



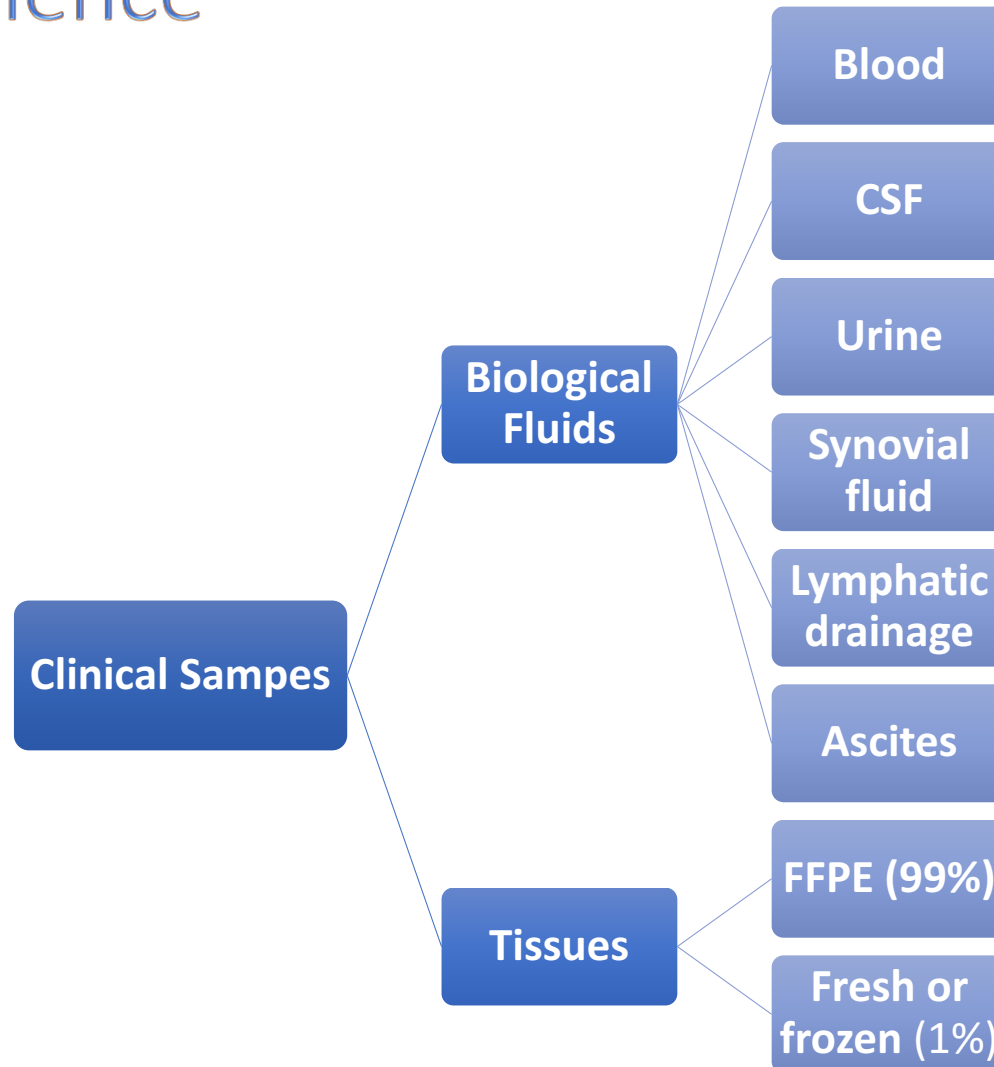
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI TRIESTE

