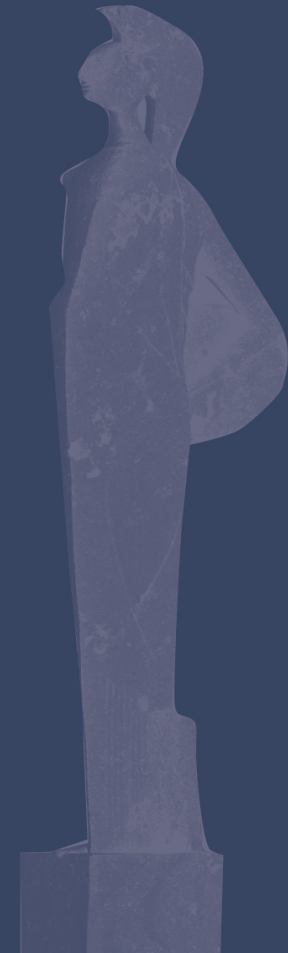




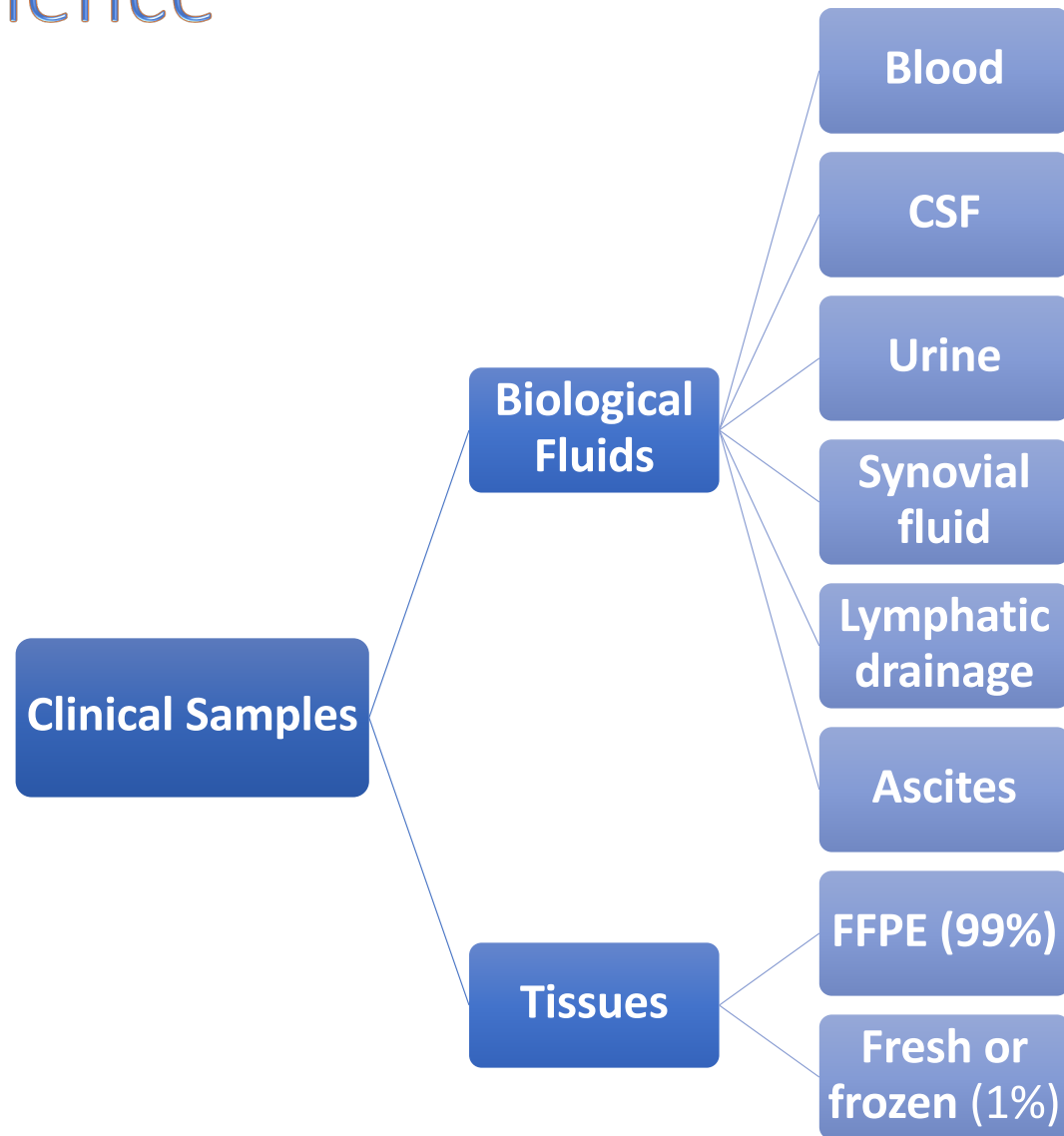
UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI DI TRIESTE

