



Associazione Italiana Tecnici Istologia Citologia



XXX

CONGRESSO NAZIONALE

in Tecniche di Laboratorio Biomedico

29 NOVEMBRE - 1 DICEMBRE 2023 RIMINI, HOTEL AMBASCIATORI

CON IL PATROCINIO DI



Anna Maria Puggia

Anatomia Patologica Castelfranco Veneto (TV)



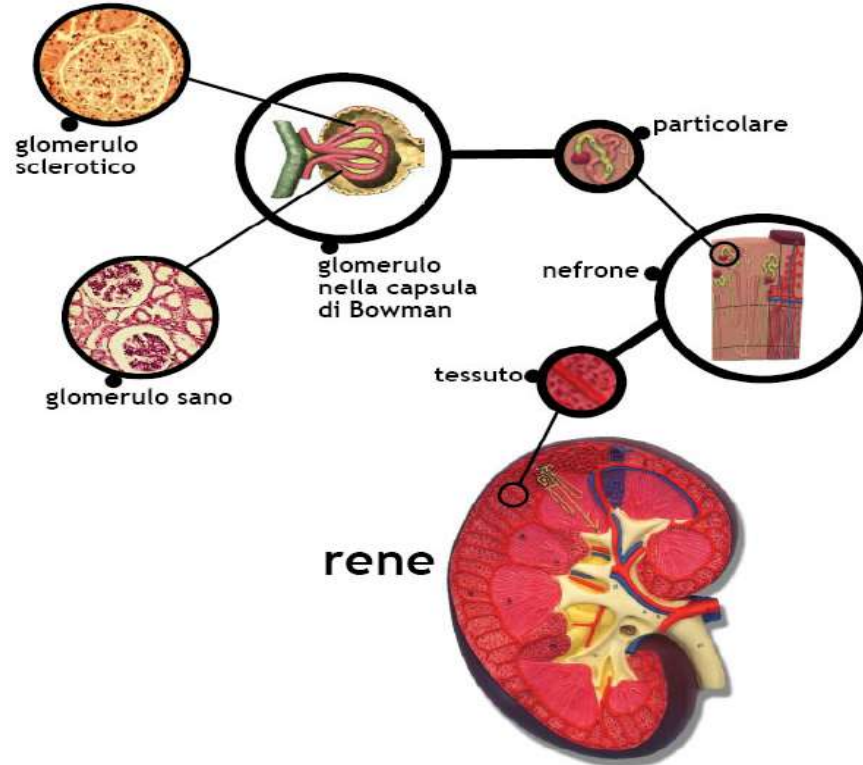
L'emblematico caso della biopsia renale tra microscopia ottica, immunofluorescenza e microscopia elettronica

SCOPO

Lo scopo di questo argomento è di valutare le criticità correlate all'allestimento di preparati istologici di biopsia renale non oncologica lungo tutto il percorso del campione. Il focus sarà rivolto, in modo particolare, sull'allestimento dei preparati per microscopia ottica, immunofluorescenza e microscopia elettronica. L'analisi delle fasi di allestimento comprende prelievo, valutazione dell'adeguatezza, fissazione e tipi di fissativo, congelamento e reazioni di immunofluorescenza, immunoistochimica e istochimica.

Anatomia del rene

Capsula
Unità funzionale- Nefrone
Corpuscolo renale (glomerulo-tubuli)
Corticale
Midollare



Biopsia renale: quando?

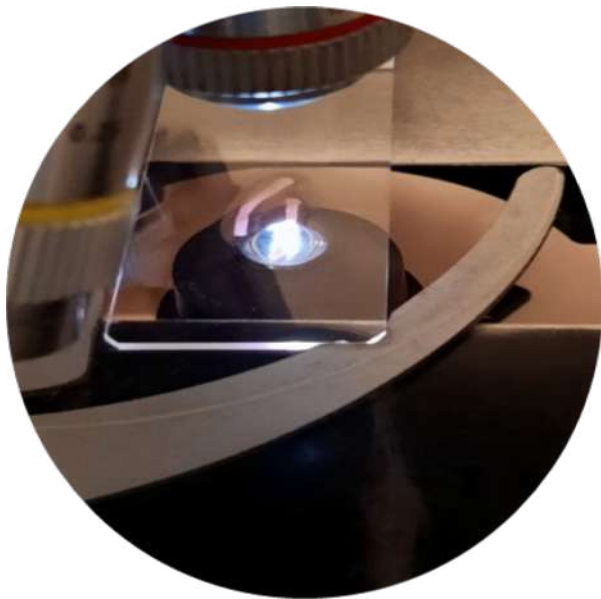
La biopsia del rene viene effettuata principalmente per indagare:

- Anomalie Urinarie Isolate (microematuria e/o proteinuria >1 g)
- Sindrome nefrosica
- Sindrome nefritica
- Insufficienza renale acuta e a rapida progressione
- Nefropatie associate a malattie sistemiche
- Stadiazione glomerulonefriti secondarie
- Rene trapiantato: diagnosi differenziale tra rigetto, tossicità da ciclosporina, recidiva della malattia renale di base (nei centri di riferimento)
- Viene inoltre utilizzata come metodica per la diagnosi primaria di masse di natura neoplastica

Requisiti per la biopsia renale: diagnostica nefropatologica ed esecuzione clinica 12/11/2015 commissione SIN-SIAPEC

In radiologia: il prelievo

Selezione del materiale



Selezione e suddivisione del materiale



Fisiologica

- Congelamento per IF
- Valutazione adeguatezza
- Fibrinogeno ,IgA, IgG, IgM, C3, C1q, K, L
- 20% del campione



Fissativo per MO

- Fissazione, processazione
- EE, 10 Pas
- Valutazione al MO
- 70% del campione



Glutaraldeide per ME

- Processazione in resina
- Sezioni ultrafini
- Valutazione al ME
- 10% del campione

In applicazione della 81/08.....

II – PRINCIPALI RISCHI

→ I lavoratori che svolgono attività in cui si impiega azoto liquido sono esposti a due possibili tipologie di rischi: ustione da freddo per contatto oppure per asfissia a causa di una fuoriuscita di azoto.

Il contatto con il gas conservato in forma liquida a temperature molto basse (-190 °C circa) provoca ustioni da freddo simili alle normali ustioni. Nel caso in cui il contatto sia prolungato, le conseguenze possono essere lesioni molto gravi da congelamento dei tessuti anche a livello profondo.