I CAMPIONI TISSUTALI E LORO TRATTAMENTO NEI LABORATORI DI ANATOMIA PATOLOGICA

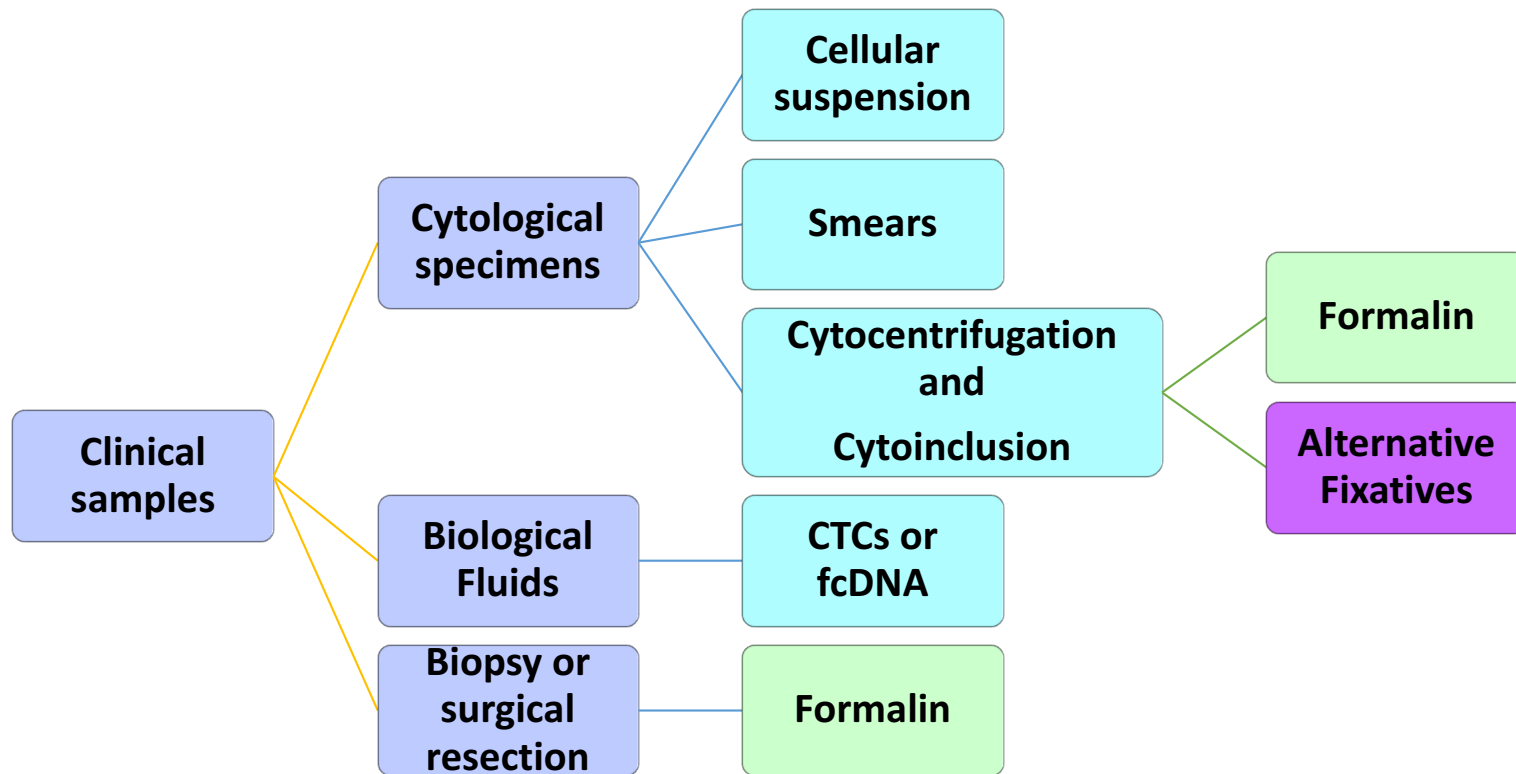
Serena Bonin
DSM-Dip. Scienze Mediche



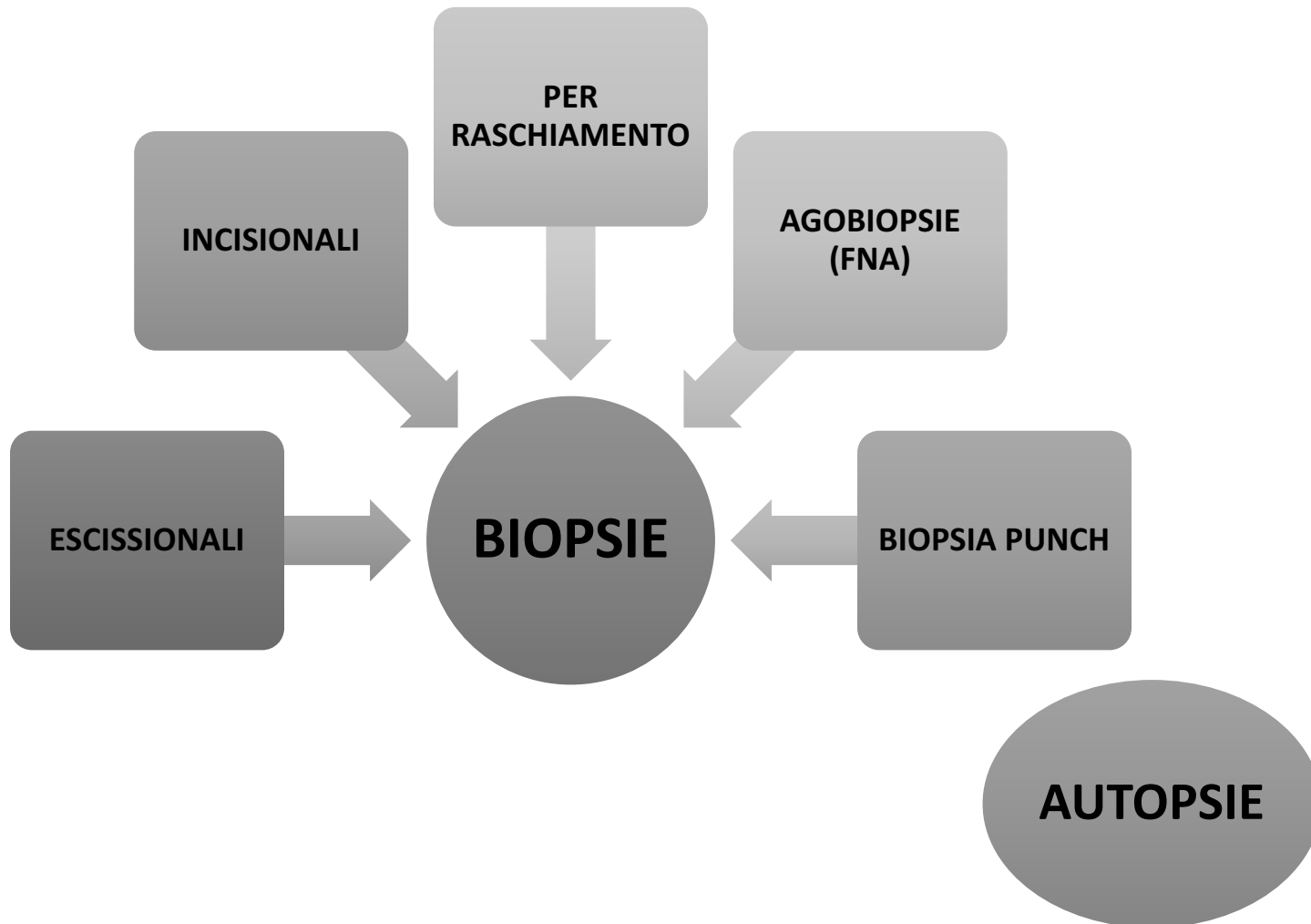
My experience



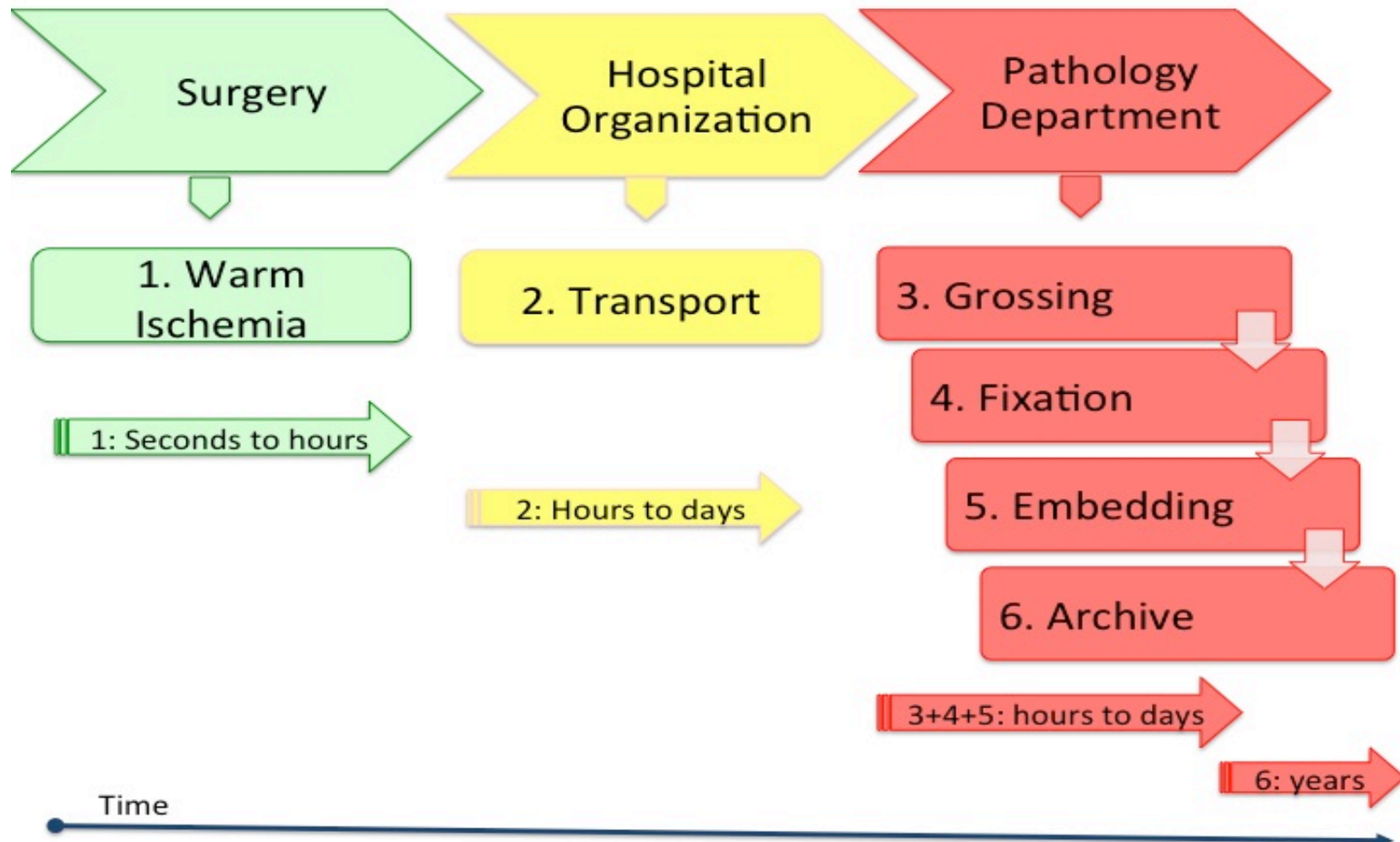
SOURCES OF CLINICAL MATERIAL



TIPI DI CAMPIONE



ALL PREANALYTICAL FACTORS AFFECT RNA INTEGRITY MORE SEVERELY THAN DNA



TissueSAFE Vacuum Unit

Dedicated vacuum unit
installed in “dirty room”
adjacent to surgery suite.

Elimination of formalin in
surgery theatre.

Transport biospecimens in “as
fresh conditions” to the
Pathology lab.



PRELIEVO

- **LAVAGGIO DEI TESSUTI PRELEVATI** (*in tampone neutro in condizioni fisiologiche per togliere il sangue - con saccarosio o destrano per una buona conservazione morfologica per il congelamento*)
- **MODALITA' DI INVIO** (*in fissativo o sotto vuoto*)
- **TEMPI BREVI:** *autolisi (tipo di tessuto) e putrefazione*
- **STRUMENTI** (*coltelli, bisturi, forbici, tavoletta di sughero, ...*)
