

A propos d'une étude prospective sur l'examen extemporané des ponctions sous échoendoscopie digestive. Proposition pour une bonne prise en charge des prélèvements

M. LABADIE

Groupement de Recherche Cytologique, Limonest ; Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital Edouard Herriot, Lyon (France)

Prospective survey on immediate examination of EUS guided fine needle aspiration. Proposal for a good management of the specimens

RÉSUMÉ

Le rendement de la ponction sous échoendoscopie digestive dépend de la technique utilisée par le pathologiste et de l'examen du prélèvement en extemporané lors de la ponction.

SUMMARY

The EUS-FNA yield depends on the technique used by the pathologist and also on the extemporaneous analysis of the sample during the puncture.

QUELLES SONT LES SOLUTIONS TECHNIQUES POSSIBLES QUAND LE MATÉRIEL DE PONCTION EST DANS L'AIGUILLE ?

Le choix est conditionné par l'expérience du pathologiste. En effet, les pathologistes n'ont pas tous la même approche car la cytologie n'est pas systématiquement enseignée. La pratique cytologique en routine est donc une caractéristique personnelle ce qui est à l'origine de conceptions diamétralement opposées quant à la rentabilité de telle ou telle technique.

Une fois le matériel dans l'aiguille, on peut ainsi soit le placer dans un liquide fixateur soit l'étaler sur lame.

Étalement sur lames

L'étalement sur lame est naturel pour un praticien de la cytologie. Les avantages sont connus. En effet, la morphologie cellulaire n'est pas le seul critère qui permette un diagnostic. L'architecture du prélèvement sur lame est parfois fondamentale. L'environnement également. La nécrose et le fond de la préparation contribuent au diagnostic. La mise en suspension du matériel prive le cytologiste de ces arguments. Une fois le matériel étalé sur lame, il

faut choisir la coloration qui conditionne le mode de fixation.

La coloration de Papanicolaou suppose une fixation soignée.

La coloration par le Giemsa pur se contente d'un simple séchage à l'air.

Le défaut de la cytologie sur lame réside dans l'impossibilité de recourir aux immunomarquages. On ne peut donc se limiter à cette technique.

Recueil dans un fixateur

Fixateur alcoolique

Pour les deux techniques de cytologie en couche mince (cytologie en milieu liquide) agréées par la FDA, il est nécessaire de recueillir le matériel sur un liquide particulier. Ces liquides protégés par des brevets contiennent de l'eau, de l'alcool et d'autres composants tenus secrets. Si l'on veut récolter une partie du prélèvement sans avoir recours à ces techniques de cytologie en couche mince, il suffit de le placer dans de l'alcool à 50°.

Cytologie en couche mince : ces 2 techniques font l'objet de protocoles bien précis pour chaque tech-

Tirés à part : D^r Michel LABADIE, 41, allée des Cyprès, 69578 Limonest (France).

Mot-clés : écho-endoscopie, examen extemporané, ponction.

Key-words : echo-endoscopy, extemporaneous examination fine needle biopsy.

nique soit par filtration soit par sédimentation différentielle.

Centrifugation et étalement sur lame : mais la technique par étalement ne permet pas l'utilisation rationnelle des immunomarquages. En effet, s'il est possible de réaliser des immunomarquages de qualité sur des étalements cytologiques, on ne sait pas, avant la technique, si les lames contiennent des cellules significatives. Par ailleurs, en France cette technique ne figure pas dans la nomenclature des actes remboursés.

Centrifugation et inclusion en paraffine : le culot cellulaire obtenu par centrifugation est inclus en paraffine ce qui ouvre toutes les possibilités de l'histologie traditionnelle, et donc une utilisation rationnelle des immunomarquages.

Formol ou équivalents

Inclusion en paraffine et histologie traditionnelle.

Pour assurer la qualité du prélèvement, il faut en passer par un examen extemporané

L'objectif de cet examen n'est pas de porter un diagnostic mais de déterminer si le prélèvement est satisfaisant en terme de cellularité.

Par un pathologiste sur site : le pathologiste pourra se prononcer sur la qualité du prélèvement ce qui est le but de l'examen, mais aussi dans un certain nombre de cas, assurer un diagnostic. Si la présence du pathologiste sur site est séduisante, en pratique, elle suppose une unité de lieu rarement réalisée. Elle est concevable dans un centre hospitalier mais pas en exercice de ville.

