on a recours à l'étalement en couche mince. De plus, bien que la récupération de cellules au sein du liquide kystique soit meilleure, le milieu Cytolit[®] utilisé interfère dans la composition du mucus qui est une des clés diagnostiques des tumeurs kystiques pancréatiques.

L'évaluation immédiate permet au cytopathologiste de décider de la méthode la plus adaptée au traitement des spécimens en fonction de la pathologie suspectée. Ainsi, une partie de l'échantillon peut être soumise à l'analyse biochimique, microbiologique, ultrastructurale ou moléculaire en fonction des premières indications données par l'examen microscopique. Dans notre expérience, l'application de la cytométrie de flux pour l'immunophénotypage en cas de suspicion de lymphome malin est spécialement importante et ce, plus particulièrement lorsque les adénopathies suspectes sont profondes, permettant ainsi d'éviter une approche diagnostique agressive.

Le développement de la pathologie moléculaire ouvre un large éventail de nouveaux critères diagnostiques et de stratégies thérapeutiques dirigées ciblées. Le traitement des échantillons prélevés par EUS-FNA doit être orienté de façon à répondre à un nombre de questions spécifiques et à éviter de nouveaux prélèvements. A l'heure actuelle, l'immunocytochimie (ICC) est toujours la technique préférée pour mettre en évidence une altération significative de gènes mais la cytogénétique et l'analyse de l'ADN sont de plus en plus utilisées pour affiner les résultats de l'ICC. Comme nous l'avons mentionné plus haut, les échantillons cytologiques collectés en routine conviennent pour un nombre limité mais parfaitement adapté d'analyses comme l'ICC ou l'étude de l'ADN et c'est le cas pour la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Récemment, nous avons obtenu un matériel représentatif en utilisant un échantillon tout à fait marginal provenant du produit de rinçage de l'aiguille qui nous a permis d'étudier les mutations de k-ras et l'hyperméthylation génétique [6, 7].

Les techniques d'obtention du CDNA et celles utilisant des micro-puces à oligonucléotides nécessitent des quantités d'ARN difficiles à obtenir à partir d'aiguilles fines [8], en particulier quand une partie de la ponction est utilisée pour le diagnostic morphologique, un pré-requis pour s'assurer de la validité de l'échantillon.

Ces micropuces sont utilisées uniquement pour la recherche, car les applications cliniques vont demander des profils limités. Nous devons nous préparer à un futur proche où des thérapies néoadjuvantes efficaces limiteront de façon drastique la disponibilité de tissu tumoral obtenu à partir de pièces chirurgicales, nous obligeant alors à obtenir du matériel de recherche à partir des techniques diagnostiques préopératoires. Comme les protocoles d'amplification de l'ARN doivent être améliorés, un bon exercice consiste à stocker des échantillons dans un conservateur d'ARN adapté.

RÉFÉRENCES

1. Klapman JB, Logrono R, Dye CE, Waxman I: Clinical impact of on-site cytopathology interpretation on endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1289-94.
2. Jhala NC, Jhala D, Eltoun I, Vickers SM, Wilcox CM, Chhieng DC, Eloubeidi MA. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy: a powerful tool to obtain samples from small lesions. *Cancer Cytopathol* 2004; 102: 239-46.
3. Schwartz MR. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. Time, diagnostic challenges, and clinical impact. *Cancer Cytopathol* 2004; 102: 203-6.
4. Centeno BA. Role of cytology in the diagnosis of cystic and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2002; 12:697-708.
5. Frossard JL, Amouyal P, Amouyal G, et al. Performance of endosonography-guided fine needle aspiration and biopsy in the diagnosis of pancreatic cystic lesions. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1516-24.
6. Pellise M, Castells A, Gines A, et al. Clinical usefulness of KRAS mutational analysis in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by means of endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003; 17: 1299-307.
7. Pellise M, Castells A, Gines A, Agrelo R, Sole M, Castellvi-Bel S, Fernandez-Esparrach G, Llach J, Esteller M, Bordas JM, Pique JM. Detection of lymph node micrometastases by gene promoter hypermethylation in samples obtained by endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 4444-9.
8. Assersohn L, Gangi L, Zhao Y, Dowsett M, Simon R, Powles TJ, Liu ET. The feasibility of using fine needle aspiration from primary breast cancers for cDNA microarray analyses. *Clin Cancer Res*. 2002; 8: 794-801.