- **TECNICA DEL PRELIEVO E RISCHI BIOLOGICI**
- **TIPO DI MATERIALE INVIATO** (*pezzo operatorio, biopsia, agobiopsia, prelievo autoptico, materiale citologico*)
- **DESCRIZIONE MACROSCOPICA**
- **DIMENSIONI** (*adeguate ai preparati istologici con spessore adatto alla velocità di fissazione*)
- **LOCALIZZAZIONE ED ORIENTAMENTO** (*anatomia, lesione*)

FISSAZIONE

- **SCOPO:** *fornire un immagine istologica il più fedele possibile alla realtà o meglio costantemente riproducibile (IMMAGINE EQUIVALENTE)*
- **RAPIDITA' DELLA FISSAZIONE:** *per evitare l' autolisi (liberazione intracellulare di enzimi litici) e la putrefazione (batteri saprofiti ed ambientali).*
- **CAPACITA' DI PENETRAZIONE DEL FISSATIVO:** *velocità di penetrazione nei tessuti (dipende dalla temperatura, che aumenta però anche la degradazione)*
- **DURATA DELLA FISSAZIONE:** *dipende dal tipo di fissativo, dal tipo di tessuto, dalle dimensioni del prelievo*
- **VOLUME DEL FISSATIVO:** *1:20 per la formalina*