Par le gastroentérologue : l'évaluation de la cellularité des lames par l'échoendoscopiste suppose une formation préalable mais elle est une alternative réaliste. Il suffit de disposer d'un microscope et de bleu de toluidine, colorant utilisé par le pathologiste en routine lors des extemporanés.

EXPÉRIENCE LYONNAISE MENÉE PAR B. PUJOL, B. NAPOLÉON, M. LABADIE

Cette expérience a fait le choix de la simplicité et de l'universalité. Pour la simplicité des choix techniques, nous avons choisi le partage du prélèvement en deux parties. Une partie est étalée sur 3 à 4 lames séchées à l'air. L'autre partie est placée dans un flacon d'alcool à 50°.

Le choix de l'étalement au détriment de la cytologie en milieu liquide, permet un examen extemporané d'une lame par l'échoendoscopiste. La lame jugée la moins riche par l'opérateur est colorée au bleu de toluidine, ce qui prend quelques secondes, puis examinée au microscope, ce qui prend moins d'une minute.

Si le prélèvement est cellulaire, il est possible dans un contexte non expérimental de cesser la ponction,

sinon une nouvelle ponction est réalisée jusqu'à obtention d'un matériel satisfaisant dans la limite de 5 passages. En pratique, cette approche permet de limiter le nombre de passages puisque le premier passage est satisfaisant dans 86 %.

Au laboratoire de pathologie, nous recevons donc pour chaque passage 3 à 4 lames dont une est déjà colorée par le bleu de toluidine et un flacon contenant un matériel cellulaire en suspension dans de l'alcool à 50°. Toutes les lames sont colorées par le Giemsa pur après fixation au méthanol pendant 45 minutes. La juxtaposition des 2 colorations bleu de toluidine puis Giemsa produit une coloration un peu soutenue, mais de qualité.

La suspension alcoolique fait l'objet d'une centrifugation (2600 tours pendant 15 minutes). Le surnageant est totalement éliminé. Le culot cellulaire est alors intimement mélangé (vortex) aux deux composants du kit Cytoblock de ThermoShandon, pour obtenir une sorte de gélatine qui contient les cellules. Ce matériel est alors considéré comme une biopsie et traité comme tel par inclusion en paraffine. Les coupes sériées et les immunomarquages sont utilisés en fonction des besoins.

DISCUSSION

Nous avons fait le choix de la simplicité car la coloration des étalements par le Giemsa et la mise en suspension d'une partie du prélèvement dans de l'alcool à 50° pour une inclusion en paraffine sont à la portée de tous les pathologistes. Une méthode ne peut prétendre se développer que si les moyens mis en œuvre sont simples. La formation préalable des échoendoscopistes s'est limitée à quelques séances de travail au microscope multi-têtes. Le but de cette formation est de reconnaître les cellules épithéliales parmi tous les éléments constitutifs des étalements obtenus par ponction sous échoendoscopie digestive, puis de juger de la contamination cellulaire par le matériel digestif. Assez rapidement, les échoendoscopistes révèlent des qualités d'analyse microscopique convaincantes, car ces hommes pratiquent l'analyse d'image à longueur de journée. Très rapidement, leur évaluation de la cellularité du prélèvement atteint un niveau satisfaisant, et il faut même calmer leurs ambitions puisqu'ils sont tentés par le diagnostic.

Pour le pathologiste, cette participation active de l'échoendoscopiste est très positive. Elle se traduit par une amélioration quantitative et surtout qualitative des étalements. L'échoendoscopiste améliore la qualité de son étalement coloré par le bleu de toluidine et par voie de conséquence tous les étalements.

En effet, si la lame jugée la plus mauvaise à l'œil est considérée comme cellulaire au bleu de toluidine, les autres étalements sont pratiquement toujours de bien meilleure qualité. Ceci explique la qualité des résultats quand la première lame est jugée satisfaisante. Cette prise en charge de la qualité du prélèvement par le préleveur permet également une meilleure

compréhension mutuelle des problèmes posés par la pathologie.

Dans notre pratique, le diagnostic final est pratiquement toujours assuré sur les étalements. Sur notre série de 100 patients, seul un cas n'a été diagnostiqué que sur coupe histologique.