Le atmosfere sottossigenate possono formarsi in caso di fuoriuscita accidentale di azoto liquido (si liberano 700 litri di azoto gassoso per ogni litro di azoto liquido). L'aumento di azoto gassoso in ambiente, riduce la percentuale di ossigeno presente esponendo l'uomo al rischio di asfissia.



III – RIFERIMENTI NORMATIVI

L'allegato IV del D.lgs 81/08 indica le misure di sicurezza da adottare nei luoghi di lavoro in presenza di agenti nocivi. Le linee guida della Assogastecnici (gruppo gas medicinali) della Federchimica e quelle approvate dal Centro Nazionale Trapianti, descrivono i requisiti strutturali e impiantistici che un locale deve possedere per essere utilizzato come sala criobiologica.



DISPOSITIVI DI PROTEZIONE INDIVIDUALE (DPI)

- guanti resistenti al freddo (marcatura CE EN 511)
- calzature idonee resistenti al freddo (non aperte)
- visiera o occhiali (marcatura CE EN 166)
- grembiule protettivo per criogenia

V – Locali con presenza di quantitativi limitati di azoto liquido

Nella valutazione dei rischi degli ambienti con atmosfere sottossigenate, si è ritenuto di considerare irrilevante quello determinato dalla presenza di recipienti con capacità inferiore a 5 litri. Questi quantitativi possono essere detenuti e utilizzati in locali che abbiano i requisiti di ambiente di lavoro con permanenza continuativa di persone.

Quantitativi superiori a 5 litri e inferiori a 100 litri possono essere detenuti in locali, all'interno dei quali sia svolta unicamente attività di crioconservazione e gestione dell'azoto liquido, aventi le seguenti caratteristiche:

- superficie sufficiente per lo svolgimento dell'attività in sicurezza;
- ventilazione meccanica che garantisca un minimo di 6 ricambi/ora in continuo;
- presenza di due ossimetri collegati ad un allarme acustico/visivo con visualizzazione della concentrazione di ossigeno e ripetizione dell'allarme anche all'esterno del locale;
- porta di accesso con apertura a spinta dall'interno del locale, dotata di superficie vetrata che consenta la visione interna;
- pareti facilmente pulibili e pavimentazione resistente alle basse temperature (non materiali plastici);
- affissione di segnaletica che richiami i rischi relativi all'utilizzo dell'azoto liquido;
- indicazione del divieto di accesso al personale non autorizzato.

VI – Criteri gestionali

Dal punto di vista gestionale, per entrambe le tipologie di deposito (criobanche e depositi con recipienti aventi capacità totale inferiore ai 100 litri), dovranno essere adottate le seguenti regole:

- l'ingresso al locale deve essere consentito solamente al personale formato sui rischi specifici connessi all'utilizzo dell'azoto liquido e al rischio di atmosfere sottossigenate;
- il personale autorizzato potrà accedere solamente dopo avere informato un secondo operatore che dovrà rimanere nelle immediate vicinanze;
- prevedere un sistema di controllo degli accessi che impedisca l'ingresso ai non autorizzati, il sistema dovrà prevedere che la porta rimanga costantemente chiusa, che sia apribile solamente dal personale addetto e che rimanga traccia degli accessi avvenuti;
- devono essere predisposte delle procedure per la gestione dell'azoto liquido sia nel corso della normale attività sia in caso di emergenza e per l'accesso ai locali di crioconservazione
- deve essere garantita e documentata la formazione continua del personale addetto
- tutti gli accessi di personale estraneo (esempio il personale di pulizia) dovranno avvenire con la supervisione del personale formato;
- non è consentito il deposito di recipienti di azoto liquido, anche vuoti, in locali sprovvisti dei requisiti sopra elencati.

Taglio al criostato



L'utilizzo di strumenti per il congelamento automatizzati permette il posizionamento corretto del frammento in un unico livello e riduce i rischi legati all'utilizzo dell'azoto liquido

Congelamento rapido a temperatura e tempo costante e riproducibile

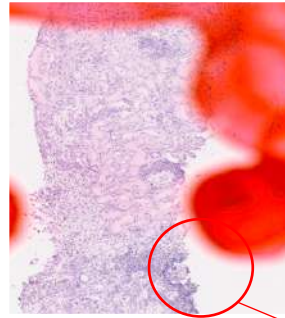


Creazione di un blocchetto omogeneo pronto per il taglio al criostato con minima perdita di materiale nello sgrossamento

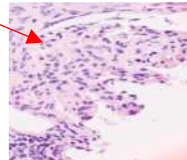
Allestimento sezioni al criostato



Lo scopo è ottenere sezioni per verificare la presenza di glomeruli da avviare alle reazioni di IF



Se il congelamento è avvenuto correttamente le problematiche che possono verificarsi sono limitate alle caratteristiche del prelievo (presenza o meno di glomeruli).



Sezione dello spessore di 3-4 micron colorata con ematossilina/eosina rapida prima di procedere al taglio per IF

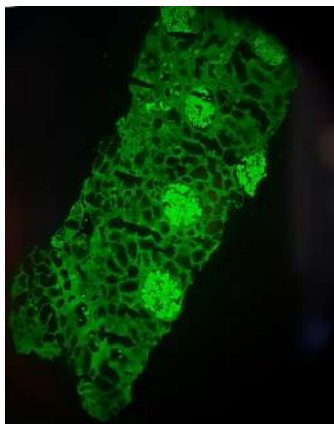
Immunofluorescenza (IF)

La tecnica di immunofluorescenza diretta o indiretta (IF) è la metodica preferibile per la valutazione delle nefropatie. Viene eseguita su materiale fresco criopreservato; in alternativa può essere eseguita la tecnica di immunoperossidasi (IHC) su materiale fissato e incluso in paraffina.

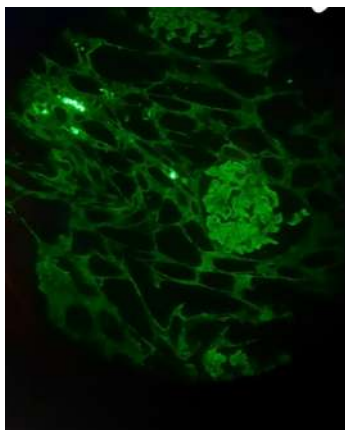
Le colorazioni di IF garantiscono miglior definizione dei depositi immuni e permettono la valutazione quantitativa in base all'intensità del segnale con scarso background; le metodiche di IHC garantiscono sezioni permanenti con maggior dettaglio morfologico ma con elevato background e non sempre evidenziano le frazioni del complemento.