IMMEDIATE EVALUATION

Immediate evaluation of the obtained specimen is claimed to have a major impact on the diagnostic performance in EUS-FNA procedures. Published data states that it decreases the unsatisfactory rate, increases sensitivity and increases the overall accuracy [1, 2]. In a prospective analysis of pancreatic EUS-FNA, we observed that the mean number of passes necessary to reach a diagnosis with on-site evaluation was 2,36 for an accuracy rate of 91 %, whereas with 3 passes in every case without on site evaluation the accuracy rate would have been 79 %, and to achieve a diagnostic accuracy of 91 % it would have been necessary to perform 5 passes per case (Table I). This means that, although some cases require 5 or more passes, many others yield diagnostic material in the first or second ones. A rough calculation in terms of costs related to patient care, and specifically for costs derived from increased exploration time, largely compensates the cost of having a cytopathologist dedicated to the procedure for a time approaching one hour per case. Whether these arguments are taken into account by those who are responsible of reimbursement is a matter out of the scope of this article [3].

TABLE I
DIAGNOSTIC ACCURACY ACCORDING
TO THE NUMBER OF PASSES IN A SERIES
OF 35 EUS-FNA OF PANCREATIC ADENOCARCINOMA

Attending Pathologist	Needle Passes	Diagnostic Accuracy
YES	2.36	91 %
NO	3	79 %
NO	4	89 %
NO	5	91 %

Immediate evaluation can be performed by on-site assistance by a cytopathologist, on-site assistance by a cytotechnologist with or without consultation to the cytopathologist, or immediate transportation to the laboratory. In our institution, a cytopathologist is present in the endoscopy room during the whole procedure. This approach allows, in addition to the fastness of the response, to have first hand information about the clinical and imaging features of the case and the exact location of the needle during aspiration. An experienced cytopathologist is able to advise on the procedure, for instance, avoid aspiration in highly hemorrhagic lesions, or change the needle location when only necrosis is aspirated.

Gross examination of the obtained sample can aid to orientate the diagnosis, particularly in cystic lesions. Although the appearance of the fluid cannot make by itself a conclusive diagnosis, it should be recorded, since often it is the best evidence for the mucinous nature of a given cyst [4]. In situ microscopic examination is seldom necessary when a cystic lesion is aspi-

rated, unless the differential diagnosis with an infectious condition rises, in which case the inflammatory nature of the fluid should be ascertained in order to send a sample to the microbiology laboratory. In pancreatic cysts, part of the aspirated fluid is sent to the general laboratory for analysis of amylase and tumor markers [5].

Microscopic examination in the endoscopy room is performed using a quick stain, usually of the Romanowski type, such as Diff-Quik®. Rapid protocols are also available for hematoxylin & eosin and Papanicolaou stains, but their implementation in an endoscopy office is difficult. We perform smears with the split method, thus obtaining two sets of specular smears, one for the quick stain and the other for alcohol fixation and further Papanicolaou stain.

One of the most common pitfalls in immediate evaluation is the contamination related to the needle path. In a survey of our early experience, we observed that normal digestive tract mucosa appeared frequently in smears (Figure 1), and that gastro-duodenal contamination was particularly disturbing, since gastric mucosa can bear some resemblance with mucinous neoplasms, and duodenal mucosa is similar to ductal epithelium of the pancreas. This implies that, in contrast with adequacy assessment in other fields, in EUS-FNA it is not sufficient to state that cellular material is present, but a diagnostic analysis has to be performed to assure that it is representative of the targeted lesion. This will be impossible in cases such as staging of colorectal cancer when the needle passes across neoplastic mucosa. In other cases, it is extremely difficult to decide in few minutes whether a smear contains normal mucosa or a well differentiated adenocarcinoma.

METHODS FOR PROCESSING

Classical management of cytological specimens applies also for EUS-FNA obtained samples. Direct smears from solid lesions, or slides obtained after cytopspin processing for cystic lesions are fixed immediately in 96° alcohol. This method assures an excellent cytomorphology with Papanicolaou stain, and is also suitable for most immunocytochemical studies, particularly when a few markers are necessary, as is the case for GISTs and c-kit. Both fixed smears and the air-dried ones used for rapid evaluation are adequate for DNA extraction via scraping of the slides.