- **CONDIZIONI DELLA FISSAZIONE:** *immersione dei tessuti, pH 7.3-7.4, pressione osmotica 0.5 osm.*
- **INADEGUATEZZA DELLA FISSAZIONE:** *perdita del campione*

Tipo di Fissativi

Chimici

Coagulanti

Additivi

Calore (fiamma)

Dissecazione a r.t.

Congelamento

*Sublimazione
(dell'acqua sotto vuoto)*

Forno a micro-onde

FISSATIVI CHIMICI

(Agiscono sulle proteine)

AZIONE SULLA IDRATAZIONE DELLE PROTEINE:

- ***FISSATIVI COAGULANTI:*** *il fissativo si sostituisce all' acqua di idratazione delle proteine che denaturano e precipitano (COAGULAZIONE)*

REAZIONE CON I COMPONENTI TISSUTALI:

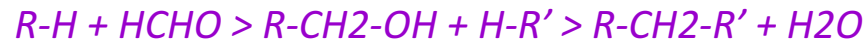
- ***FISSATIVI ADDITIVI:*** *le molecole del fissativo reagiscono chimicamente con i componenti del tessuto, con consumo del fissativo*

FISSATIVI ADDITIVI

FORMALDEIDE: HCOH –gas incolore solubile in acqua. Formalina è la soluzione acquosa di formaldeide al 37%.
Nella fissazione si usa formalina tamponata con tampone fosfato a pH fisiologico.