La colorazione in IF è possibile anche da materiale fissato e incluso in paraffina tuttavia i risultati non sono completamente sovrapponibili per qualità a quelli ottenuti da materiale fresco. (presenza di cross-reazioni dovute alla precipitazione proteica data dai legami covalenti che si formano durante la fissazione).

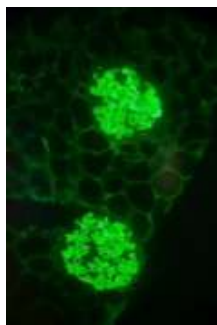
In considerazione del decadimento della fluorescenza sarebbe inoltre auspicabile l'acquisizione fotografica dei reperti con archiviazione digitale delle immagini o in alternativa la conservazione dei vetrini positivi a -80°C ,



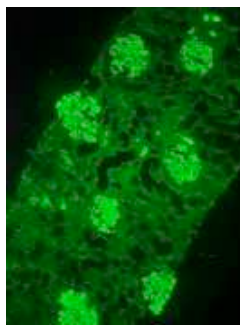
IgG



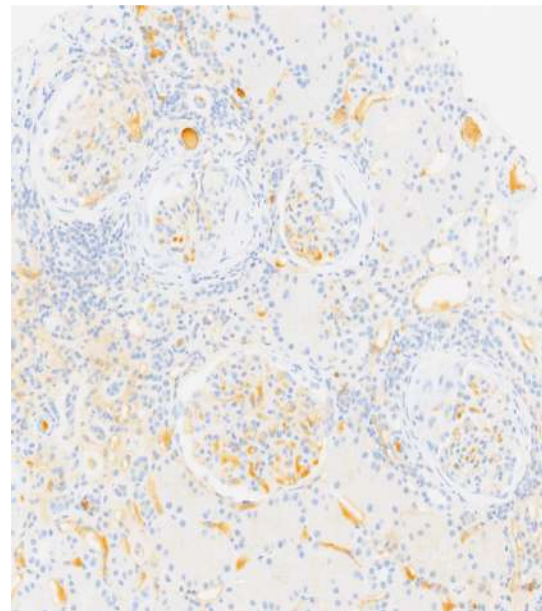
IgA



C1q



Kappa



Fissazione

La fissazione deve essere effettuata nel più breve tempo possibile: lo scopo è di immobilizzare tutti i componenti molecolari e macromolecolari dell'architettura cellulare provocando l'arresto istantaneo di tutte le attività chimico fisiche.

Si possono utilizzare

fissativi acidi quali Liquido di Serra, Bouin e Dubosq-Brazil

vantaggi: migliore dettaglio morfologico e maggior contrasto nelle colorazioni speciali

svantaggio: controllo dei tempi di fissazione, non riutilizzabili per ME e IF

formalina al 4% tampone fosfato pH 7,2;

vantaggi: riutilizzo per ME e IF;

svantaggi: minor definizione morfologica anche per la coartazione del tessuto ; minor contrasto nelle colorazioni speciali

Glutaraldeide al 2-4% in tampone fosfato o cacodilato

Vantaggi: buon dettaglio morfologico per la metodica di ME

Svantaggi: penetra più lentamente della formalina e non fissa i lipidi

Fissativi: B5 versus Liquido di Serra

B5: Miscela fissativa contenente metalli pesanti (dicloruro di mercurio) in formalina tamponata. La velocità di penetrazione nei tessuti è relativamente veloce (1 mm/ora circa).

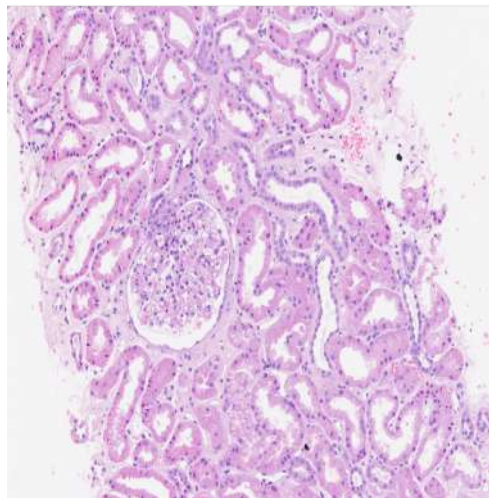
Caratteristica principale: mantiene in maniera ottimale i dettagli morfologici cellulari, soprattutto del nucleo.

Problematiche: determina la formazione di precipitati di mercurio nei campioni, per la rimozione è necessario effettuare passaggi delle sezioni in soluzioni a base di iodio e successivamente sodio tiosolfato, prima di procedere alla colorazione.

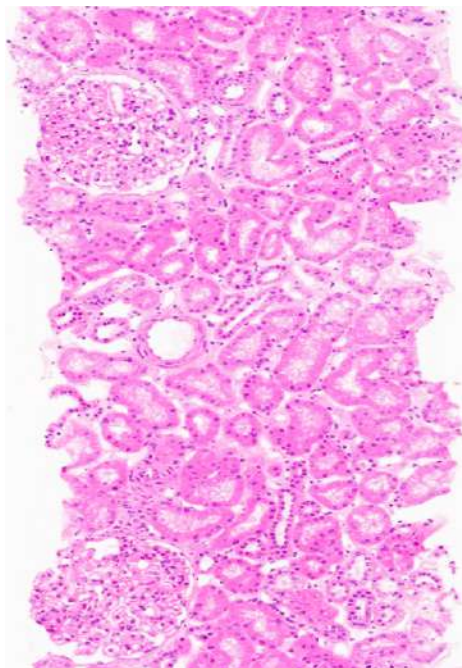
Liquido di Serra: Miscela fissativa contenente Alcool 70%, Formalina al 40% e acido acetico. La velocità di penetrazione nei tessuti è relativamente veloce (1 mm/ora circa).

Caratteristica principale: migliore dettaglio morfologico e buon contrasto nelle colorazioni speciali.

