

Metodi e Tecniche di Istologia in Anatomia Patologica

Salvatore Lorenzo Renne¹

23 luglio 2025

¹Salvatore Lorenzo Renne, MD
Associate Professor of Pathology, Humanitas University, Pieve Emanuele, MI
Anatomic Pathology Unit, Humanitas Research Hospital, Rozzano, MI
Email: salvatore.renne@hunimed.eu

Indice

1	Fissazione tessuto istologico	9
1.1	Introduzione	9
1.1.1	Importanza della Fissazione dei Tessuti	9
1.1.2	Vantaggi e Svantaggi dei Fissativi	9
1.1.3	Perdita di Componenti Molecolari durante la Fissazione	9
1.1.4	Artefatti nei Tessuti Fissati	10
1.1.5	Conservazione della Struttura Molecolare	10
1.1.6	Interazione della Fissazione con Altri Processi	10
1.1.7	Fissativo Ideale in Patologia Diagnostica	10
1.1.8	Caratteristiche di un Buon Fissativo	10
1.2	Metodi Fisici di Fissazione	11
1.2.1	Fissazione per Calore	11
1.2.2	Fissazione con Microonde	11
1.2.3	Liofilizzazione e Sostituzione a Freddo	11
1.3	Fissazione Chimica	12
1.3.1	Fissativi Coagulanti	12
1.3.2	Fissativi Coagulanti Deidranti	12
1.3.3	Altri Tipi di Fissativi Coagulanti	14
1.3.4	Fissativi a Legame Incrociato Non Coagulanti	15
1.4	Fissazione con Formaldeide	15
1.4.1	Reazioni della Formaldeide con Proteine Nucleari e Acidi Nucleici	16
1.4.2	Catene Laterali Più Reattive con la Formaldeide	16
1.4.3	Reversibilità delle reazioni macromolecolari della for- maldeide	16
1.4.4	Effetto del lavaggio prolungato	16
1.4.5	Conservazione a lungo termine in formalina	17
1.4.6	Importanza dei ponti metilenici	17
1.4.7	Correzione dell'iperfissazione	17
1.4.8	Tipi di legami crociati e loro stabilità	17

1.4.9	Saturazione dei tessuti con formalina	17
1.4.10	Effetto dell'acidità nella formalina	17
1.4.11	Uso della formalina acida in immunoistochimica	18
1.4.12	Effetto della formaldeide su proteine, nucleotidi e lipidi	18
1.5	Fattori che Influenzano la Qualità della Fissazione	18
1.5.1	Buffer e pH	18
1.5.2	Durata della Fissazione e Dimensione dei Campioni	19
1.5.3	Temperatura della Fissazione	19
1.6	Riassunto	20
2	Introduzione al campionamento	23
2.1	Introduzione	23
2.1.1	L'importanza dell'esame macroscopico	23
2.1.2	La dissezione come fase cruciale	23
2.1.3	L'esperienza è fondamentale per campioni complessi	24
2.2	Dall'accettazione alla processazione	24
2.2.1	Posizione ideale del laboratorio	24
2.2.2	Trattamento delle biopsie	24
2.2.3	La preparazione e la dissezione dei campioni	25
2.2.4	La stanza dell'accettazione	25
2.2.5	L'accettazione del campione	25
2.2.6	Regole per la verifica del campione	26
2.2.7	Il numero istologico	26
2.2.8	Valutazione iniziale dei campioni	26
2.2.9	Procedure speciali	26
2.2.10	Ruolo dei <i>Pathologists' Assistants</i>	27
2.2.11	La dissezione e il taglio del campione	27
2.3	Caratteristiche Generali della Sala Macroscopica	27
2.3.1	Dimensioni e Illuminazione	28
2.3.2	Stazioni di Lavoro	28
2.3.3	Postura durante la dissezione	29
2.3.4	Strumenti di dissezione	29
2.3.5	Conservazione e gestione dei campioni	29
2.4	Principi Generali per l'Esame Macroscopico	30
2.4.1	Identificazione e Orientamento del Campione	30
2.4.2	Difficoltà nell'Orientamento del Campione	30
2.4.3	Manipolazione del Campione	30
2.4.4	Importanza della Conoscenza Anatomica del Patologo	30
2.4.5	Margini Chirurgici e Diagnosi Istologica	31
2.4.6	Dissezione del Campione Chirurgico	31
2.4.7	Gestione di Campioni con Tessuti Molli e Ossa	31

2.4.8	Conservazione delle Sezioni e Campioni	31
2.4.9	Contaminazione dei Campioni	32
2.4.10	Errori di Etichettatura	32
2.4.11	Riassunto	32
3	Campioni chirurgici	35
3.1	Introduzione ai pezzi chirurgici	35
3.1.1	La chirurgia elettiva	35
3.1.2	La chirurgia non elettiva	35
3.1.3	Finalità del campionamento	36
3.1.4	Apertura del pezzo chirurgico	36
3.1.5	Orientamento del pezzo chirurgico	37
3.2	Distinzione fra pezzi neoplastici e non neoplastici	37
3.2.1	Cos'è una neoplasia	37
3.2.2	Caratteristiche delle neoplasie	37
3.2.3	Sierosite	38
3.2.4	Infiammazione	38
3.2.5	Fibrosi e granulomi	38
3.2.6	Campionamento dell'alterazione macroscopica	39
3.3	Campioni neoplastici	39
3.3.1	Impatto della diagnosi patologica	39
3.3.2	Valutazione dei margini chirurgici	40
3.3.3	Stadiazione TNM	40
3.3.4	Importanza del campionamento nella patologie neoplastiche	42
3.4	Tumore della mammella	42
3.5	Tumore del polmone	45
3.6	Tumore del colon	47
3.7	Tumore della prostata	49
3.7.1	Incidenza e anatomia	49
3.7.2	Descrizione macroscopica della prostata	50
3.7.3	Campionamento della prostata	50
3.8	Campionamento dei linfonodi	51
3.8.1	Importanza del campionamento completo	51
3.8.2	Tecniche di campionamento nei vari distretti	51
3.8.3	Ricerca dei linfonodi patologici	52
3.9	Campionamento delle patologie infiammatorie e neoplastiche	52
3.9.1	Rettocolite ulcerosa	53
3.9.2	Morbo di Crohn	53
3.9.3	Patologie tiroidee	53
3.9.4	Chirurgia mammaria e bariatrica	53

3.9.5	Colecistectomia per litiasi	54
3.9.6	Appendicectomia	54
3.9.7	Chirurgie emergenti	54
3.10	Riassunto	54
4	Campionamento: cuti, piccoli campioni e biopsie	57
4.1	Biopsie Cutanee	57
4.1.1	Biopsia Punch	58
4.1.2	Biopsia Shave	58
4.1.3	Losange Cutanee	58
4.1.4	Descrizione Macroscopica	58
4.2	Campionamento delle piccole biopsie	60
4.2.1	Biopsie endoscopiche	60
4.2.2	Campionamento delle Biopsie Endoscopiche	60
4.2.3	Resezioni Endoscopiche Orientate	60
4.2.4	Resezioni Transuretrali Prostatiche (TURP)	61
4.2.5	Frustoli da core needle biopsy	61
4.2.6	Biopsie Frammentate e Biopsie Core	62
4.3	Riassunto	62
5	Processazione pezzi chirurgici e biotici	63
5.1	Introduzione	63
5.2	Etichettatura dei Tessuti	63
5.3	Principi dela processazione dei Tessuti	64
5.3.1	Fattori che influenzano la velocità di processazione	64
5.4	Fasi dela processazione dei Tessuti	65
5.5	Fissazione	65
5.6	Disidratazione	66
5.7	Disidratazione	66
5.8	Fluidi Disidratanti	66
5.8.1	Etanolo (C ₂ H ₅ OH)	66
5.8.2	Spirito Metilato Industriale (Alcol Denaturato)	67
5.8.3	Metanolo (CH ₃ OH)	67
5.8.4	Propan-2-olo, Alcol Isopropilico (CH ₃ CHOHCH ₃)	67
5.8.5	Butanolo (C ₄ H ₉ OH)	67
5.8.6	Acetone (CH ₃ COCH ₃)	67
5.9	Additivi agli Agenti Disidratanti	67
5.10	Solventi Universali	68
5.11	Chiarificazione	68
5.11.1	Criteri di selezione per un agente chiarificante	68
5.11.2	Agenti chiarificanti per uso routinario	69