MECCANISMO D' AZIONE:

-lega tra loro le proteine con ponti metilenici (-CH-) tra gruppi con un H attivo



POTERE DI PENETRAZIONE: 0.8mm/h

USO: -soluzione diluita 10X (detta formalina 10%, ma in realtà 4%)

-La luce trasforma la formaldeide in acido formico (bottiglie scure, aggiunta carbonato diCa)

-La fissazione dura da 12h a 4-5gg

-Per degradazione dell' emoglobina forma un pigmento bruno scuro, che si può eliminare con l' aggiunta di alcool 70%(95pp) ed ammoniaca 5%(5pp)

-Capacità conservative (nei musei con frammenti di marmo (sali di Ca) e dopo gorgogliamento di gas di città, monossido di C > metaemoglobina, per mantenere i colori)

-Mummificazione

RISULTATI:

-fissazione dei grassi

– scarsa coartazione

– scioglie parzialmente glicogeno e acido urico

PARAFORMALDEIDE: polimero della formaldeide

FISSATIVI ADDITIVI

Miscele fissatrici a base di acido picrico:

- **Liquido di Bouin:** composto dalla miscela di 15 parti di acido picrico in soluzione satura acquosa, 5 parti di formaldeide 40% ed 1 parte di acido acetico glaciale
- **Liquido di Duboscq - Brasil:** costituito da 150 ml di alcool etilico 80%, 60 ml di formaldeide 40%, 15 ml di acido acetico glaciale ed 1 g di acido picrico

Entrambi sono fissativi **molto penetranti**; tuttavia, la presenza dell'acido picrico e di quello acetico è di ostacolo ad eventuali indagini retrospettive e di estrazione del DNA e, inoltre, scioglie facilmente la maggior parte delle calcificazioni presenti.

FISSATIVI COAGULANTI

Fissativi alcoolici

- Alcool etilico 95°
- Alcool etilico 95° ed etere etilico anaparti
- Alcool metilico
- Alcool metilico ed acetone anaparti

L'alcool di per sé, per il basso potenziale di ossidazione e per la moderata capacità di penetrazione, non è un buon fissativo per istologia (ma è meglio di niente); determina **eccessiva coartazione** ed **indurimento dei tessuti**, denatura le proteine e coagula grossolanamente il citoplasma; pertanto si preferisce utilizzarlo in associazione con altre componenti onde ottenere un fissativo più efficace ed omogeneo.

Si è soliti ricorrere all'alcool etilico 95° o all'alcool etilico 50° in egual volume al materiale prelevato come prefissaggio in citologia.

MISCELE DO FISSATIVI A BASE DO ALCOOL

- Liquido di Serra: composto da 2 parti di alcool etilico 95% ed 1 parte di formaldeide 40% cui si aggiungono poche gocce di acido acetico glaciale
- Liquido di Carnoy e MetaCarnoy: costituito da 6 parti di alcool etilico abs (metilico) , 3 parti di cloroformio ed 1 parte di acido acetico glaciale
- Liquido di Clarke: composto da 3 parti di alcool etilico abs ed 1 parte di acido acetico glaciale
- Formalina alcoolica di Lillie: costituita da 9 parti di alcool etilico abs ed 1 parte di formaldeide 40%

LAVAGGIO DEL FISSATIVO

***DOPO LA FISSAZIONE I FRAMMENTI DI TESSUTO
DEVONO ESSERE LAVATI PER ALLONTANARE I
RESIDUI DEL FISSATIVO CHE POTREBBE INFLUIRE
SUI SUCCESSIVI PROCESSI***

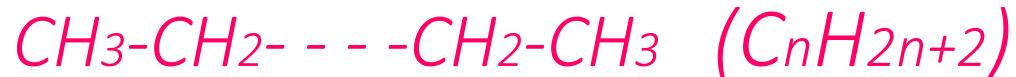
INCLUSIONE

-I TESSUTI FISSATI, PER POTER ESSERE OSSERVATI AL MICROSCOPIO OTTICO, DEVONO ESSERE SEZIONATI IN FETTINE SOTTILI 2-8 μ m

-PER OTTENERE SEZIONI SOTTILI I TESSUTI DEVONO ESSERE SUFFICIENTEMENTE DURI E COMPATTI > INCLUSIONE IN MEZZI SEMISOLIDI

-IL TESSUTO DEVE ESSERE IMBIBITO DELLA SOSTANZA USATA PER L'INCLUSIONE > PARAFFINA

PARAFFINA



-SI OTTIENE DAI RESIDUI DI DISTILLAZIONE DEL PETROLIO

-IL PUNTO DI FUSIONE SI INNALZA CON LA LUNGHEZZA DELLA CATENA

-IN ISTOLOGIA SI USANO DA C₂₂ A C₂₈, DIVIDENDO LE PARAFFINE IN BASSOFONDENTI (45 – 54°C) E ALTOFONDENTI (58 – 60°C)