We pay special attention to recover small fragments of tissue and clots when the specimen is sprayed onto slides, and use them for cellblock procedures. In most cases, the needle lavage product is centrifuged and processed also as a cellblock. Although the cytological details in cellblock sections are poorly defined, serial sections can be made for application of immunohistochemical panels, even in cases with scant cellularity.

A simple but more expensive alternative for an adequate preservation of the specimens is the application of thin layer fluid based technologies. The most widespread system is ThinPrep®, that provides a fixa-

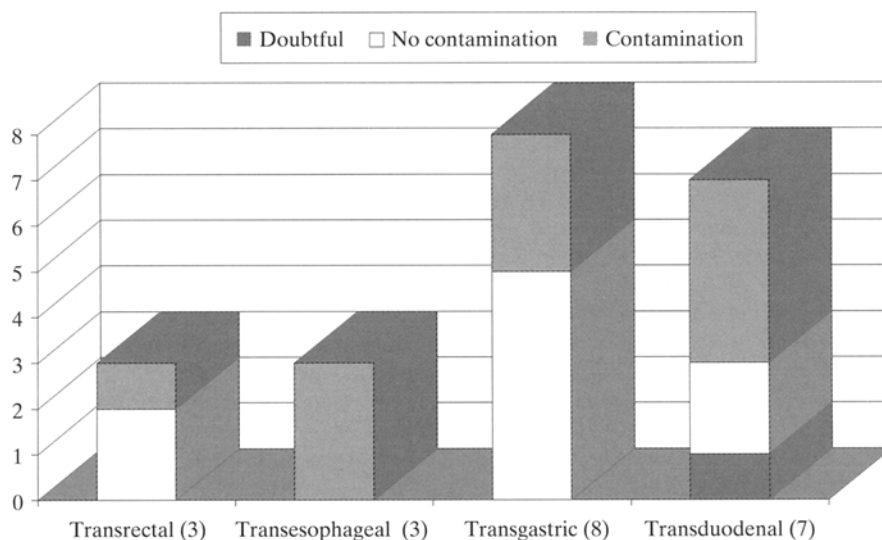


Figure 1
Frequency of needle track contamination by normal mucosa in a series of 21 EUS-FNA cases.

tive that allows to preserve both cellular morphology and nucleic acids. The system produces representative and clean slides, and cellular detail is excellent [5]. However, some of the criteria commonly used for the diagnosis of FNA samples have to be reinterpreted when using thin layer smears; moreover, although cellular recovery in cyst fluids can be higher, the provided preservative interferes with the recognition of mucus, one of the diagnostic clues in pancreatic cysts.

Immediate evaluation allows the pathologist to decide the proper way of processing the specimen according to the suspected pathology. So, part of the sample can be submitted to biochemical, microbiological, ultrastructural or molecular analysis depending on the first impression on microscopic examination. In our experience, major impact results for the application of flow cytometry for immunophenotyping in cases with suspicion of malignant lymphoma, particularly in cases in which pathologic lymph nodes are limited to deep locations and an aggressive diagnostic approach can be avoided.

FUTURE PROSPECTS

The development of molecular pathology opens a scope of new diagnostic criteria and therapeutic strategies directed to molecular targets. Management of the

specimens obtained by EUS-FNA has to be oriented to answer a number of specific questions and to prevent for future requirements. Currently, immunocytochemistry (ICC) is still the preferred way to demonstrate significant gene alterations, but cytogenetics and DNA analysis are increasingly used to refine the ICC findings. As it is pointed above, routinely collected cytological specimens are suitable for a limited but adequate number of ICC and DNA analysis, and this is the case also for FISH. Recently, we have obtained adequate material for *k-ras* and hypermethylation studies using a very marginal sample from the needle-rinsing product [6, 7].

c-DNA and oligonucleotide based microarrays require an amount of RNA difficult to obtain from FNA specimens [8], particularly when part of these are used for morphologic diagnosis, a necessary prerequisite to assure the adequacy of the sample. Those huge microarrays are restricted to research purposes, since clinical applications probably will require only limited profiles. We have to be prepared for a near future in which effective neoadjuvant therapies will limit drastically the availability of tumor tissue from surgical specimens, thus obligating to obtain research material for new developments from the preoperative diagnostic procedures. Since RNA amplification protocols are to be improved, a good exercise is trying to store samples in adequate RNA preserving medium.