Par contre, l'apport du cellblock est indiscutable lorsque le recours aux immunomarquages est utile ou nécessaire au diagnostic. Le diagnostic de carcinome endocrine est aisé sur les étalements car l'architecture des étalements et la morphologie cellulaire sont spécifiques, mais il est sécurisant de confirmer le diagnostic par la mise en évidence d'une sécrétion neuroendocrine. Pour le diagnostic de tumeur kystique et papillaire du pancréas (diagnostic différentiel du carcinome endocrine), l'apport des marquages est encore plus significatif.

Pour les tumeurs conjonctives, l'apport de la coupe histologique et des marquages est significatif. Le diagnostic de tumeur stromale (GIST) ne peut se passer des marquages CD34 et CD117.

En fait, l'idéal est d'associer les qualités des deux méthodes cytologiques et histologiques.

WHAT ARE THE POSSIBLE TECHNICAL SOLUTIONS WHEN THE MATERIAL IS IN THE NEEDLE?

The choice is conditioned by the pathologist's experience. All pathologists do not have indeed the same approach as cytology is not systematically taught. The cytological practice in routine is therefore an individual characteristic and this leads to diametrically opposite conceptions concerning efficiency of different techniques.

Once the tissue material is collected in the needle, it can either be placed in a fixative liquid solution or spread on a slide.

Smearing on slides

The smearing on a slide is easy for a cytologist. The advantages are known. As a matter of fact, cellular morphology is not the only criteria permitting a diagnosis. Architecture of the specimen on slide is sometimes fundamental as is also environment. Necrosis and sediments of the specimen contribute to the diagnosis. When in suspension material deprives the cytologist of this knowledge. Once the material is spread on the slide it is necessary to choose the staining that conditions the mode of fixing.

The Papanicolaou staining supposes a careful fixing.

The pure Giemsa staining only requires air-dried slides.

Reste la question de l'utilisation de la cytologie en couche mince ou cytologie en milieu liquide. A notre avis, les avantages de la méthode sur la qualité cellulaire ne compensent pas la perte des informations résultant de la mise en suspension du prélèvement et du nettoyage consécutif soit à la filtration soit à la centrifugation différentielle. Ces techniques font partie de notre activité en routine depuis plusieurs années. Si elles ont apporté la preuve de leur intérêt en gynécologie, il ne s'agit pas pour autant d'une méthode universelle.

CONCLUSION

Le produit de la ponction sous échoendoscopie digestive est précieux. Il faut s'assurer de sa représentativité et utiliser des techniques adaptées pour un diagnostic optimal.

L'examen en extemporané des étalements par les échoendoscopistes est une solution pragmatique et efficace. L'association cytologie par étalement et inclusion en paraffine permet par la suite de rester dans ce registre de l'efficacité et de la simplicité.

The drawback of cytology on slides lies in the inability to use immunomarkers. We cannot therefore limit ourselves to this technique.

Deposit in a fixative liquid

Alcohol fixative

For both cytology techniques using thin layer (cytology in liquid environment) approved by the FDA it is necessary to put the material into a special liquid. These liquids, protected by patents, contain water, alcohol and other components kept secret. If we want to collect a part of the specimen without using these thin layer techniques, the tissue can simply be collected in 50° alcohol.

Thin layer cytology: these 2 techniques are subject of very precise protocols using either filtration or differential sedimentation.

Centrifugation and spreading on slide: but smearing does not allow for the rational use of immunomarkers. Indeed if it is possible to obtain good immunomarking on cytological smears, it is impossible to know, before they are processed, whether the slides contain significant cells. Furthermore in France this technique is not reimbursed.

Centrifugation and inclusion in paraffin: Cellular sediments obtained by centrifugation are included in paraffin which opens all possibilities for traditional histology, and therefore a rational use of immunomarkers.

Formalin or equivalent

Paraffin embedding and traditional histology.

To assess the quality of the specimen, an on-site examination is mandatory

The aim of this examination is not give a diagnosis but to determine if the specimen is satisfactory in term of cellularity.

By a cytopathologist on site: the pathologist will be able to decide of the quality of the specimen which is the aim of the examination, but also in a certain number of cases to give a diagnosis. If the presence of a cytopathologist in the endoscopic room is attractive, in practice this condition can rarely be achieved. It is possible in a hospital but not in private practice.