-OGGI NON SI USANO PIU' LE PARAFFINE NATURALI (SEMPRE MISTURE DI VARIA LUNGHEZZA), MA PARAFFINE SINTETICHE, PURE E OMOGENEE (ES. PARAPLAST)

-I SOLVENTI PER LA PARAFFINA SONO: XILENE, CLOROFORMIO, BENZENE E TOLUENE

PROCESSAZIONE PER INCLUSIONE DEI TESSUTI

1-FISSAZIONE

2-LAVAGGIO

-ALCOOL 70% - 4h I

-ALCOOL 95% - 4h I

-ALCOOL 100%- 4-6h I

-ALCOOL 100%- 4-6h I

3-DISIDRATAZIONE

-XILENE - 1-2h I

-XILENE - 1-2h I

4-DIAFANIZZAZIONE

-PARAFFINA 2-3X - 3-4hX1

5-INCLUSIONE

6-COLATA (BLOCCO DI PARAFFINA CON TESSUTO ORIENTATO)

7-RAFFREDDAMENTO (PARAFFINA OMOGENEA)

SEZIONI ISTOLOGICHE

MICROTOMI:

-MICROTOMO A SLITTA (A LAMA MOBILE O FISSA)

-MICROTOMO ROTATIVO (SEZIONI SERIATE)

-MICROTOMO CONGELATORE

*-CRIOSTATO (MICROTOMO ROTATIVO IN CAMERA
REFRIGERATA)*

LAME DEL MICROTOMO:

-PRESENTANO FACETTE SECONDARIE DI TAGLIO

*-HANNO UNA INCLINAZIONE REGOLABILE RISPETTO ALLA SUPERFICIE DI TAGLIO DI
10 – 15°*

-INFERIORE A 10° LA LAMA STRISCIA SENZA TAGLIARE

-SUPERIORE A 15° LA LAMA FRANTUMA LA PARAFFINA

DEPARAFFINAZIONE DELLE SEZIONI

-XILENE - 5 min SPARAFFINATURA

-XILENE - 5 min

-ALCOOL 100% - 5 min

-ALCOOL 100% - 5 min

-ALCOOL 95% - 5 min IDRATAZIONE

-ALCOOL 70% - 5 min

-ACQUA DISTILLATA

COLORAZIONE

DECALCIFICAZIONE DEI TESSUTI

I tessuti devono prima essere fissati per evitarne la macerazione.

La decalcificazione viene effettuata spostando, mediante acidi forti, quelli più deboli (ac fosforico, ac carbonico) dai loro sali (fosfati e carbonati di Ca), per ottenere sali di Ca solubili.



La decalcificazione si può eseguire con:

<i>-ac. nitrico</i>	<i>5-7.5%</i>
<i>-ac. tricloroacetico</i>	<i>5%</i>
<i>-ac. formico</i>	<i>concentrato</i>

Il liquido decalcificante va cambiato 2X nelle 24h ed processo dura più giorni.

Per testare se il tessuto è decalcificato si usa un ago.

COLORAZIONI ISTOLOGICHE

COLORAZIONI ISTOLOGICHE

***-NEI PREPARATI ISTOLOGICI NATURALI IL CONTRASTO
FRA LE VARIE STRUTTURE E' SCARSO O ASSENTE***

***-IL CONTRASTO SI OTTIENE CON I SPECIFICI COLORANTI
USATI IN ISTOLOGIA CHE HANNO PER LE VARIE
STRUTTURE TISSUTALI DIVERSA AFFINITA'***

***-I COLORANTI USATI IN ISTOLOGIA SONO ANIMALI,
VAGETALI E DI SINTESI (aniline)***

COLORANTI : sono usualmente composti organici aromatici contenenti un gruppo **CROMOFORO** (Luce visibile 400-800 nm) e uno **AUXOCROMO**.

Nel cromoforo si trovano sempre gruppi funzionali dai quali dipende il colore.

GRUPPI CROMOFORI: CARBOSSILE (C=O), AZO (-N=N-), NITROSO (-N=O), NITRO (-NO₂), ETILENE (C=C).....

IL COLORE E' PRESENTE MA DI BASSA INTENSITA' E CON LA PRESENZA DI GRUPPI AUXOCROMI IL COLORE DIVIENE INTENSO.