5.12	Reagenti di Infiltrazione e Inclusione	70
5.12.1	Paraffina	70
5.13	Mezzi di inclusione alternativi	70
5.13.1	Resina	71
5.13.2	Agar	71
5.13.3	Gelatina	71
5.13.4	Celloidina	71
5.14	Inclusione in paraffina	72
5.15	Processazione automatizzata dei tessuti	72
5.15.1	Processatori a microonde	72
5.15.2	Vantaggi delle nuove tecnologie	72
5.16	Riassunto	73
6	Inclusione in paraffina e taglio al microtomo	75
6.1	Introduzione	75
6.2	La Processazione	75
6.3	Centralina di Inclusione	75
6.4	Criteri di Inclusione	76
6.5	Inclusione in paraffina	76
6.5.1	Panoramica dell'attrezzatura	77
6.5.2	Procedura di inclusione	77
6.5.3	Gestione dopo l'inclusione	78
6.5.4	Pulizia e manutenzione	78
6.5.5	Difetti Comuni nell'Inclusione	79
6.6	Il Taglio al Microtomo	79
6.6.1	Fasi di Allestimento	79
6.7	Caratteristiche di una Sezione Ottimale	80
6.8	La tecnica di taglio	80
6.8.1	Fissaggio del blocchetto	80
6.8.2	Impostazione della lama	80
6.8.3	Preparazione del blocchetto	81
6.8.4	Impostazione del microtomo	81
6.8.5	Raccolta delle sezioni	81
6.8.6	Essiccazione	81
6.9	Difetti di Sezione e Correzioni	81
6.9.1	Effetto a Tapparella	81
6.9.2	Pieghe	81
6.9.3	Bolle d'Aria	82
6.9.4	Crepe	82
6.9.5	Sezione Disintegrante	82
6.10	Conclusioni	82

7	Automazione in anatomia patologica	83
7.0.1	Perché automatizzare	83
7.0.2	Automazione e Sicurezza in Laboratorio	83
7.1	Analisi Economica dell'Automazione	84
7.1.1	Costo Opportunità e Efficienza	84
7.1.2	Tecnologie Disruptive e Innovazione	84
7.2	Aumento della Complessità delle Procedure	84
7.2.1	Crescente Richiesta di Esami Complessi	84
7.2.2	Maggiore Complessità = Maggiore Cura nelle Variabili Preanalitiche	85
7.3	Crisi Vocazionale e Trasformazione dei Ruoli	85
7.3.1	Impatto della Crisi Vocazionale	85
7.3.2	Nuovi Ruoli per i Tecnici di Laboratorio	85
7.4	Conclusioni	86
8	Esame intraoperatorio: finalità e mezzi	87
8.1	Introduzione	87
8.2	Veloce ma non velocissima	87
8.3	La Richiesta di Consulenze in Sala Operatoria	88
8.4	Glossario	88
8.5	Finalità del FSE	90
8.6	Limiti delle Sezioni Congelate	90
8.7	Artefatti	91
8.8	FSE Inappropriate	91
8.9	Consulto Intraoperatorio	92
8.10	Accuratezza della Sezione Congelata	93
8.11	Conclusioni	93
9	Tecnica del dell'esame intraoperatorio	95
9.0.1	Preparazione e configurazione del criostato	95
9.0.2	Rifilatura del blocco	97
9.0.3	Taglio delle sezioni finali: tecnica del pennello in mo- vimento continuo	98
9.0.4	Recupero della sezione	99
9.0.5	Variabili che influenzano le proprietà di taglio dei tessuti	100
9.1	Artefatti e consigli professionali per evitarli	102
9.1.1	Artefatti legati alla temperatura	103
9.1.2	Difficoltà di taglio specifiche per tessuto	104
9.1.3	Artefatti meccanici e tecnici	106
9.1.4	Artefatti di preparazione e colorazione	109
9.1.5	Considerazioni finali	111

Capitolo 1

Fissazione tessuto istologico

1.1 Introduzione

1.1.1 Importanza della Fissazione dei Tessuti

La fissazione adeguata dei tessuti per l'esame istologico è fondamentale. Senza un'accurata gestione di questo processo, i test eseguiti in laboratorio rischiano di essere inefficaci o inutili. Negli ultimi cento anni, sono stati sviluppati numerosi tipi di fissativi per preservare la struttura e la funzione biologica dei tessuti. Questi fissativi agiscono mediante vari meccanismi come la formazione di legami covalenti, la disidratazione e l'azione di acidi, sali o calore. I fissativi complessi spesso utilizzano più di uno di questi meccanismi.

1.1.2 Vantaggi e Svantaggi dei Fissativi

Ogni fissativo presenta vantaggi specifici, ma anche numerosi svantaggi. Tra questi si trovano la perdita di molecole, il gonfiore o il restringimento dei tessuti e la variabilità nella qualità delle colorazioni istochimiche e immunohistochemiche. Un problema particolare riguarda l'uso della formaldeide, che può compromettere il riconoscimento antigenico, soprattutto dopo l'inclusione in paraffina. Tuttavia, grazie ai metodi di recupero epitopico indotto dal calore introdotti negli anni '90, molti di questi ostacoli sono stati superati.

1.1.3 Perdita di Componenti Molecolari durante la Fissazione

La fissazione può causare la perdita di componenti solubili, come proteine, lipidi e acidi nucleici, che sono essenziali per mantenere la struttura macromolecolare del tessuto. Se i componenti citoplasmatici vengono persi, la

colorazione del tessuto, ad esempio con ematossilina-eosina (H&E), può risultare alterata. Anche le valutazioni immunoistochimiche potrebbero risultare compromesse.

1.1.4 Artefatti nei Tessuti Fissati

La fissazione, inevitabilmente, induce artefatti, come il restringimento o gonfiore dei tessuti, che possono influenzare l'aspetto delle sezioni colorate. Tuttavia, per scopi diagnostici, è importante che questi artefatti siano consistenti e prevedibili, così da non alterare l'interpretazione delle strutture tissutali.

1.1.5 Conservazione della Struttura Molecolare

Uno degli scopi principali della fissazione è preservare le strutture macromolecolari e proteggere i tessuti dalla degradazione. Il fissativo riduce la distruzione enzimatica e protegge i tessuti dagli agenti patogeni. Un fissativo efficace garantisce che le caratteristiche del tessuto possano essere studiate anche a distanza di anni, senza che il tessuto subisca ulteriori danni.

1.1.6 Interazione della Fissazione con Altri Processi

La fissazione non è un processo isolato: essa interagisce con tutte le fasi successive, dalla disidratazione alla colorazione del tessuto. L'effetto complessivo della fissazione, insieme alla processazione del tessuto, rappresenta un compromesso tra la necessità di preservare la struttura originale e le modifiche inevitabili causate dai diversi processi chimici coinvolti.