By the gastroenterologist: the assessment of the cellularity of the slides by the endosonographer supposes a previous training but it is a realistic alternative. Only a microscope and toluidine blue, a dye used by pathologist in routine, are needed.

LYON'S EXPERIENCE BY B. PUJOL, B. NAPOLÉON, M. LABADIE

This experience privileged simplicity and universality. For the simplicity of technical choice, we chose to divide the specimen in two parts. A part is spread on 3 to 4 air-dried slides. The other part is placed in a small flask with 50° alcohol.

The choice of smearing rather than cytology in liquid environment, allows for an immediate examination of the slide by the endosonographer. The slide which is considered by the operator as containing poorer material is stained with toluidine blue, which takes a few seconds, then examined on the microscope, which takes less than one minute.

If the specimen is cellular it is possible in a non-experimental context to stop puncturing, otherwise another FNA is performed until obtaining a satisfactory material within the limit of 5 passages. In practice this approach permits to limit the number of passages since the first passage is satisfactory in 86 %.

In the pathology lab we receive therefore 3 to 4 slides for each passage, one of which is already stained by toluidine blue and a small flask of cellular material in suspension in 50° alcohol. All slides are stained with pure Giemsa after having been fixed with methanol for 45 minutes. The juxtaposition of the 2 colorants toluidine blue and Giemsa produces a little more intense coloration, but of good quality.

The alcoholic suspension will be centrifuged (2600 revolutions per 15 minutes). The supernatant is completely removed. The cellular sediments are then intimately mixed (vortex) to the two components of the Cytoblock kit (Thermo Shandon), in order to get a

sort of jelly containing the cells. This material can then be considered as a biopsy and processed like as such by paraffin embedding. Serial sections and immunomarkers can be used according to further needs.

DISCUSSION

We made the choice of simplicity because staining smears by Giemsa and setting in suspension a part of the specimen in 50° alcohol for paraffin inclusion is accessible to all pathologists. A method can become widespread if it required simple means. Preliminary training of the endosonographers was limited to some work sessions with a multihead microscope. The goal of this training was to be able to recognize the epithelial cells among all constituents of the smear obtained by EUS-FNA, then to be able to evaluate a cellular contamination by digestive material. Endosonographers quickly reveal qualities in microscopic analysis, because of their practice with image analysis all day long. Very quickly their assessment of the specimen reaches a satisfactory level, and it is even necessary to calm their ambitions since they are tempted to assess the diagnosis.

For the pathologist this active collaboration of the endosonographer is very positive. It results in a quantitative and especially qualitative improvement of smears. The endosonographer improves the quality of his/her smearing, stained with toluidine blue and as a consequence of all smears.

Indeed if the slide badly judged at first sight is revealed as cellular by toluidine blue, the others smears have all chances to be of much better quality. This explains the quality of the results when the first slide is judged satisfactory. This assessment of the quality of the smear by the technician also permits a better mutual understanding of the problems encountered with the pathology.

In our practice the final diagnosis is practically always assessed on smears. On our series of 100 patients only one case was diagnosed by means of histological series. On the other hand the contribution of the cellblock is essential when the need for immunomarkers is useful or necessary to the diagnosis. Endocrine carcinoma diagnosis is easy on smears because the architecture and the cellular morphology are specific, but it is a further security to confirm the diagnosis by demonstrating a neuroendocrine secretion. Concerning the diagnosis of cystic tumour and papillary tumour of the pancreas (differential diagnosis of endocrine carcinoma) the markers contribution is even more meaningful.

For the conjunctive tumours the contribution of histology and markers is meaningful. Diagnosis of stromal tumour (GIST) cannot be made without CD34S and CD117S markers.

In fact, the ideal would be to combine the qualities of both cytological and histological methods. The

question remains about the use of thin layer cytology or cytology in liquid environment. According to us the advantages of the method on the cellular quality do not compensate the loss of information resulting from the setting in suspension of the specimen and the consecutive cleaning either during filtration or during differential centrifugation. These techniques are part of our activity in routine since several years. If they brought the proof of their interest in gynaecology, it is not however a universal method.

CONCLUSION

The material of EUS-FNA is precious. It is necessary to make sure of its good cellularity and to process it with adequate techniques for an optimal diagnosis.

Extemporaneous examination of smears by the endosonographer is a pragmatic and efficient response. The combination of spreading cytology and paraffin embedding allows afterwards staying in this register of efficiency and simplicity.