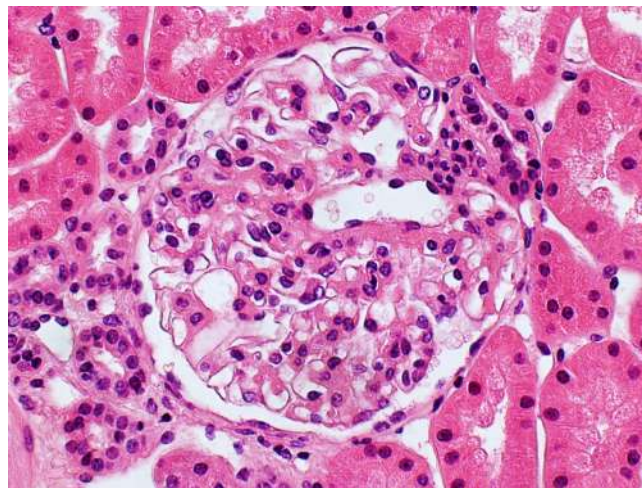
B5



SERRA



BOUIN



Colorazioni speciali: quali?

Le sezioni dovrebbero essere continue e seriate. Il nostro protocollo prevede:

2 sezioni per E/E, spessore 2 micron;

2 sezioni su 10 vetrini per PAS, spessore 1.5/2 micron ciascuna su un vetrino numerato consecutivamente.

Dopo valutazione del patologo:

Tricromica di Masson, spessore 3 micron

Argento Metanamina, spessore 3 micron

AFOG, spessore 3 micron

Elastica - Van gieson, spessore 3 micron

Ferro Colloidale, spessore 3 micron

Rosso Congo, spessore 6 micron

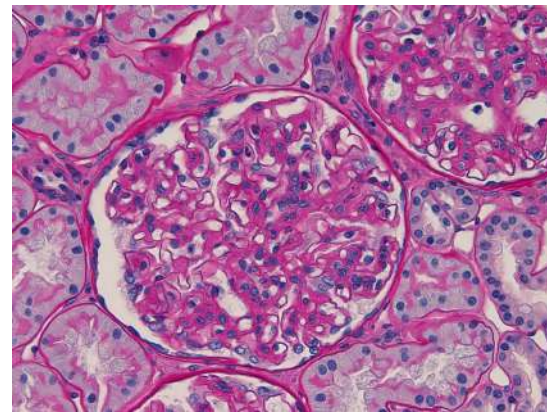
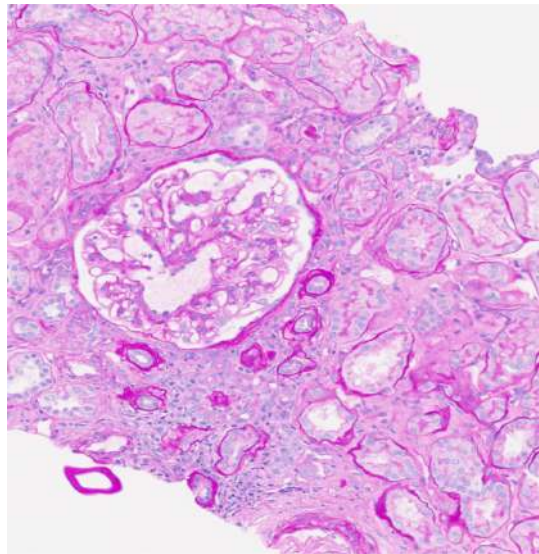
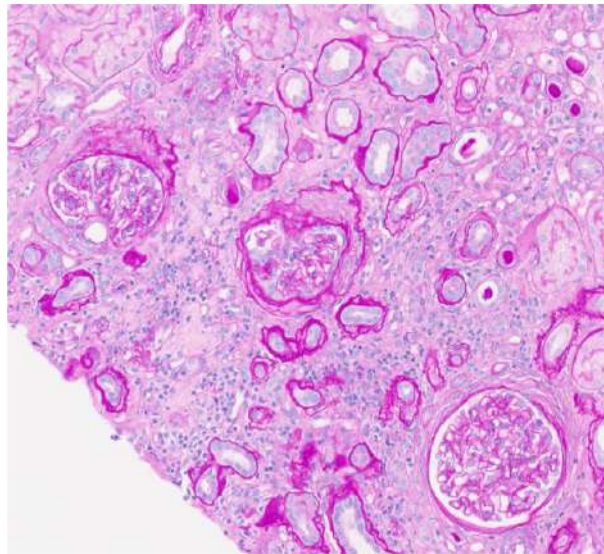
PAS (Periodic Acid Schiff)

Colorazione di ossidoriduzione. L'agente ossidante è l'acido periodico (rompe i legami tra 2 atomi di carbonio liberando gruppi aldeidici)

Il reattivo di Schiff reagisce specificamente con i gruppi aldeidici, formando legami covalenti con il carbonio portatore del gruppo aldeidico. I gruppi aldeidici sono rilevati dal reattivo di Schiff che li colora in rosso magenta dato che è costituito da fucsina basica trattata con acido solforico (che la rende incolore).

Si colorano: polisaccaridi; membrane basali; pareti di funghi e microorganismi; viene utilizzata per evidenziare l'accumulo di glicogeno; la steatosi epatica e le malattie da accumulo.

La colorazione di Pas nella biopsia renale viene utilizzata per la valutazione dell'ispessimento delle membrane basali dei glomeruli, si colorano anche le membrane basali dei tubuli renali.
Spessore delle sezioni a 1,5 micron.



Tricromica di Masson

Prende il nome dai tre coloranti utilizzati nel processo di colorazione: Ematossilina di Weigert; soluzione di Biedrich; soluzione di Anilina.

Questi tre coloranti vengono utilizzati per colorare selettivamente muscolo, fibre di collagene, fibrina ed eritrociti utilizzando la chimica acido-base.

Si utilizza la soluzione di Bouin come mordenzante per collegare il colorante ai componenti specifici del tessuto.

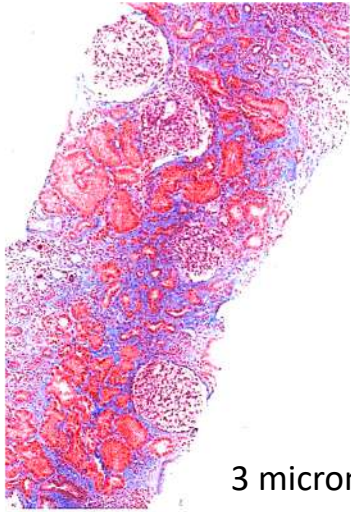
L'ematossilina di Weigert, un'ematossilina ferrica resistente alla decolorazione mediante successive soluzioni coloranti acide, viene utilizzata per la colorazione dei nuclei.

La soluzione di Biebrich, colorante a base di fucsina acida scarlatta, colora tutti i componenti acidofili del tessuto, inclusi citoplasma, muscolo e collagene.