1.1.7 Fissativo Ideale in Patologia Diagnostica

Ad oggi, non esiste un fissativo universale ideale. La scelta del fissativo dipende dall'esigenza specifica di evidenziare determinate caratteristiche tissutali. Nella patologia diagnostica, il fissativo più utilizzato è la formalina tampognata al 10%, che è apprezzata per la sua capacità di preservare le strutture tissutali per molti anni.

1.1.8 Caratteristiche di un Buon Fissativo

Un fissativo efficace deve garantire una colorazione di alta qualità e costante nel tempo, preservando la microarchitettura del tessuto, prevenendo la degradazione enzimatica e minimizzando la diffusione delle molecole solubili.

Inoltre, deve garantire la sicurezza d'uso, essere compatibile con le moderne tecnologie e avere un costo sostenibile.

1.2 Metodi Fisici di Fissazione

1.2.1 Fissazione per Calore

La fissazione più semplice è quella per calore. Ad esempio, lessare un uovo provoca la coagulazione delle proteine, permettendo di distinguere chiaramente il tuorlo dall'albume al momento del taglio. Dopo la fissazione per calore, ogni componente diventa meno solubile in acqua rispetto all'uovo fresco. Quando una sezione congelata viene posizionata su un vetrino riscaldato, essa si attacca al vetrino e subisce una parziale fissazione attraverso il calore e la disidratazione. Sebbene una morfologia adeguata possa essere ottenuta lessando i tessuti in soluzione salina normale, in istopatologia il calore è principalmente utilizzato per accelerare altri tipi di fissazione e le fasi di processazione del tessuto.

1.2.2 Fissazione con Microonde

Il riscaldamento a microonde velocizza il processo di fissazione, riducendo i tempi di fissazione di alcuni campioni e sezioni istologiche da oltre 12 ore a meno di 20 minuti. Tuttavia, il riscaldamento dei tessuti in formalina genera una grande quantità di vapori pericolosi. Pertanto, in assenza di una cappa per la fissazione o di un sistema di processazione a microonde progettato per gestire questi vapori, potrebbero sorgere problemi di sicurezza. Recentemente, sono stati introdotti fissativi commerciali a base di glicosale che non producono vapori quando riscaldati a 55°C, offrendo un metodo efficace di fissazione a microonde.

1.2.3 Liofilizzazione e Sostituzione a Freddo

La liofilizzazione è una tecnica utile per lo studio di materiali solubili e piccole molecole. I tessuti vengono tagliati in sezioni sottili, immersi in azoto liquido e l'acqua viene rimossa in una camera a vuoto a -40°C. Successivamente, il tessuto può essere fissato ulteriormente con vapori di formaldeide. Nella sostituzione, i campioni vengono immersi in fissativi a -40°C, come acetone o alcol, che rimuovono lentamente l'acqua attraverso la dissoluzione dei cristalli di ghiaccio, senza denaturare le proteine. L'aumento graduale

della temperatura fino a 4°C completa il processo di fissazione. Questi metodi di fissazione sono principalmente utilizzati in ambito di ricerca e sono raramente impiegati nei laboratori clinici.

1.3 Fissazione Chimica

La fissazione chimica utilizza soluzioni organiche o inorganiche per mantenere una adeguata preservazione morfologica. I fissativi chimici possono essere classificati in tre categorie principali: fissativi coagulanti, fissativi a legame incrociato e fissativi composti.

1.3.1 Fissativi Coagulanti

Le soluzioni sia organiche che inorganiche possono coagulare le proteine, rendendole insolubili. L'architettura cellulare è mantenuta principalmente da lipoproteine e da proteine fibrose come il collagene; la coagulazione di tali proteine preserva la istomorfologia del tessuto a livello microscopico. Sfortunatamente, poiché i fissativi coagulanti causano flocculazione citoplasmatica e una scarsa conservazione di mitocondri e granuli secretori, questi fissativi non sono utili per l'analisi ultrastrutturale.

1.3.2 Fissativi Coagulanti Deidranti

I fissativi coagulanti più comunemente utilizzati sono alcoli (es. etanolo, metanolo) e acetone. Il metanolo ha una struttura più simile a quella dell'acqua rispetto all'etanolo. Pertanto, l'etanolo compete più fortemente del metanolo nell'interazione con aree idrofobiche delle molecole; la fissazione coagulante inizia a una concentrazione del 50–60% per l'etanolo, mentre per il metanolo è necessaria una concentrazione dell'80% o superiore. La rimozione e la sostituzione dell'acqua libera nei tessuti da parte di questi agenti hanno diversi effetti potenziali sulle proteine. Le molecole d'acqua circondano le aree idrofobiche delle proteine e, per repulsione, costringono i gruppi chimici idrofobici a entrare in contatto più stretto tra loro, stabilizzando così i legami idrofobici. Rimuovendo l'acqua, il principio opposto indebolisce tali legami. Analogamente, le molecole d'acqua partecipano ai legami idrogeno nelle aree idrofile delle proteine; quindi, la rimozione dell'acqua destabilizza questi legami idrogeno. Insieme, questi cambiamenti agiscono per disturbare la struttura terziaria delle proteine. Inoltre, una volta rimossa l'acqua, la struttura della proteina può diventare parzialmente invertita, con i gruppi idrofobici che si spostano sulla superficie esterna della proteina.

Categoria di fissativo	Disidratanti (Etanolo, Metanolo, Acetone)	Aldeidi reticolanti (Formaldeide, Glutaraldeide)	Combinazione cloruro mercurico con formaldeide o acido acetico (Zenker's B5)	Tetroxido di osmio	Acido picrico più formalina e acido acetico (Bouin's)
Effetto sulle proteine	Precipita senza aggiunta chimica	Reticolanti: aggiunge gruppi idrossimetilici attivi ad ammine, ammidi, alcuni alcoli reattivi e gruppi sulfidrilici. Reticolazione delle catene laterali amminiche/ammidiche o sulfidriliche delle proteine	Additivo più coagulazione	Reticolazione additiva, un po' di estrazione, un po' di distruzione	Coagulante additivo e non additivo, un po' di estrazione
mRNA/DNA	Lieve	Reticolazione lenta; leggera estrazione	Coagulazione	Leggera estrazione	Nessuna azione
Lipidi	Estrazione estensiva	Nessuna azione	Nessuna azione	Resi insolubili dalla reticolazione con doppi legami	Nessuna azione
Carboidrati	Nessuna azione	Nessuna su carboidrati puri; reticolazione delle glicoproteine	Nessuna azione	Leggera ossidazione	Nessuna azione
Qualità della colorazione H&E	Soddisfacente	Buona	Buona	Scarsa	Buona
Effetto sull'ultrastruttura (organelli)	Distrugge l'ultrastruttura, inclusi mitocondri, proteine, coagulati	Buona (NBF) a eccellente conservazione con glutaraldeide; adeguata a buona in Carson-Millonig's	Scarsa conservazione	Usato per la visualizzazione delle membrane	Scarsa – tende a distruggere le membrane
Formulazione abituale	Soluzione al 70-100% o in combinazione con altri tipi di fissativi	Formaldeide (37%) – soluzione acquosa al 10% tamponata con fosfati a pH 7.2-7.4. Glutaraldeide – al 2% tamponata a pH 7.4	Cloruro mercurico combinato con acido acetico o dicromato o formaldeide più acetato	Soluzione all'1% tamponata a pH 7.4	Acido picrico acquoso, formalina, acido acetico glaciale
Variabili importanti/problemi	Tempo, spessore del campione – dovrebbe essere usato solo per campioni piccoli o sottili	Tempo, temperatura, pH, concentrazione/spessore del campione	Tossico	Estremamente tossico	Mitocondri e integrità della membrana nucleare distrutti; non appropriato per alcune colorazioni; mordenzante
Usi speciali	Preserva piccole molecole non lipidiche come il glicogeno; preserva l'attività enzimatica	Fissativo generale universale; migliore per ultrastruttura se usato con post-fissazione a tetrossido di osmio	Eccellente per tessuti emopoietici	Visualizzazione ultrastrutturale delle membrane; lipidi in sezioni congelate	Mordente per colorazioni di tessuto connettivo (tricromica)

Una volta che la struttura terziaria di una proteina solubile è stata modificata, il tasso di ritorno a uno stato solubile più ordinato è lento e la maggior parte delle proteine rimane insolubile anche se riportata in un ambiente acquoso.