# **I CAMPIONI TISSUTALI E LORO TRATTAMENTO NEI LABORATORI DI ANATOMIA PATOLOGICA**

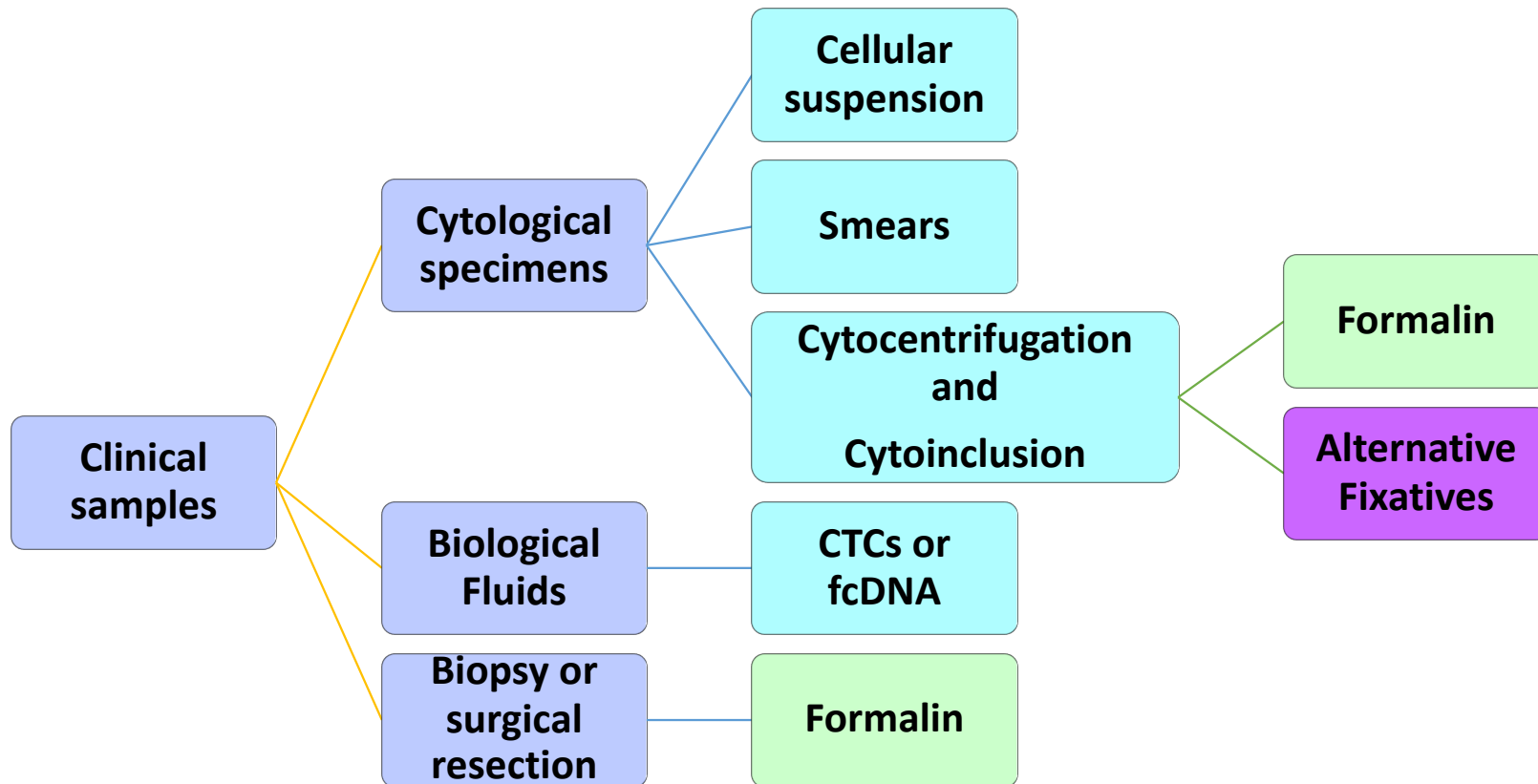
Serena Bonin  
DSM-Dip. Scienze Mediche

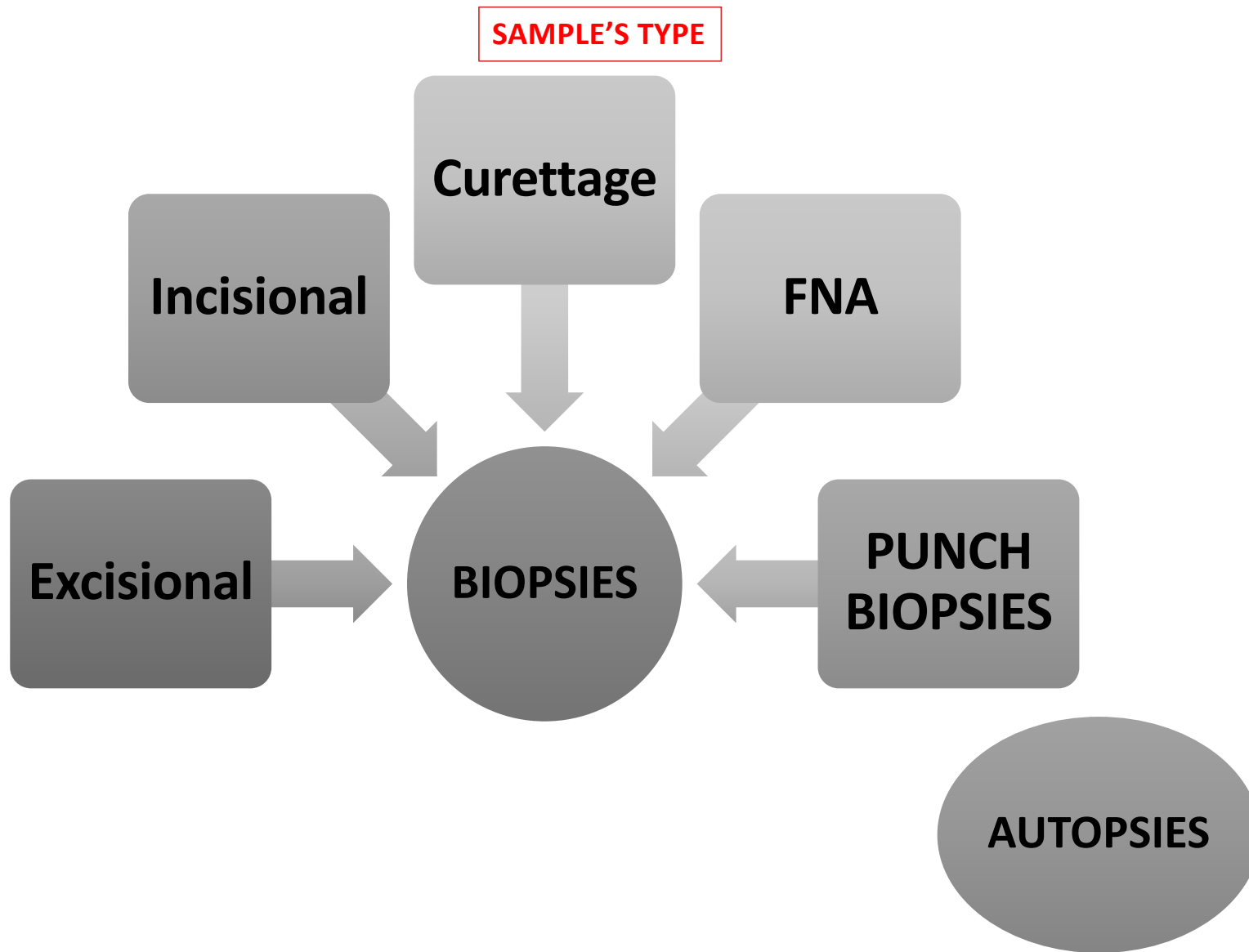


# My experience

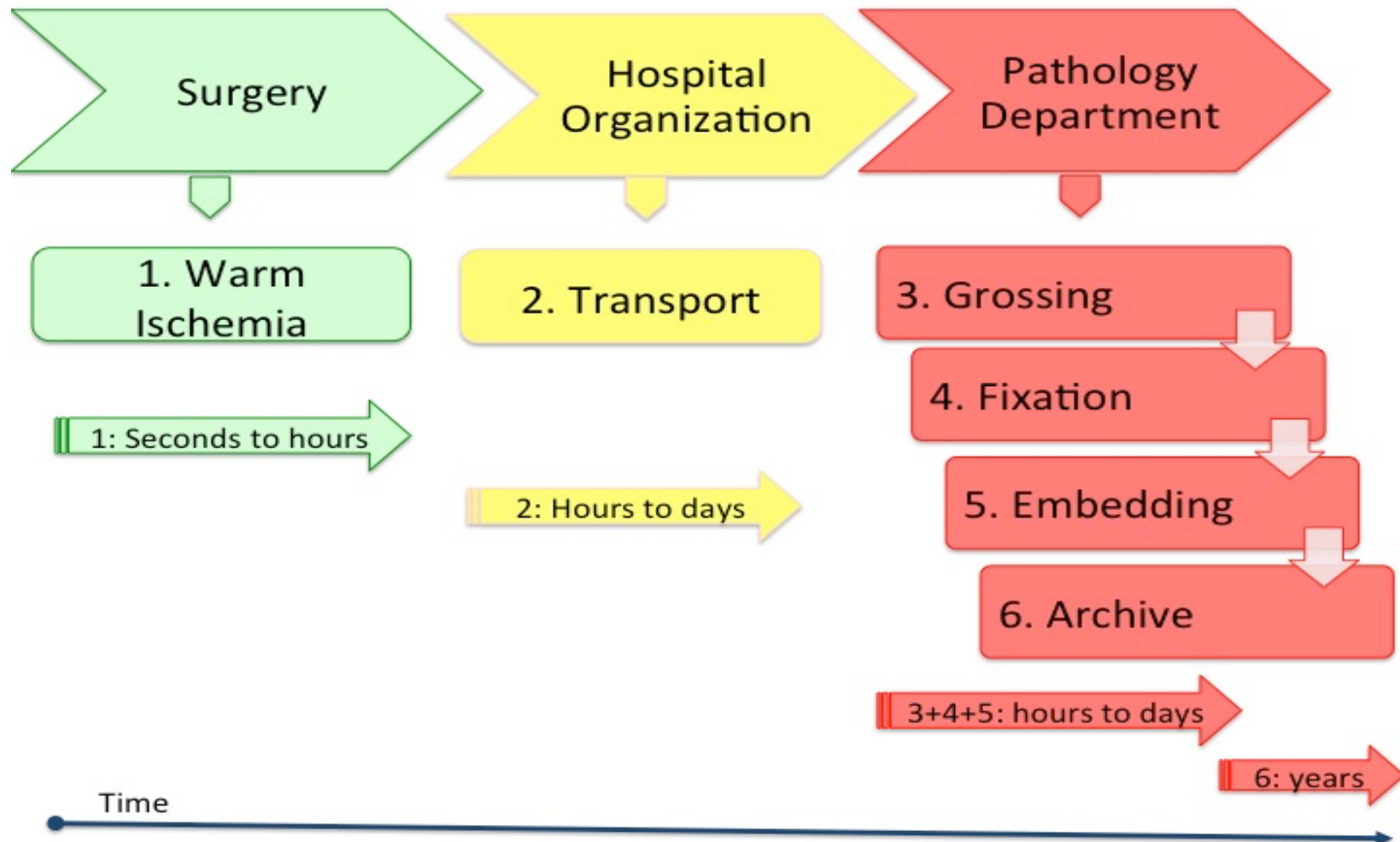


## ***SOURCES OF CLINICAL MATERIAL***





## ***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.



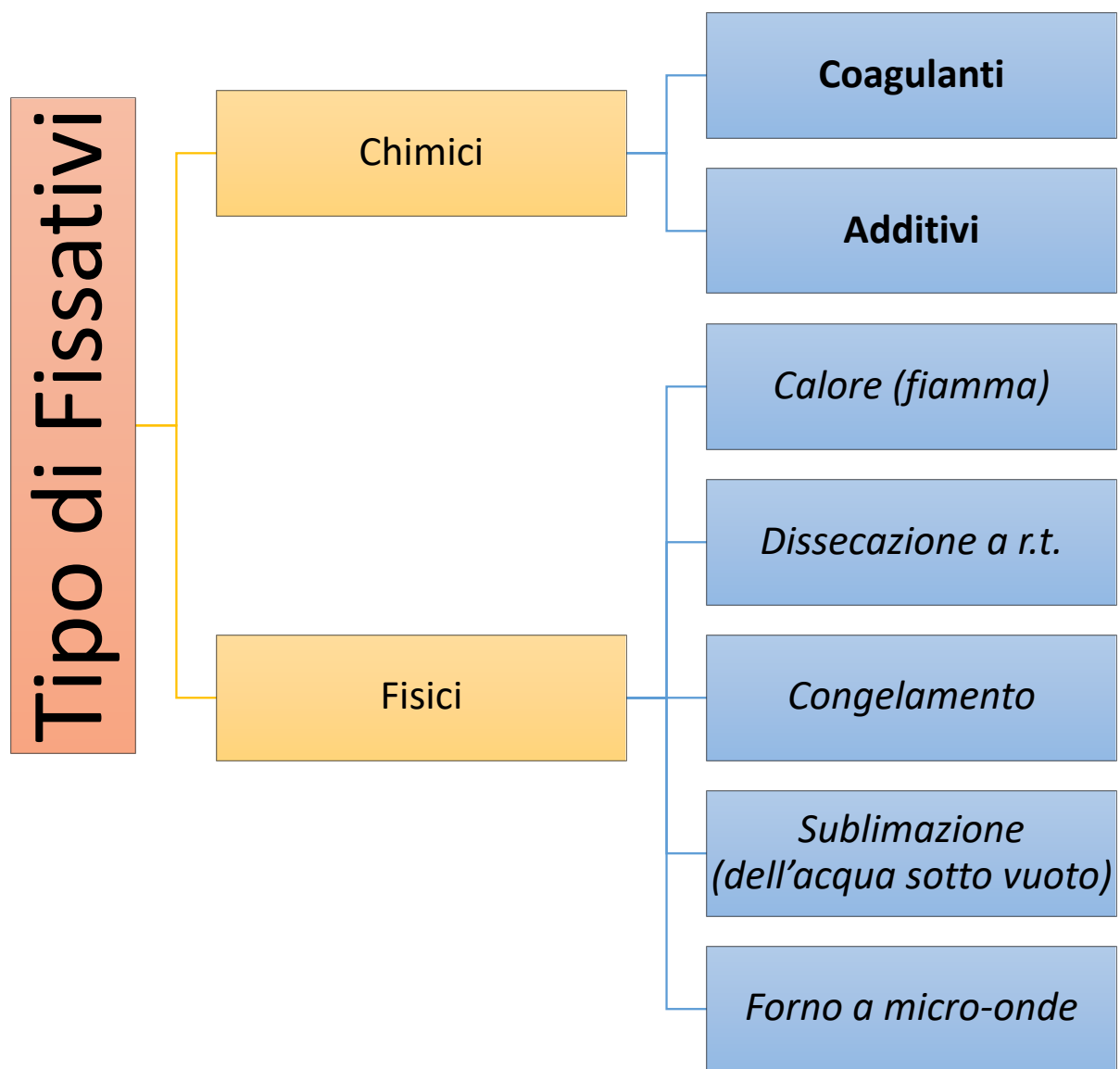