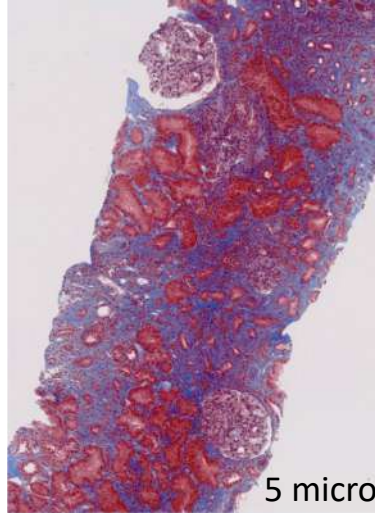
L'acido fosfomolibdico/fosfotungstico decolora e permette la diffusione della fucsina dell'acido scarlatto di Biebrich dalle fibre di collagene colorando le cellule muscolari di rosso e collega il collagene decolorato al colorante successivo.

Soluzione di blu di anilina, composto aromatico, colora di blu il collagene.

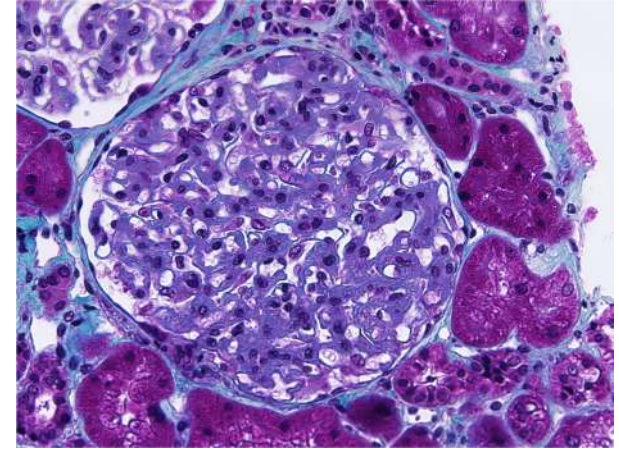
La Tricromica di Masson è indicata, nella biopsia renale, per evidenziare le aree di fibrosi interstiziale e di sclerosi glomerulare che si colorano di blu con intensità diversa a seconda del grado di collagenizzazione. Si possono evidenziare, sempre in blu, anche eventuali depositi di immunocomplessi nella membrana basale e i trombi di fibrina nei vasi capillari.



3 micron



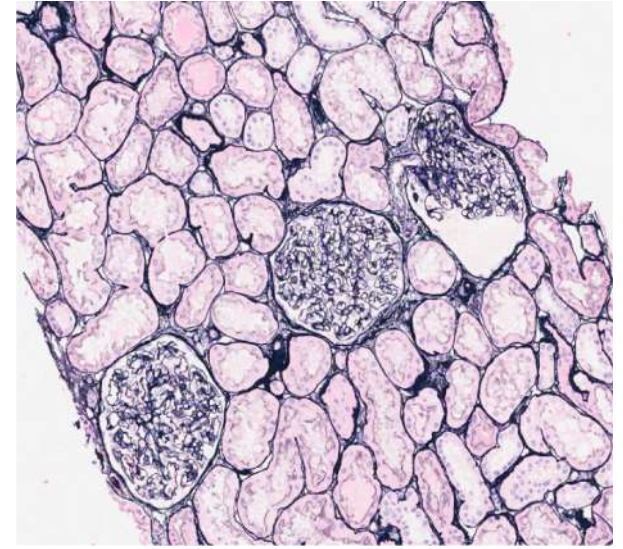
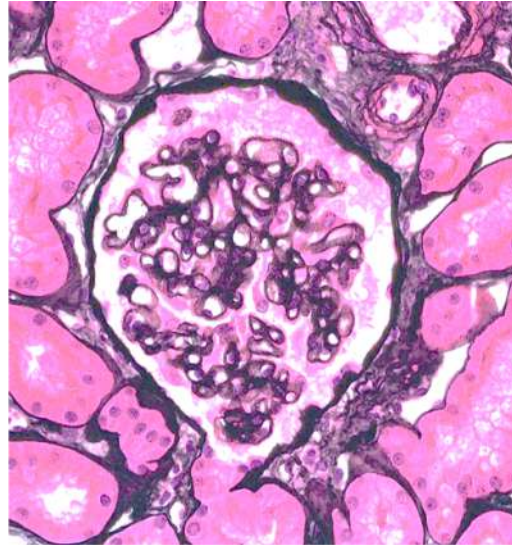
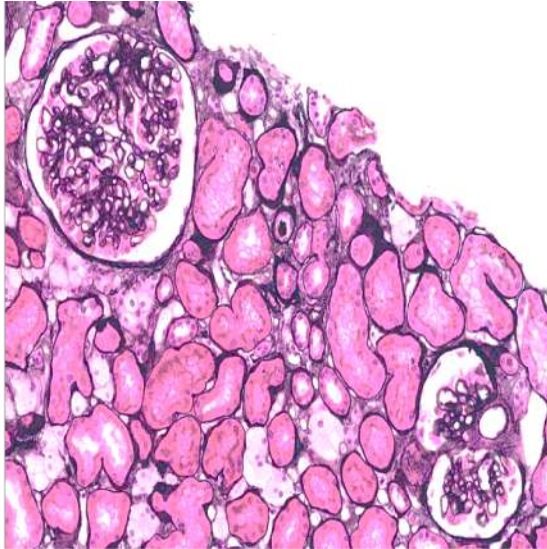
5 micron



ARGENTO METANAMINA

E' un'impregnazione argentica
L'acido periodico agisce sui gruppi glicolici e glicosaminici presenti nei mucopolisaccaridi e li ossida a gruppi aldeidici rompendo le catene. L'argento cloruro (argento-metanamina) viene ridotto ad argento metallico colorando di nero le strutture interessate

La colorazione di Jones Argento Metanamina permette di visualizzare, colorando in nero, spessore caratteristiche e aspetto delle membrane basali e della matrice del mesangio.



AFOG (Acid Fuchsin Orange G)

L'ematossilina ferrica colora i nuclei; l'Orange colora il citoplasma e il blu di Anilina colora il collagene.

E' un metodo che si basa sull'elettività chimica dei coloranti con le macromolecole del tessuto. L'acido fosfomolibdico si lega selettivamente alle fibrille di collagene, alle membrane cellulari ecc. e agisce da ponte tra quest'ultime e l'Anilina.