La distruzione della struttura terziaria delle proteine, ovvero la denaturazione, ne cambia le proprietà fisiche, causando potenzialmente insolubilità e perdita di funzione. Anche se la maggior parte delle proteine diventa meno solubile in ambienti organici, fino al 13% di proteine può andare perso, ad esempio con la fissazione in acetone. I fattori che influenzano la solubilità delle macromolecole includono:

1. Temperatura, pressione e pH.
2. Forza ionica del soluto.
3. La costante di salting-in, che esprime il contributo delle interazioni elettrostatiche.
4. Le interazioni di salting-in e salting-out.
5. Il tipo di reagente/i denaturante/i.

L'alcol denatura le proteine in modo diverso, a seconda della scelta e della concentrazione dell'alcol, della presenza di sostanze organiche e inorganiche, e del pH e della temperatura di fissazione. Ad esempio, l'etanolo denatura le proteine più dei fenoli, che a loro volta denaturano più dell'acqua e degli alcoli polivalenti, che denaturano più degli acidi monocarbossilici e di quelli dicarbossilici.

1.3.3 Altri Tipi di Fissativi Coagulanti

I coagulanti acidi come l'acido picrico e l'acido tricloroacetico modificano le cariche sui gruppi laterali ionizzabili delle proteine, ad esempio ($-\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$) e ($\text{COO}^- \rightarrow \text{COOH}$), e disturbano i legami elettrostatici e idrogeno. Questi acidi possono anche inserire un anione lipofilo in una regione idrofila, alterando così le strutture terziarie delle proteine. L'acido acetico coagula gli acidi nucleici ma non fissa né precipita le proteine; pertanto, viene aggiunto ad altri fissativi per prevenire la perdita di acidi nucleici. L'acido tricloroacetico (Cl_3CCOOH) può penetrare nei domini idrofobici delle proteine e l'anione prodotto ($-\text{C}-\text{COO}^-$) reagisce con gruppi amminici caricati. Questa interazione provoca la precipitazione delle proteine ed estrae gli acidi nucleici. L'acido picrico o trinitrofenolo si dissolve leggermente in acqua per formare una soluzione acida debole (pH 2.0). Nelle reazioni, forma sali con

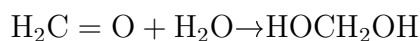
gruppi basici delle proteine, causando la coagulazione delle proteine. Se la soluzione viene neutralizzata, la proteina precipitata può ridissolversi. La fissazione con acido picrico produce colorazioni più intense, ma le soluzioni a pH basso possono causare idrolisi e perdita di acidi nucleici.

1.3.4 Fissativi a Legame Incrociato Non Coagulanti

Diversi composti chimici sono stati selezionati come fissativi per le loro potenziali azioni di formazione di legami incrociati all'interno e tra proteine e acidi nucleici, così come tra acidi nucleici e proteine. La formazione di legami incrociati potrebbe non essere un meccanismo principale nei tempi di fissazione brevi attualmente utilizzati, e pertanto i "fissativi a legame covalente" potrebbero essere un nome più appropriato per questo gruppo. Esempi includono formaldeide, glutaraldeide e altri aldeidi, come il cloruro di idrato e il glicosale, sali metallici come cloruro mercurico e cloruro di zinco, e altri composti metallici come il tetrossido di osmio. I gruppi aldeidici sono chimicamente e biologicamente reattivi e sono responsabili di molte reazioni istochimiche, ad esempio i gruppi aldeidici liberi possono essere responsabili di reazioni argentaffini.

1.4 Fissazione con Formaldeide

La formaldeide nella sua forma tamponata neutra al 10% (NBF) è il fissativo più comune utilizzato in patologia diagnostica. La formaldeide pura è un vapore che, quando completamente disciolto in acqua, forma una soluzione contenente il 37–40% di formaldeide; questa soluzione acquosa è conosciuta come "formalina". La "formalina al 10%" comunemente usata per la fissazione dei tessuti è una soluzione al 10% di formalina; cioè, contiene circa il 4% di peso rispetto al volume di formaldeide. Le reazioni della formaldeide con le macromolecole sono numerose e complesse. In una soluzione acquosa, la formaldeide forma idrato di metilene, un glicole metilenico come primo passo nella fissazione.



L'idrato di metilene reagisce con diverse catene laterali delle proteine, formando gruppi laterali idrossimetilici reattivi ($-\text{CH}_2-\text{OH}$). Se si utilizzano tempi di fissazione relativamente brevi con formalina tamponata neutra al 10% (da alcune ore a pochi giorni), la formazione dei gruppi laterali idrossimetilici è probabilmente la reazione primaria e caratteristica. La formazione

di legami incrociati è piuttosto rara nei tempi di fissazione relativamente brevi attualmente impiegati.

1.4.1 Reazioni della Formaldeide con Proteine Nucleari e Acidi Nucleici

La formaldeide reagisce anche con le proteine nucleari e gli acidi nucleici. Essa penetra tra gli acidi nucleici e le proteine, stabilizzando l'involucro proteico degli acidi nucleici, e modifica anche i nucleotidi reagendo con i gruppi amminici liberi, come avviene con le proteine. Nel DNA libero e non associato, si ritiene che le reazioni di cross-linking inizino in regioni ricche di adenina-timidina (AT), e l'intensità del cross-linking aumenta con l'aumento della temperatura. La formaldeide reagisce anche con i doppi legami C=C e con i legami -SH nei lipidi insaturi, ma non interagisce con i carboidrati.

1.4.2 Catene Laterali Più Reattive con la Formaldeide

Le catene laterali dei peptidi o delle proteine che sono maggiormente reattive con l'idrato di metilene, e che quindi hanno la maggiore affinità per la formaldeide, includono lisina, cisteina, istidina, arginina, tirosina e i gruppi ossidrilici reattivi di serina e treonina.

1.4.3 Reversibilità delle reazioni macromolecolari della formaldeide

I gruppi reattivi della formaldeide possono legarsi ai gruppi idrogeno o tra di loro, formando ponti metilenici. Se la formalina viene rimossa attraverso il lavaggio, i gruppi reattivi possono tornare rapidamente al loro stato originale, anche se i ponti già formati rimarranno intatti.

1.4.4 Effetto del lavaggio prolungato

Un lavaggio di 24 ore rimuove circa la metà dei gruppi reattivi, mentre un lavaggio di 4 settimane ne elimina fino al 90%. Questo suggerisce che la formazione dei ponti metilenici è un processo piuttosto lento. Nella fissazione rapida utilizzata in patologia diagnostica, la maggior parte della fissazione della formaldeide si arresta con la formazione di gruppi idrossimetilici reattivi.