# PRELIEVO

- **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*





# ***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:**

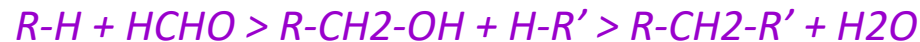
- ***FISSATIVI ADDITIVI:*** *le molecole del fissativo reagiscono chimicamente con i componenti del tessuto, con consumo del fissativo*

## FISSATIVI ADDITIVI

**FORMALDEIDE:**  $\text{HCOH}$  –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 ( $-\text{CH}-$ ) 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 di Ca)

-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 DI 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*

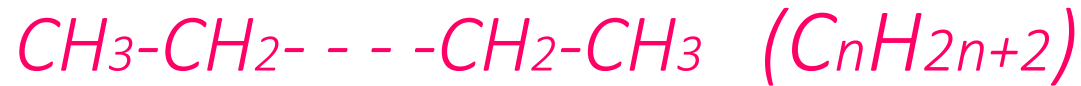
*-I TESSUTI FISSATI, PER POTER ESSERE OSSERVATI AL MICROSCOPIO OTTICO, DEVONO ESSERE SEZIONATI IN FETTINE SOTTILI 2-8  $\mu\text{m}$*

*-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 C<sub>22</sub> A C<sub>28</sub>, 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*



**Microtomo a slitta**



**Microtomo rotativo**

## **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 ( $-NO_2$ ), 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 ( $-\text{SO}_3\text{H}$  il più frequente)
  - carbossilico ( $-\text{COOH}$ )
  - idrossilico ( $-\text{OH}$ )
- Gli **auxocromi basici** sono:
  - il gruppo aminico ( $-\text{NH}_2$ ) 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 ( $KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$  – SALE DOPPIO IDRATO)