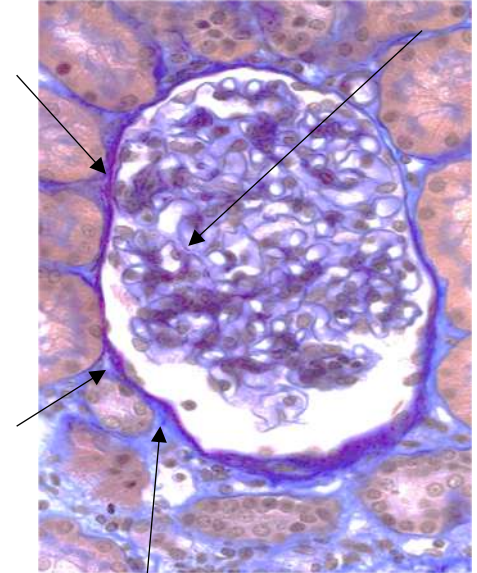
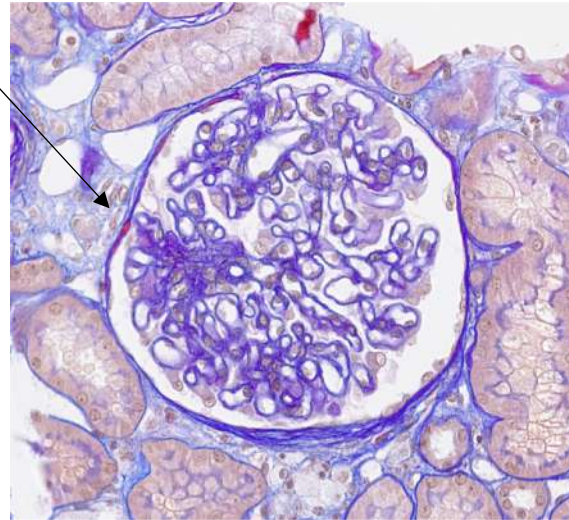
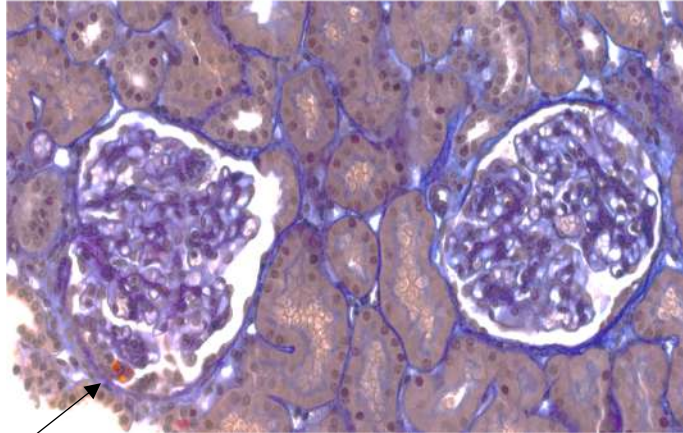
Mentre l'Orange, che non ha affinità per l'acido fosfomolibdico è libero di legarsi con le strutture restanti. La fucsina acida si lega, invece, con i depositi di proteine eventualmente presenti, evidenziandoli

La colorazione di AFOG permette di evidenziare presenza e sede degli immunocomplessi (epimembranosi, intramembranosi, subendoteliali e mesangiali)

Si colorano in blu le fibre di collagene;

Nero/marrone i nuclei

Rosso i depositi degli immunocomplessi



FERRO COLLOIDALE (Ferro di Hale)

Metodo indicato per la visualizzazione di mucine acide.

La reazione evidenzia le mucine acide i cui gruppi acidi al pH della reazione si trovano in forma anionica e sono quindi in grado di formare un complesso stabile con il ferro trivalente positivo.

Il metodo si basa sull'interazione stabilita tra ferro colloidale e gruppi aldeidici della catena mucopolisaccaridica.

Il ferro forma un composto di chelazione rilevabile con il metodo del Blu di Prussia infatti il ferrocianuro di potassio, reagendo in ambiente acido con gli ioni ferrici del chelato, forma un sale insolubile che si colora con il Blu di Prussia. La reazione, in forma ionica, avviene in questo modo:

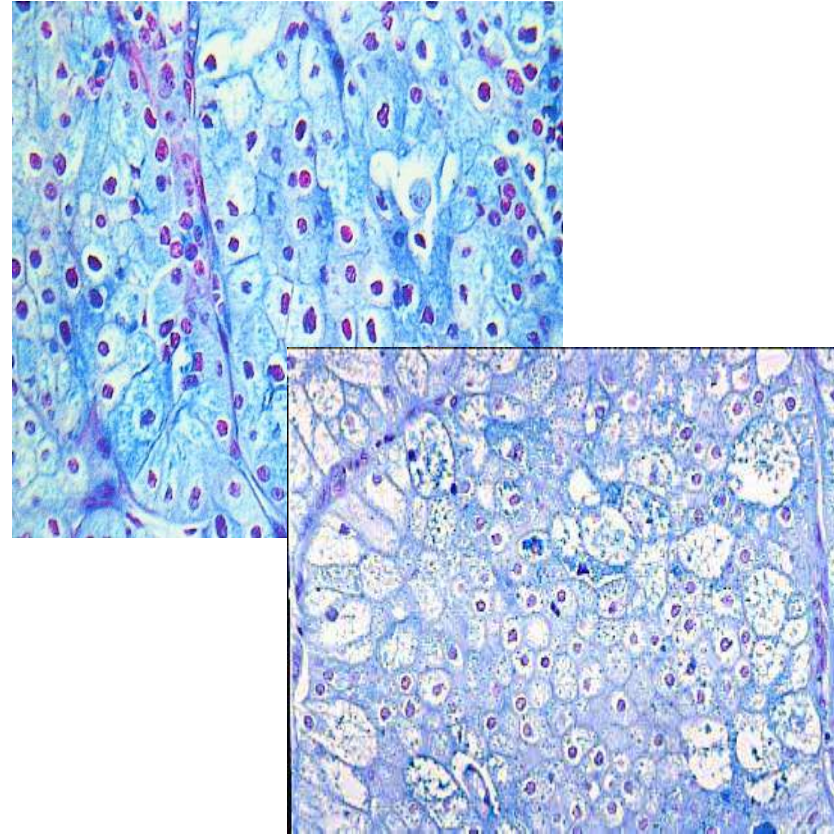


La colorazione evidenzia quindi, le mucine acide e il ferro colloidale.