1.4.5 Conservazione a lungo termine in formalina

Nel lungo periodo, i gruppi reattivi possono ossidarsi in forme più stabili (ad esempio, acidi come -NH-COOH) che non sono facilmente rimovibili con acqua o alcol. Pertanto, riportare un campione in acqua o alcol dopo la fissazione riduce ulteriormente la fissazione, poiché i gruppi reattivi possono invertire il processo e venire rimossi.

1.4.6 Importanza dei ponti metilenici

Si riteneva che i legami crociati fossero essenziali nella fissazione dei tessuti per scopi biologici, ma è probabile che la formazione di gruppi idrossimetilici denaturi effettivamente le macromolecole, rendendole insolubili. Poiché tali esperimenti non sono stati riprodotti, i meccanismi effettivi della fissazione con formaldeide rimangono incerti.

1.4.7 Correzione dell'iperfissazione

L'iperfissazione dei tessuti può essere parzialmente corretta immergendo il tessuto in ammoniaca concentrata e cloruro idrato al 20%. È stato infatti osservato che le reazioni di addizione e condensazione della formaldeide con amminoacidi e proteine sono instabili e possono essere facilmente invertite tramite diluizione o dialisi.

1.4.8 Tipi di legami crociati e loro stabilità

Il principale tipo di legame crociato a breve termine è quello tra un gruppo idrossimetilico su una catena laterale di lisina e arginina, asparagina, glutammina o tirosina. Ogni legame ha un diverso grado di stabilità, che può essere modificato da temperatura, pH e l'ambiente circostante il tessuto.

1.4.9 Saturazione dei tessuti con formalina

Il tempo necessario per saturare i tessuti umani e animali con gruppi reattivi tramite formalina è di circa 24 ore, ma la formazione di legami crociati può continuare per molte settimane.

1.4.10 Effetto dell'acidità nella formalina

Quando la formaldeide si dissolve in una soluzione acquosa non tamponata, si forma una soluzione acida (pH 5,0-5,5) a causa della presenza di acido formi-

co nella formaldeide commerciale. La formalina acida reagisce più lentamente con le proteine rispetto alla formalina tamponata neutra (NBF), poiché i gruppi amminici diventano caricati positivamente (ad esempio $-NH_3^+$). Tuttavia, la formalina acida preserva meglio il riconoscimento immunitario rispetto alla NBF.

1.4.11 Uso della formalina acida in immunoistochimica

Il successo iniziale di Taylor nell'immunoistochimica, nella dimostrazione di immunoglobuline in sezioni di tessuti trattati con paraffina, probabilmente si basava sulla fissazione dei tessuti in formalina acida. Tuttavia, l'uso della formalina acida provoca la formazione di un pigmento nero-marrone correlato all'emoglobina degradata, che può essere un problema nei pazienti con malattie del sangue.

1.4.12 Effetto della formaldeide su proteine, nucleotidi e lipidi

La formaldeide preserva principalmente i legami peptidici e la struttura generale degli organelli cellulari. Interagisce con gli acidi nucleici ma ha un effetto minimo sui carboidrati. I lipidi vengono conservati se le soluzioni contengono calcio.

1.5 Fattori che Influenzano la Qualità della Fissazione

1.5.1 Buffer e pH

L'effetto del pH sulla fissazione con formaldeide può essere significativo, a seconda delle applicazioni a cui saranno sottoposti i tessuti. In un ambiente fortemente acido, i gruppi amminici primari ($-NH_2$) attraggono ioni di idrogeno ($-NH_3^+$) diventando non reattivi con la formaldeide idratata, e i gruppi carbossilici ($-COO^-$) perdono le loro cariche. Ciò può influenzare la struttura delle proteine. Anche i gruppi idrossilici degli alcoli, come serina e treonina, possono diventare meno reattivi in ambienti acidi. La formazione di gruppi idrossimetilici reattivi e di legami incrociati è ridotta in formaldeide non tamponata al 4%, che è leggermente acida, poiché i principali legami si formano tra lisina e gruppi amminici liberi delle catene laterali. Alcuni autori hanno suggerito che la formalina non tamponata sia un fissativo migliore rispetto alla formalina tamponata neutra per il riconoscimento immunologico di molti

1.5. FATTORI CHE INFLUENZANO LA QUALITÀ DELLA FISSAZIONE¹⁹

antigeni, specialmente prima degli anni '90, quando i metodi di recupero degli epitopi tramite calore non erano ancora diffusi. Tuttavia, è essenziale evitare ritardi nella fissazione degli antigeni labili come i recettori degli estrogeni durante i test immunoistochimici per biomarcatori clinicamente importanti.

Mentre la formaldeide rimane il metodo raccomandato per preservare in modo ottimale le caratteristiche morfologiche, proteine e acidi nucleici in ambiente clinico, il modo più affidabile per ottenere una fissazione ottimale è tamponare la formalina a un pH tra 7,2 e 7,4. A pH acido, i prodotti metabolici dell'emoglobina vengono modificati chimicamente, formando un pigmento bruno-nero insolubile e birifrangente. Questo pigmento si forma a un pH inferiore a 5,7 e la sua formazione aumenta tra pH 3,0 e 5,0. Sebbene non influenzi solitamente la diagnosi, il pigmento può essere rimosso facilmente con una soluzione alcolica di acido picrico. Per evitare la formazione di pigmento da formalina, si preferisce usare la formalina tamponata neutra.

1.5.2 Durata della Fissazione e Dimensione dei Campioni

Fra i fattori che influenzano la diffusione del fissativo nei tessuti, si è dimostrato che la profondità raggiunta è proporzionale alla radice quadrata della durata della fissazione. Questo implica che la fissazione procede lentamente e che il tempo necessario per fissare completamente un campione dipende dalla sua dimensione. Ad esempio, un campione di 10 mm richiederà circa 25 ore per essere fissato completamente. Anche i componenti di un fissativo composto penetrano nei tessuti a velocità diverse, quindi questo effetto si manifesta maggiormente in campioni sottili.

Campioni non fissati devono essere tagliati e non devono superare lo spessore di 0,5 cm. La fissazione di campioni sottili in formalina tamponata neutra può essere completata in 5–6 ore, ma la formazione di legami incrociati in tempi così brevi rimane incerta, e la predominanza di gruppi idrossimetilici potrebbe influenzare l'uso di tecniche molecolari. Studi recenti hanno dimostrato che una fissazione troppo rapida può compromettere la conservazione di antigeni importanti, come il recettore degli estrogeni, nei campioni di tessuto mammario per test immunoistochimici. Per questo motivo, le linee guida raccomandano una fissazione minima di 6–8 ore per i campioni clinici di cancro al seno.

1.5.3 Temperatura della Fissazione

La diffusione delle molecole aumenta con l'aumento della temperatura, e quindi la fissazione con formaldeide avviene più rapidamente a temperature

più elevate. Le microonde sono state utilizzate per accelerare la fissazione con formaldeide aumentando sia la temperatura che il movimento molecolare, anche se questo comporta rischi per la sicurezza.

1.6 Riassunto

Di tutti i fissativi proposti, la formalina tamponata al 10% rimane la scelta migliore nella maggior parte delle circostanze. È economica, consente al tessuto di rimanere immerso per lunghi periodi senza deteriorarsi ed è compatibile con la maggior parte delle colorazioni speciali, incluse le tecniche immunoistochimiche, purché il tessuto venga posto nel fissativo entro 30 minuti dall'asportazione chirurgica ed evitando un'eccessiva fissazione (oltre 24-48 ore). La "formalina pura" è una soluzione concentrata al 40% di gas formaldeide in acqua. Una soluzione al 10% di formalina rappresenta quindi una soluzione al 4% di formaldeide, ovvero una soluzione 1.3 molare. Se la diluizione finale è mantenuta tra l'8% e il 12%, non si notano differenze significative. Tuttavia, se la concentrazione scende sotto il 5%, la qualità della preparazione ne risente. Ciò può accadere inavvertitamente, soprattutto in luoghi in cui la "formalina pura" viene adulterata con acqua. Rodriguez-Martinez e colleghi hanno sviluppato una formula semplice per verificare la diluizione finale del fissativo e correggerla, se necessario, misurando la densità specifica del liquido.