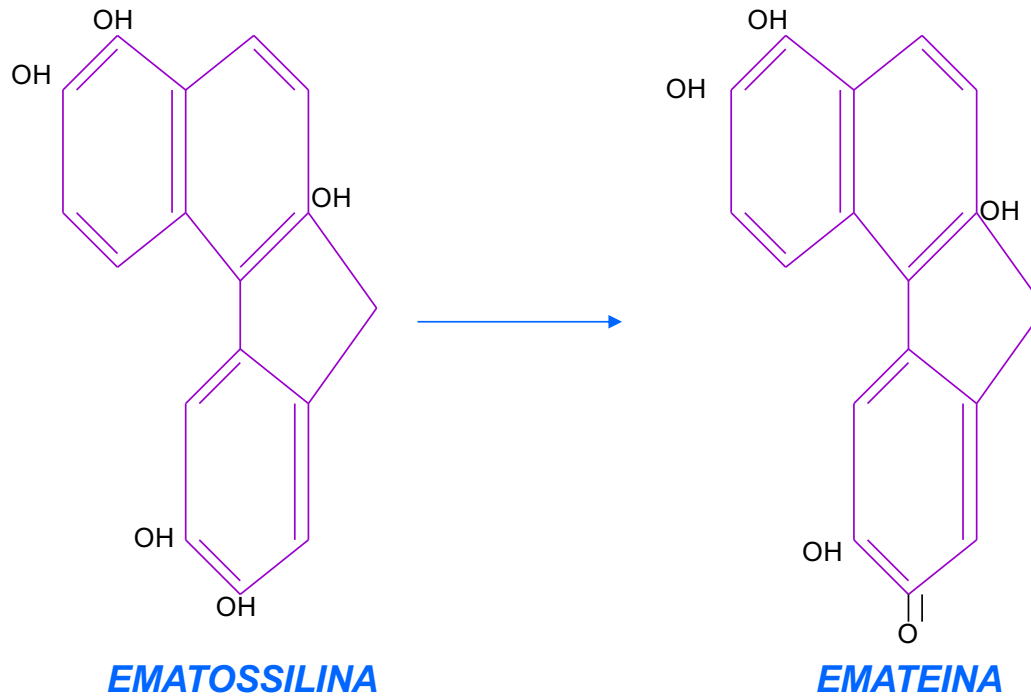
# *DIFFERENZIAZIONE*

*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.*

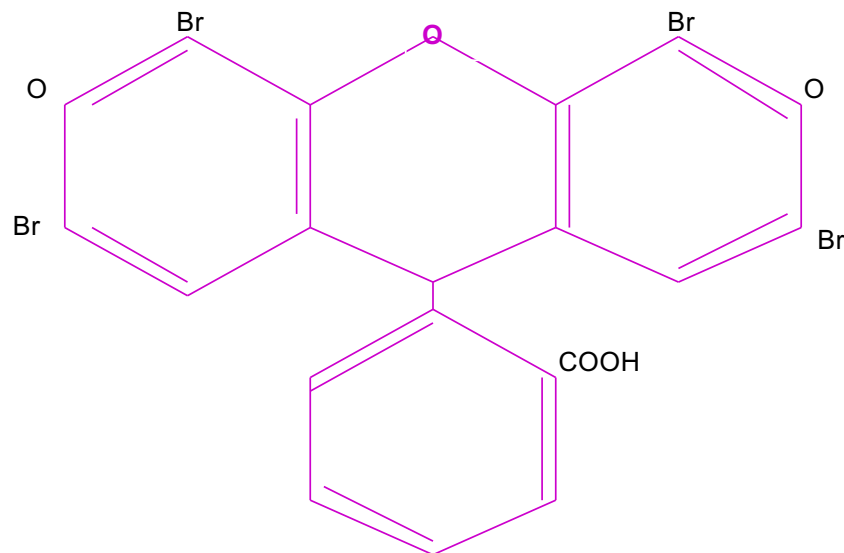
## COLORAZIONE EMATOSSILINA EOSINA 3

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

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

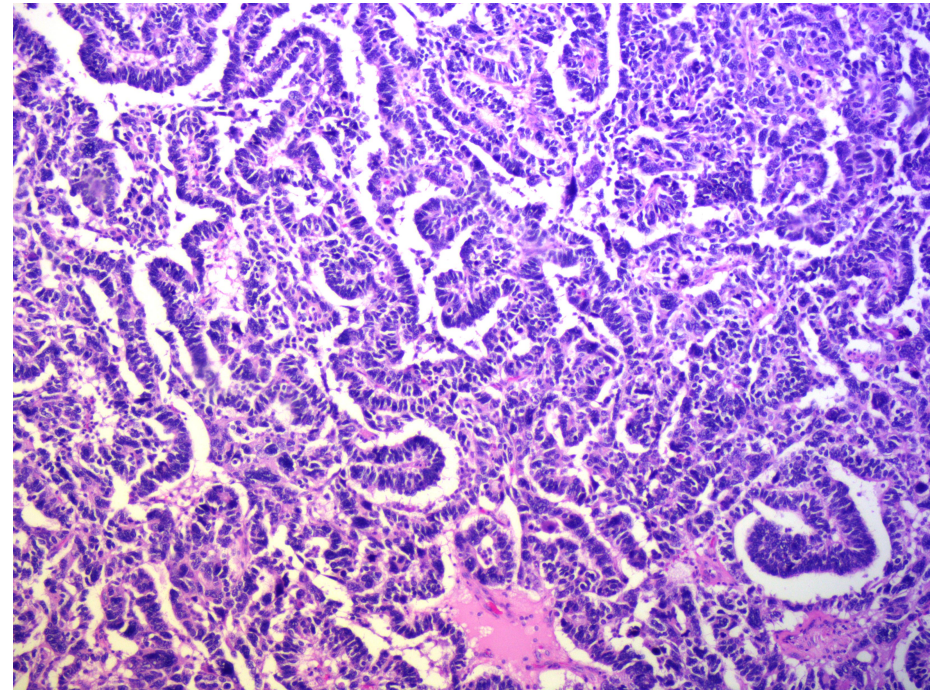
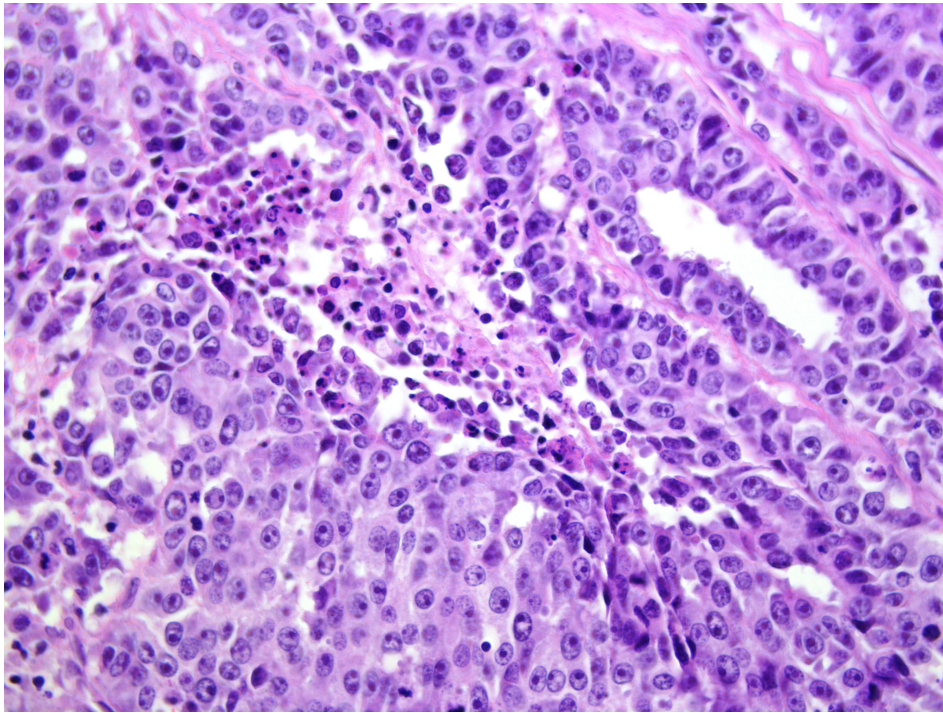
-Colora i citoplasmi, le fibre e la sostanza intercellulare in rosa più o meno intenso.

-La differenziazione si fa con alcool 95%.





## *COLORAZIONE EMATOSSILINA*



## *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*

*-XILENE*

## ***DIAFANIZZAZIONE***

## ***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*



**CRIOSTATO:**  
**Microtomo rotativo**  
**Camera di Raffreddamento**

# ***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***