Viene utilizzata principalmente per distinguere il carcinoma a cellule renali del tipo cromofobo (intensamente positivo nella gran parte delle cellule con colorazione reticolare) dall'oncocitoma renale (solitamente negativo; se positivo in un minor numero di cellule, con minor intensità e con colorazione microgranulare).

Le mucine acide si colorano in blu
I nuclei in rosso

Ad oggi la DD predilige le tecniche di IHC



ROSSO CONGO

L'Amiloide è una struttura omogenea e con tintorialità eosinofila. E' costituita da fibrille proteiche di varie dimensioni che, in caso di amiloidosi, si depositano tra le cellule. Tutti i depositi di amiloide contengono fibrille proteiche simili che sono resistenti ai meccanismi di difesa endogeni e non possono più essere rimosse.

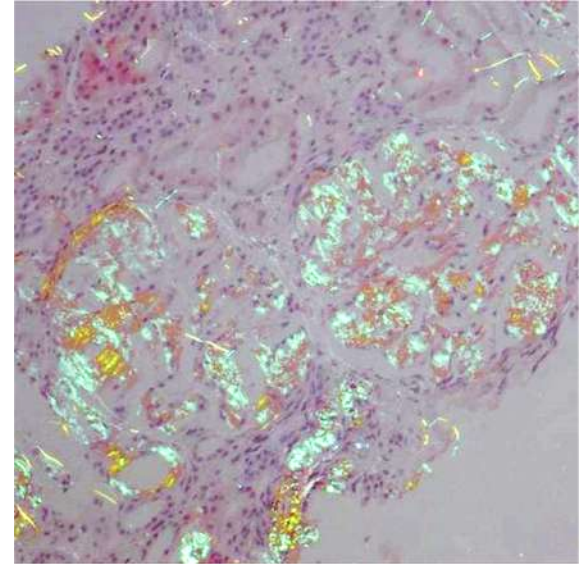
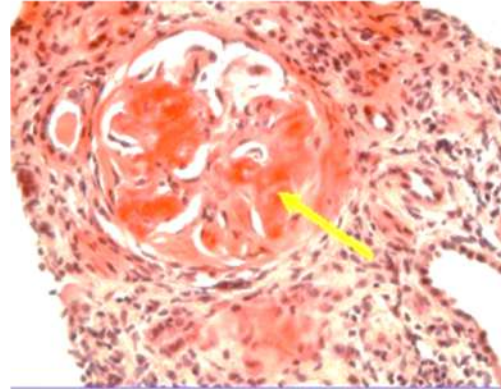
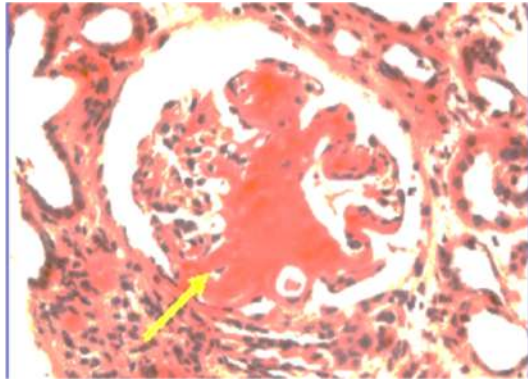
Il principio della colorazione si basa sulla capacità di legare il colorante ai componenti polisaccaridici del substrato attraverso i legami a ponte d'idrogeno. Il colorante (anionico) si deposita quindi nelle fibrille proteiche dell'amiloide che sarà visibile con luce polarizzata mostrando una marcata birifrangenza.

Il legame tra amiloide e Rosso Congo non è chiaro se sia dovuto ai componenti proteici o quelli polisaccaridici dell'amiloide stessa, o ambedue, tuttavia certa è la birifrangenza marcata che mostra tale sostanza dopo il legame con il Rosso Congo

La colorazione può risultare tecnicamente difficile qualora vengano utilizzate delle sezioni di paraffina inferiori a 5 micron poiché la quantità di Amiloide presente nella sezione risulta insufficiente.

Al microscopio ottico il tessuto appare di colore rosso arancio con nuclei blu scuro e Amiloide in trasparenza da rosa a rosso.

All'osservazione **in luce polarizzata** i depositi di amiloide presentano birifrangenza verde mele su fondo scuro. Le altre strutture non sono visibili in luce polarizzata.



Microscopia elettronica

Il frammento selezionato per la ME delle dimensioni di circa 1 mm, viene fissato in Glutaraldeide al 2,5% in tampone fosfato o tampone cacodilato per 3-6 ore.

Al termine della fissazione viene trasferito in tampone e conservato a +4°C fino all'invio al centro di riferimento per l'analisi.

Le tappe di preparazione del campione per la microscopia elettronica a trasmissione consistono in diversi passaggi quali:

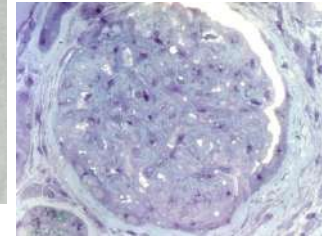
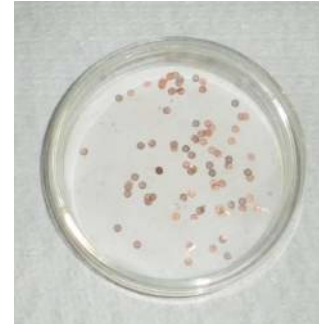
- prelievo
- fissazione
- disidratazione

- inclusione;
- taglio;
- colorazione.



Processazione

- fissazione in glutaraldeide
- post-fissazione (osmio)
- disidratazione
- pre-inclusione ed inclusione in resina
- taglio semi-fini
- colorazione semi-fini (blu di metilene)
- taglio sezioni ultrafini
- contrasto delle sezioni ultrafini (uranylless e Piombo Citrato)



Inclusione

Dopo la preparazione della Resina, addizionata di un accelerante chimico per permettere la reazione di polimerizzazione, il campione viene immerso nella resina per completare la penetrazione.

Viene effettuata l'inclusione utilizzando contenitori cilindrici con la punta tronca.

Dopo l'inclusione in resina, i porta-pozzetti vengono portati in stufetta a 65 C° per la polimerizzazione per ventiquattro, trentasei ore.

Il blocchetto di resina che si formerà serve come supporto durante il taglio.