Contrariamente a quanto si crede, il restringimento dei tessuti durante la fissazione con formalina è minimo. Qualsiasi restringimento che si verifica è dovuto alle proprietà contrattili del campione, come dimostrato dal fatto che tende a verificarsi subito dopo l'escissione, prima della fissazione, ed è correlato alla quantità di tessuto contrattile presente. Un esempio evidente è lo strato muscolare esterno del tratto gastrointestinale. È stato calcolato che i segmenti del colon-retto si riducono del 57% della loro lunghezza in vivo. Gran parte di questo restringimento può essere evitato fissando il campione su una tavola di sughero prima della fissazione.

Il liquido di Zenker (che contiene cloruro mercurico) è un eccellente fissativo, tra i migliori mai sviluppati per la microscopia ottica, ma è costoso, richiede una gestione accurata dello smaltimento del mercurio e necessita di grande attenzione ai tempi di fissazione e alle procedure di lavaggio per rimuovere i precipitati di mercurio. Questo fissativo o il sublimato formalinato di acetato di sodio ('B-5') è spesso utilizzato per biopsie di rene, midollo osseo, linfonodi e testicolo. Il fissativo di Bouin (che contiene acido picrico) è stato raccomandato in particolare per le biopsie testicolari, ma il liquido di Zenker produce preparati quasi identici. Bouin, Zenker e B-5 sono eccel-

lenti fissativi per il lavoro di routine e per la maggior parte delle colorazioni immunoistochimiche, ma la conservazione degli acidi nucleici è molto scarsa.

Il fissativo di Carnoy è una miscela di etanolo, cloroformio e acido acetico glaciale. Mentre fissa i tessuti, dissolve la maggior parte dei grassi, proprietà utile per identificare i linfonodi in campioni di resezioni radicali.

Con l'introduzione di tecniche speciali nella diagnostica patologica, si sono cercati fissativi compatibili sia con la gestione routinaria che con l'applicazione delle tecniche specifiche. Quando la microscopia elettronica era di moda, fu proposto un "fissativo universale", composto da una miscela di paraformaldeide commerciale al 4% e glutaraldeide all'1% in tampone neutro. Con l'avvento delle tecniche immunoistochimiche, furono introdotti fissativi specifici per questo scopo. Attualmente, con l'interesse per le tecniche molecolari, si stanno facendo sforzi per sviluppare fissativi in grado di preservare il più possibile la quantità e l'integrità degli acidi nucleici presenti. Un esempio è il fissativo a base di etanolo al 70%, che, a differenza della formalina, non crea legami incrociati e provoca poche alterazioni chimiche al DNA, tranne un collasso reversibile. Un altro fissativo proposto è il methacam, una soluzione di Carnoy in cui il metanolo sostituisce l'etanolo. Mentre la ricerca del fissativo universale continua, l'approccio più sensato è quello di trattare il tessuto secondo le raccomandazioni specifiche per la tecnica utilizzata.

Quando si utilizza la formalina, il volume del fissativo deve essere almeno 10 volte quello del tessuto. Il contenitore dovrebbe avere un'apertura sufficientemente ampia da permettere la facile rimozione del tessuto una volta indurito dalla fissazione. Il fissativo dovrebbe circondare il campione su tutti i lati. I campioni grandi che galleggiano nel fissativo devono essere coperti da uno spesso strato di garza. Nel caso di campioni grandi, piatti e pesanti che riposano sul fondo del contenitore, la garza dovrebbe essere posta tra il fondo del contenitore e il campione.

La fissazione può essere eseguita a temperatura ambiente o, nel caso di campioni grandi, a 4°C. Il tessuto non dovrebbe essere congelato una volta immerso nella soluzione fissativa, poiché si formerebbero distorsioni dovute ai cristalli di ghiaccio.

Capitolo 2

Introduzione al campionamento

2.1 Introduzione

L'esame di un campione comprende sia l'analisi macroscopica che quella microscopica. Tra le due, quest'ultima è indubbiamente la più apprezzata, forse perché esteticamente più piacevole, priva di odori particolari e non richiede alcuno sforzo manuale se non lo spostamento del vetrino sotto il microscopio, mantenendolo a fuoco e cambiando gli obiettivi. Più piccolo è il campione, meno significativa appare l'analisi macroscopica. Alcuni la vedono solo come un passaggio tecnico, paragonabile alla preparazione dei tessuti. Alcuni colleghi hanno addirittura affermato che la patologia autoptica è patologia macroscopica, mentre la patologia chirurgica è istopatologia.

2.1.1 L'importanza dell'esame macroscopico

È spiacevole che questo atteggiamento sia così diffuso tra i patologi. Come ha affermato Chandler Smith nel suo saggio "In lode dell'esame macroscopico", è proprio l'aspetto macroscopico che rivela le dimensioni, la forma e la natura del processo, consentendo una comprensione sia strutturale che clinica. In alcuni campioni, come le valvole cardiache, un attento esame macroscopico e una descrizione accurata forniscono molte più informazioni rispetto a una sezione microscopica casuale. In molti casi, una dissezione macroscopica inadeguata può compromettere l'interpretazione microscopica.

2.1.2 La dissezione come fase cruciale

La dissezione, la descrizione macroscopica e la selezione delle sezioni per lo studio microscopico sono una parte cruciale dell'esame patologico. Se la descrizione microscopica è inadeguata, il vetrino può essere riesaminato

e il problema corretto. Tuttavia, se non vengono registrate le dimensioni del campione, non vengono prelevate sezioni chiave o non vengono eseguiti studi speciali durante l'esame macroscopico iniziale, c'è il rischio che queste informazioni vadano perse per sempre.

2.1.3 L'esperienza è fondamentale per campioni complessi

I campioni complessi richiedono esperienza e conoscenza per essere adeguatamente sezionati, descritti e campionati. Esiste una curiosa reticenza tra i medici in formazione e i giovani patologi nel consultare un membro senior del personale per il corretto trattamento di campioni macroscopici difficili, mentre lo stesso freno non si osserva quando devono affrontare una sezione microscopica complicata. Questo è un peccato, poiché a volte la difficoltà di interpretazione del vetrino deriva da un campionamento macroscopico inadeguato.

2.2 Dall'accettazione alla processazione

2.2.1 Posizione ideale del laboratorio

La disposizione ottimale prevede che il laboratorio di anatomia patologica sia in stretta prossimità della sala operatoria. I campioni, eccetto piccole biopsie, dovrebbero essere inviati al laboratorio in uno stato fresco e trasportati immediatamente dopo la resezione in un sacchetto di plastica senza contenitori rigidi o metallici. È importante evitare il contatto con liquidi che potrebbero compromettere la conservazione del campione. Se si prevede un ritardo nel trasporto al laboratorio, è consigliabile refrigerare il campione per rallentare il processo autolitico.