L'auxocromo è un gruppo chimico ionizzabile, unito covalentemente al cromoforo

L'auxocromo è responsabile:

- della solubilità in acqua del colorante
- della sua ionizzabilità
- della capacità di contrarre legami stabili (spesso mediante legami di tipo salino) con le proteine o con altri componenti dei tessuti

A seconda della carica assunta in soluzione, l'auxocromo può essere

- acido (quando ionizza come anione)
- basico (quando ionizza come catione)

Questa caratteristica genera la fondamentale **distinzione dei coloranti** istologici in acidi e basici

Tipi di auxocromo

- Gli **auxocromi acidi** sono i gruppi:
 - solfonico (-SO₃H il più frequente)
 - carbossilico (-COOH)
 - idrossilico (-OH)
- Gli **auxocromi basici** sono:
 - il gruppo aminico (-NH₂) ed i suoi derivati – i metalli (nelle cosiddette lacche)
- I coloranti vengono in genere posti in commercio sotto forma di sali:
 - **Acidi:** come *sali di sodio*, talvolta di *potassio*, di *calcio* o di *ammonio*
 - **Basici:** come *cloruri*, talvolta come *acetati* o *solfati*

COLORANTI 2

SI POSSONO DIVIDERE I COLORANTI IN BASE ALLA CARICA ELETTRICA IN:

BASICI -CATIONI CON CARICA POSITIVA

ACIDI -ANIONI CON CARICA NEGATIVA

NEUTRI -SIA CARICHE POSITIVE CHE NEGATIVE

ANFOTERI-LA CARICA DIPENDE DAL pH

INDIFFERENTI -SENZA CARICA

COLORAZIONE INDIRECTA

*-LA COLORAZIONE E' POSSIBILE SOLO DOPO UN PRETRATTAMENTO CON UNA SOSTANZA DETTA **MORDENTE** CHE LIBERA I GRUPPI REATTIVI CHE SI LEGANO AL COLORANTE*

*-QUESTO PROCESSO SI DEFINISCE **MORDENZATURA***

*-SE COLORANTE E MORDENTE VENGONO USATI CONTEMPORANEAMENTE SI HA UNA **LACCA***

-I MORDENTI SONO SOSTANZE OSSIDANTI QUALI ACIDI E SALI METALLICI (AC CROMICO, SUBLIMATO CORROSIVO,...), AC. PICRICO, FENOLO, TETROSSIDO D'OSMIO E L'ALLUME (AI $K(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$ – SALE DOPPIO IDRATO)

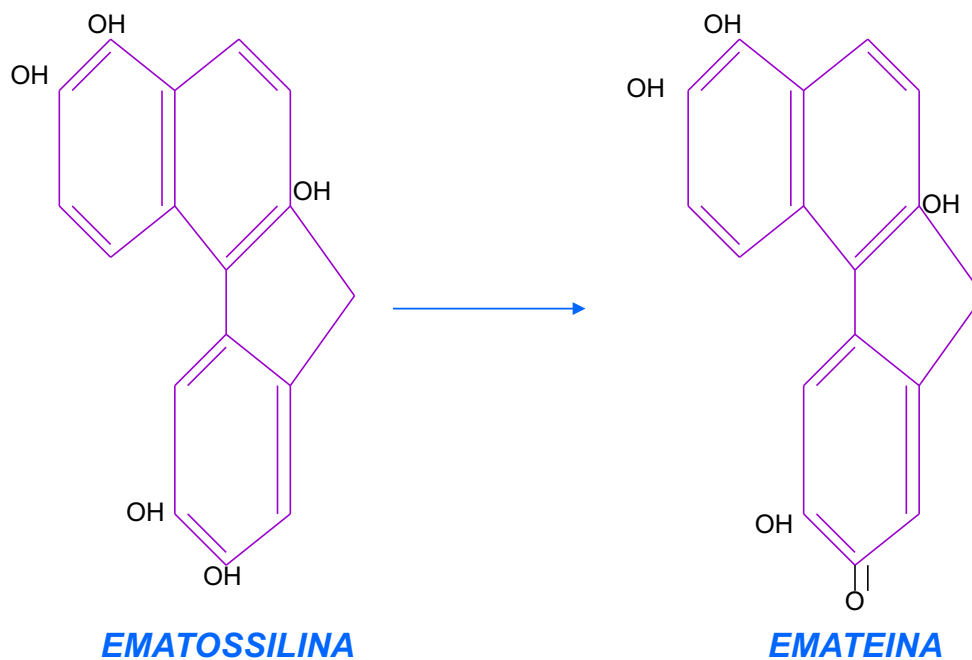
DIFFERENZIAMENTO

*SERVE PER LAVARE IL COLORANTE IN ECCESSO, MA
SOPRATTUTTO PER FISSARE LA COLORAZIONE SPECIFICA*

COLORAZIONE EMATOSSILINA EOSINA 1

EMATOSSILINA: colorante vegetale in cristalli giallo-bruni, solubile in acqua (alcool e glicerina).

-Il vero colorante non è l'ematossilina, ma l'EMATEINA che è il suo prodotto di ossidazione.