Taglio

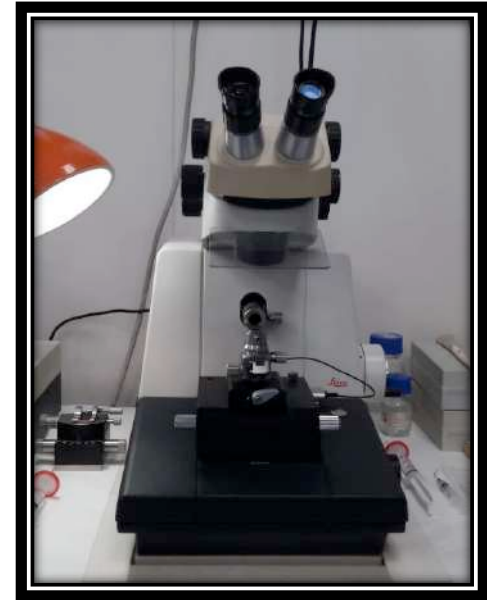
Per il taglio delle sezioni si utilizza l'**ultramicrotomo**, strumento dalla meccanica finissima.

La regolazione dello spessore delle sezioni fini si compie mediante un sistema elettronico di avanzamento termico del braccio meccanico, sul quale è fissato il blocchetto.

Le lame utilizzate sono lame di vetro.

Come fase preliminare del taglio, si allestisce la "piramide", tecnica che consiste nel rifilare con una lametta il blocchetto di resina, in modo tale da esporre tutto il tessuto.

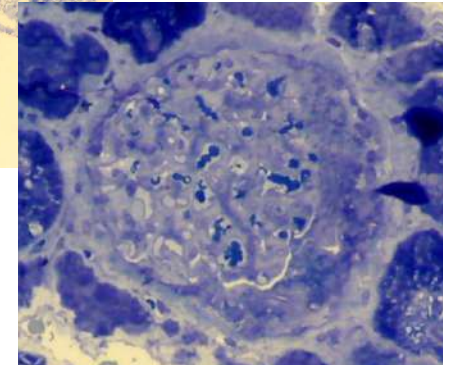
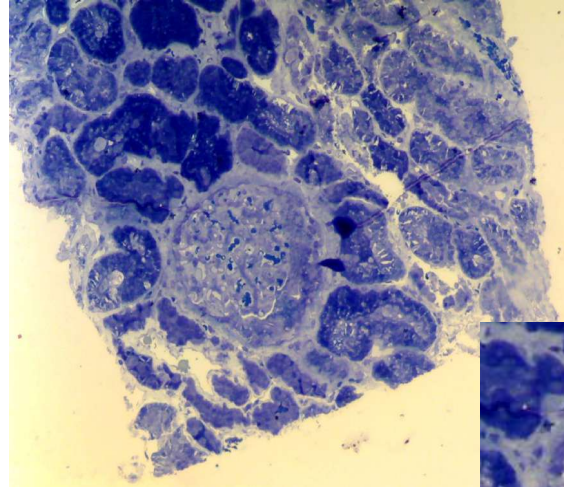
Un primo taglio permette di ottenere sezioni semifini (0,5-1 μm).



Colorazione

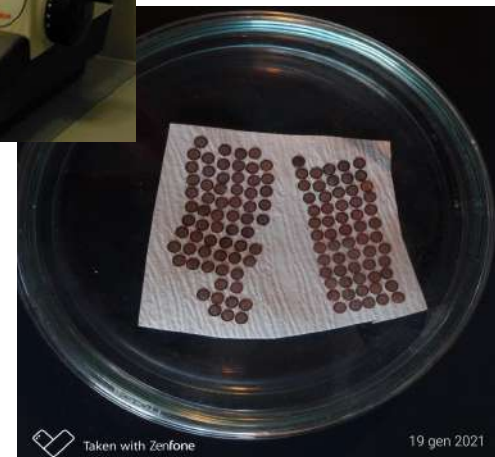
Metodo blu di metilene-safranina:

risaldare il vetrino a caldo a 60 C° per garantire aderenza delle sezioni;
lasciar raffreddare;
colorare a caldo con blu di metilene per alcuni minuti ed eliminare l'eccesso di colorante con lavaggio in acqua
colorare con safranina per alcuni secondi a caldo;
lavare in acqua;
asciugare il vetrino sulla piastra e montare con balsamo.



Taglio e allestimento sezioni ultrafini

Vengono eseguite sezioni ultrasottili (40-80 nm) utilizzando lame di diamante, depositate su retini



Metodo per contrasto con acetato di uranile e piombo citrato

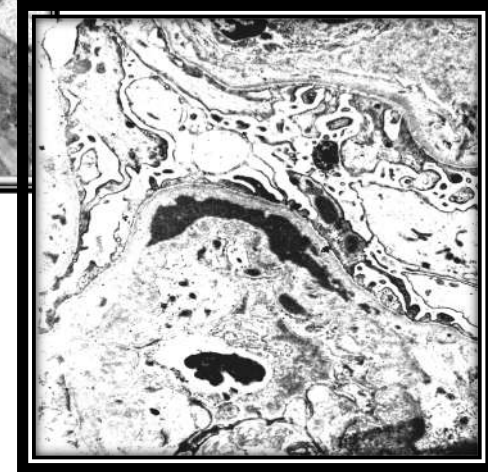
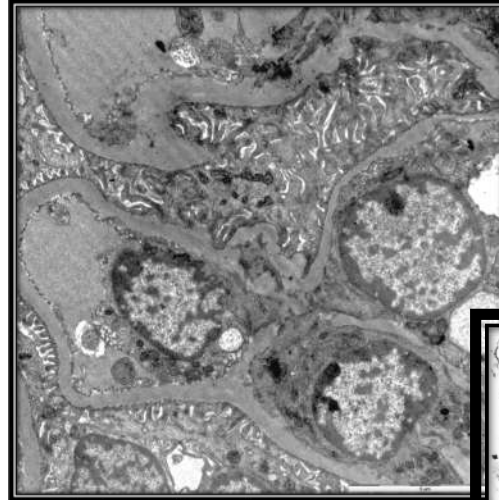
Viene utilizzato per la colorazione delle sezioni ultrafini.

Si procede colorando con l'acetato di uranile (uranyless) al buio per 10' minuti;

lavaggio con acqua distillata;

Infine si contrasta con con piombo citrato al buio per 5' minuti;

lavaggio con acqua distillata





Associazione Italiana Tecnici Istologia Citologia



XXX

CONGRESSO NAZIONALE

in Tecniche di Laboratorio Biomedico

29 NOVEMBRE - 1 DICEMBRE 2023 RIMINI, HOTEL AMBASCIATORI

CON IL PATROCINIO DI



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