2.2.2 Trattamento delle biopsie

Le biopsie di piccole dimensioni, comprese biopsie endoscopiche, biopsie incisionale e microscopiche, devono essere immediatamente collocate nel fissativo scelto subito dopo essere state ottenute. Per i campioni di medie o grandi dimensioni che richiedono un trasporto più lungo, si è proposto un compromesso interessante: sigillare il campione in un sacchetto di plastica sotto vuoto. Tuttavia, questo metodo presenta il rischio che l'operatore creda erroneamente che il campione sia già in fase di fissazione, il che potrebbe non essere vero.

2.2.3 La preparazione e la dissezione dei campioni

La dissezione e la preparazione di un campione per l'analisi istologica e microscopica comprendono molto più che il semplice processamento del tessuto e il taglio delle sezioni. Anche se la dissezione e l'area di laboratorio sono spesso considerate gli elementi chiave del dipartimento, è essenziale comprendere che ci sono molti altri passaggi che seguono la ricezione del campione. Alcuni di questi sono specifici per la selezione e la manipolazione dei tessuti, mentre altri svolgono chiaramente un ruolo di supporto. È implicito, inoltre, che un buon laboratorio sia dotato di personale scientifico/medico adeguatamente formato e di personale di supporto, poiché interagiscono a più livelli con la gestione dei campioni patologici. Infatti, un dipartimento con personale insufficiente fornirà inevitabilmente prestazioni deboli, nella migliore delle ipotesi.

2.2.4 La stanza dell'accettazione

Un locale separato è necessario per la ricezione dei campioni, fungendo da interfaccia tra il personale ospedaliero (o altri visitatori) e il campionamento. Devono essere presenti piani di lavoro adeguati e una buona illuminazione, insieme a una buona ventilazione, attrezzature di sicurezza, disinfettanti, granuli assorbenti e indumenti protettivi. In caso di fuoriuscita di campioni, come liquidi corporei o perdite di fissativi, la risposta immediata del personale limiterà qualsiasi potenziale rischio per la salute e preverrà rischi per gli altri operatori di laboratorio.

2.2.5 L'accettazione del campione

Il punto centrale di questa stanza è ricevere i campioni in modo sicuro e protetto. Il campione deve essere identificato e gli deve essere assegnato un identificatore unico di laboratorio, generalmente un numero complesso. È obbligatorio confrontare il campione con il modulo di richiesta clinica e verificare i dettagli clinici appropriati. Dati corroborativi come il numero di registrazione ospedaliera, il codice fiscale del paziente, il nome completo, la data di nascita e l'indirizzo sono metodi validi per verificare l'identità di un campione. Se vi è qualche dubbio sull'integrità del campione, non dovrebbe essere inoltrato fino a quando il medico responsabile non abbia confermato i dettagli appropriati.

2.2.6 Regole per la verifica del campione

In molte situazioni è preferibile seguire la regola del "doppio controllo", con due operatori indipendenti che verificano i vari dettagli del campione in tutte le fasi dell'esame. È consigliabile confermare almeno tre identificatori univoci del campione. Una volta convalidato e identificato, il caso può essere trasferito alla sala di dissezione per l'esame, la descrizione del campione e la campionatura per blocchi.

2.2.7 Il numero istologico

Il metodo più comune di identificazione del campione è l'anno (spesso espresso con due cifre) con un sistema di numerazione sequenziale che parte da uno (1) e procede fino all'ultimo campione dell'anno. Questo sistema semplice permette di processare con facilità i campioni di patologia chirurgica e di correlare i blocchi di paraffina, le fotografie e altri test associati.

2.2.8 Valutazione iniziale dei campioni

I campioni ricevuti nel laboratorio devono essere esaminati non appena possibile, sulla base delle informazioni cliniche disponibili e delle caratteristiche macroscopiche. Questo permette di determinare se siano necessari ulteriori esami, come sezioni congelate o altri esami specifici oltre alla valutazione macroscopica e microscopica di routine.

2.2.9 Procedure speciali

Esistono diverse procedure speciali da applicare in base alle caratteristiche del campione:

- Colture batteriche, fungine e virali
- Microscopio elettronico
- Colorazioni istochimiche e immunoistochimiche
- Preparazioni citogenetiche
- Studi di genetica molecolare
- Fotografie convenzionali o digitali
- Inclusioni in resina plastica per sezioni sottili (1 μm)

2.3. CARATTERISTICHE GENERALI DELLA SALA MACROSCOPICA²⁷

- Radiografie
- Fissativi speciali (diversi dalla formalina di routine)
- Colture cellulari
- Necessità per la banca dei tumori

2.2.10 Ruolo dei *Pathologists' Assistants*

È estremamente utile disporre di un team di "assistenti del patologo" appositamente formati per eseguire gli aspetti tecnici di questi studi in modo coerente, sotto la direzione e supervisione del patologo. Questi assistenti dovrebbero essere competenti nella fotografia macroscopica, tecniche radiografiche, iniezione di campioni, taglio e colorazione per sezioni congelate e altre mansioni tecniche svolte nella sala macroscopica. La presenza di questi collaboratori consente non solo di liberare il patologo per altre attività, ma garantisce anche una coerenza nell'esecuzione dei test che altrimenti sarebbe difficile da ottenere.

2.2.11 La dissezione e il taglio del campione

La disposizione ideale della sala di dissezione varia tra i laboratori e le esigenze dei patologi. Esistono diverse soluzioni di design che si basano sui principi generali di un laboratorio di istologia. Tuttavia, è imperativo che l'area di dissezione abbia una buona illuminazione, ventilazione, superfici non assorbenti e facili da pulire, insieme a indumenti protettivi appropriati, guanti e altre attrezzature come macchine fotografiche, lavandini con tritarifiuti e contenitori per lo smaltimento dei rifiuti. La sala di dissezione dovrebbe essere un ambiente protetto che permetta al patologo e al personale tecnico di lavorare senza disturbi.

2.3 Caratteristiche Generali della Sala Macroscopica

Le dimensioni e le caratteristiche della sala macroscopica di patologia chirurgica dipendono dal numero di campioni, dal numero di patologi e medici in formazione, e dal tipo di istituzione. La sala descritta nei paragrafi seguenti è modellata su un grande laboratorio in un'istituzione accademica, ma molti dei requisiti si applicano anche ai laboratori di piccoli ospedali.

2.3.1 Dimensioni e Illuminazione

Prima di tutto, la sala dovrebbe essere abbastanza spaziosa da permettere a tutti i patologi assegnati alle attività macroscopiche di lavorare simultaneamente; deve essere ben illuminata e correttamente ventilata.



Figura 2.1: La postazione di campionamento. Sul tagliere spugnete inumidite con la formalina, ematossilina per marcare i piccoli campioni biotici, china per marcare i margini chirurgici, acido acetico (barattolo con pipetta) per mordenzare la china, righello, lame, bisturi e pinze per il campionamento. Il lavandino con rubinetto di acqua e formalina e doccino mobile per il lavaggio della cappa. A sinistra del tagliere il cestello dei blocchetti campionati immerso in adeguata quantità di formalina e un lettore di QRcode per il sistema di tracciabilità.

2.3.2 Stazioni di Lavoro

Ogni "stazione macroscopica" dovrebbe essere collocata sotto una cappa ben ventilata e contenere i seguenti elementi:

- Un tagliere possibilmente inclinato in modo che tutti i fluidi defluiscano direttamente nel lavandino.
- Mensole per i contenitori dei campioni.
- Accesso immediato a un lavandino con acqua calda e fredda.
- Accesso immediato alla formalina.