COLORAZIONE EMATOSSILINA EOSINA 2

- *-Per ottenere l'emateina si lascia maturare all'aria o vengono aggiunte sostanze ossidanti (permanganato di K).*
- *-Viene usata assieme all'allume (mordente, a formare una lacca) l'EMALLUME.*
- *-A seconda dell'ossidante e mordente usati ci sono le ematossiline prendono vari nomi (Carazzi, Mayer, Harry, ferrica,...).*
- *-E' un colorante basico che agisce meglio in ambiente acido e reagisce con i gruppi fosforici degli acidi nucleici, colorando i nuclei in violetto scuro.*
- *-La differenziazione avviene in acqua corrente che fa virare il colore dal violetto all'azzurro.*

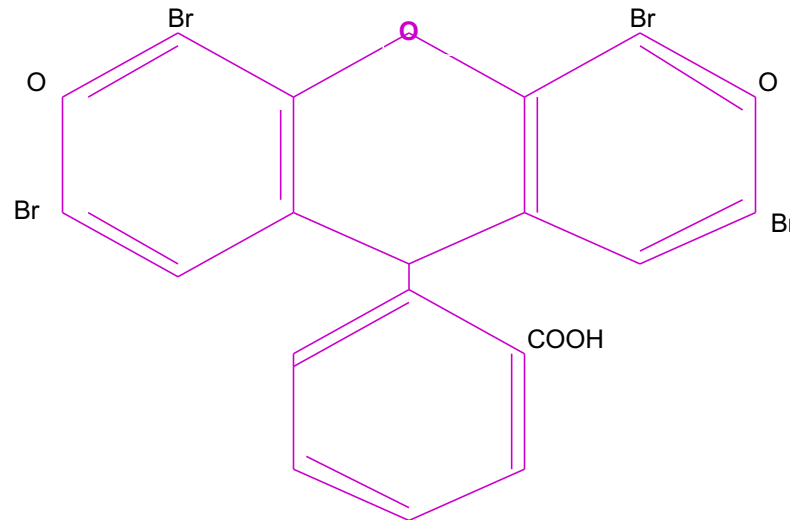
COLORAZIONE EMATOSSILINA EOSINA 3

EOSINA: colorante artificiale acido (varie forme di cui la più comune è l'eosina gialla).

-E' solubile in acqua, si usa in soluzione 1%.

-Colora i citoplasmi, le fibre e la sostanza intercellulare in rosa più o meno intenso.

-La differenziazione si fa con alcool 95%.



COLORAZIONE EMATOSSILINA EOSINA 4

- *Dopo aver idratato le sezioni:*
- *-EMATOSSILINA 10 min*
- *-DIFF. ACQUA CORRENTE 30 min*
- *-EOSINA 1 min*
- *-DIFF. ALCOOL 95% rapida*

MONTAGGIO

COLORAZIONE

-ALCOOL 70 °

-ALCOOL 95°

-ALCOOL 100°

-ALCOOL 100°

DISIDRATAZIONE

-XILENE

DIAFANIZZAZIONE

-XILENE

MONTAGGIO

Balsamo del Canada o Eukitt + vetrino coprioggetto

SEZIONI SU TESSUTI CONGELATI 1

Si può eseguire un esame istologico su sezioni di tessuto congelato.

Le sezioni si possono tagliare da:

a) Tessuti fissati in formalina: il tessuto prima di essere congelato deve venir lavato estensivamente con acqua.

b) Tessuti freschi: -sul tessuto lavato dal sangue si esegue un prelievo dello spessore di 2-3 mm

-viene posto su un supporto metallico

-congelato per qualche secondo sui vapori di azoto liquido

-immerso in azoto liquido per un minuto

SEZIONI SU TESSUTI CONGELATI 2

Il taglio viene eseguito nel criostato:

-Regolazione della temperatura (troppo freddo il tessuto risulta friabile, temperatura troppo alta il tessuto è pastoso)

-Nella zona di taglio c'è una lastrina di teflon che raccoglie automaticamente la sezione.

-Si trasferisce la sezione dalla lastrina avvicinando un vetrino freddo, l'adesione e la distensione sul vetrino avviene per il calore trasferito dal polpastrello del dito

-Si essicca rapidamente agitando il vetrino nell'aria

-Si può eseguire una rapida fissazione di 1 min in acetone o alcool

COLORAZIONE RAPIDA

EMATOSSILINA EOSINA

- Ematossilina di Harry concentrata per 1 min.*
- Acido cloridrico 0.5% - 20 immersioni*
- Ammoniaca 2% in alcool – 20 immersioni*
- Eosina 1 min.*
- Differenziazione in alcool 95% - rapida*

DISIDRATAZIONE

DIAFANIZZAZIONE

MONTAGGIO