2.3. CARATTERISTICHE GENERALI DELLA SALA MACROSCOPICA²⁹

- Attrezzatura per una facile registrazione dell'esame macroscopico (sistemi di dettatura o computer).
- Scatola di strumenti, tra cui forbici grandi e piccole, pinze lisce (anatomiche) e dentellate (chirurgiche) di diverse dimensioni, una sonda (specillo) malleabile, un manico per bisturi, lame monouso, un coltello lungo, un righello e spille per fissare i campioni a una superficie di sughero.
- Scatola con cassette e etichette.

2.3.3 Postura durante la dissezione

Gli operatori in questa area possono scegliere di lavorare seduti o in piedi, a seconda delle preferenze. Idealmente, entrambe le opzioni dovrebbero essere disponibili. Le moderne aree di dissezione sono spesso dotate di scrivanie integrate, alimentazione chiusa di fluidi e fissativi e ventilazione a flusso laminare discendente per proteggere sia il dissezionatore che il personale di supporto dai vapori di formalina.

2.3.4 Strumenti di dissezione

Gli strumenti di dissezione devono essere ergonomicamente accessibili, e la sala deve essere dotata di un'adeguata illuminazione naturale e/o artificiale. I coltelli di grandi dimensioni sono utili per ottenere sezioni trasversali complete di organi come polmoni e fegato, mentre le lame più piccole sono ideali per rifinire i dettagli dei tessuti.

2.3.5 Conservazione e gestione dei campioni

Dopo la dissezione, i tessuti residui devono essere conservati in un'area di archiviazione ventilata e sicura, mentre i materiali di scarto devono essere smaltiti secondo le normative locali sulla salute e sicurezza. Inoltre, prima di fissare i campioni, potrebbe essere necessario riservare una parte del tessuto per l'analisi microbiologica o per altre indagini come la microscopia elettronica o la spettrometria di massa. Alcuni campioni richiedono decalcificazione infine richiedono ulteriori passaggi con soluzioni decalcificanti o cheratolitiche.

2.4 Principi Generali per l'Esame Macroscopico

2.4.1 Identificazione e Orientamento del Campione

È fondamentale che ogni campione sia correttamente identificato e orientato per un'adeguata valutazione patologica. Un campione senza etichetta non dovrebbe mai essere processato. Se il campione arriva in laboratorio senza identificazione, è necessario contattare il medico che ha effettuato la procedura, o in sua assenza, uno degli assistenti per identificare e etichettare correttamente il campione. Ogni campione deve essere accompagnato da un modulo di richiesta di anatomia patologica correttamente compilato, che includa l'identificazione del paziente, età, sesso, dati clinici essenziali, tipo di intervento, reperti chirurgici e il tessuto inviato. Se tali informazioni non sono disponibili, è obbligo del patologo, in quanto consulente medico, esaminare la cartella clinica o, se necessario, vedere il paziente di persona prima di formulare un'opinione.

2.4.2 Difficoltà nell'Orientamento del Campione

Se ci sono difficoltà nell'orientamento del campione, è necessario contattare il chirurgo per richiedere collaborazione nell'identificare la posizione, i punti di riferimento anatomici, i margini chirurgici e altre strutture rilevanti. È importante esaminare con cura tutto il materiale inviato, anche sotto la copertura del contenitore per evitare di perdere frammenti di tessuto.

2.4.3 Manipolazione del Campione

Il campione, specialmente se piccolo, deve essere manipolato su una tavola da taglio pulita utilizzando strumenti puliti. Il problema della contaminazione con frammenti di altri campioni (detto "floater" o metastasi da tagliere) rappresenta una delle principali catastrofi in un laboratorio patologico, poiché può portare a errori irreparabili.

2.4.4 Importanza della Conoscenza Anatomica del Patologo

Anche se il patologo non è un chirurgo o un anatomista, dovrebbe possedere una conoscenza di base dell'anatomia normale, dell'estensione della maggior parte degli interventi chirurgici e delle strutture che ci si aspetta di trovare

in una data procedura. La prima fase consiste nell'ispezionare il campione, identificando tutte le componenti normali e anormali. Il patologo dovrebbe quindi posizionare il campione in modo anatomico sulla tavola da taglio e registrare informazioni come tipo di campione, strutture incluse, dimensioni, peso, forma e colore.

2.4.5 Margini Chirurgici e Diagnosi Istologica

Nel caso di margini chirurgici coinvolti da tumori, è cruciale determinare dove si trovino tali margini. Questo richiede un lavoro meticoloso e talvolta noioso, ma è sempre gratificante per la precisione diagnostica. Prima di iniziare la dissezione del campione, si dovrebbe considerare la possibilità di fare fotografie macroscopiche per documentazione.

2.4.6 Dissezione del Campione Chirurgico

Durante la dissezione di un campione chirurgico possono presentarsi tre situazioni: (1) separazione dei componenti principali mentre il campione è fresco; (2) rimozione solo di alcune parti, come i linfonodi regionali, lasciando intatto il resto del campione; (3) fissazione dell'intero campione in un unico blocco. I campioni più grandi possono richiedere una fissazione più lunga in frigorifero per rallentare il processo autolitico, mentre quelli più piccoli possono essere fissati a temperatura ambiente.

2.4.7 Gestione di Campioni con Tessuti Molli e Ossa

I campioni contenenti sia tessuti molli che ossei devono essere gestiti in modo diverso, a seconda della patologia presente. Una tecnica consiste nel congelare l'intero campione fresco e preparare sezioni parallele con una sega a nastro. Un'altra tecnica prevede la dissezione accurata dell'osso, lasciando intatto il tessuto molle.

2.4.8 Conservazione delle Sezioni e Campioni

Dopo la dissezione, è consigliabile lasciare intatta una delle migliori sezioni per eventuali fotografie o dimostrazioni macroscopiche. Nessuna parte del campione dovrebbe essere smaltita prima che il caso sia chiuso. È preferibile conservare i tessuti per almeno un mese, ma in alcuni laboratori, lo spazio disponibile può limitare questa pratica.

2.4.9 Contaminazione dei Campioni

La contaminazione dei campioni, conosciuta come "floater", è uno dei problemi più gravi in un laboratorio patologico. Questo può accadere in qualsiasi fase del processo: in sala operatoria, durante la dissezione, l'inclusione in paraffina, la colorazione o il montaggio del vetrino. È essenziale adottare misure per minimizzare questo rischio, anche se non può essere completamente eliminato.

2.4.10 Errori di Etichettatura

Gli errori di etichettatura dei campioni sono un'altra causa importante, anche se rara, di errore medico. La maggior parte degli errori avviene durante la fase di grossing. L'adozione di tecnologie come i codici a barre o i chip a radiofrequenza può ridurre significativamente l'incidenza di tali errori.

2.4.11 Riassunto

L'esame di un campione patologico è un processo complesso che integra l'analisi macroscopica e quella microscopica. Mentre quest'ultima è spesso considerata la più affascinante e gratificante per la sua precisione, non si può sottovalutare l'importanza dell'analisi macroscopica, che offre informazioni cruciali sulla dimensione, la forma e la natura del processo patologico. In effetti, per alcuni campioni, come le valvole cardiache, una dettagliata osservazione macroscopica può rivelarsi molto più informativa rispetto a una semplice sezione microscopica. Un'analisi macroscopica accurata non solo arricchisce la comprensione del caso, ma può anche prevenire errori di interpretazione che potrebbero derivare da una dissezione inadeguata.

La fase di dissezione, insieme alla descrizione macroscopica e alla selezione delle sezioni per lo studio microscopico, riveste un ruolo cruciale nel percorso diagnostico. Se la descrizione macroscopica non viene eseguita con attenzione, si rischia di perdere informazioni vitali che non possono più essere recuperate in seguito. Questa consapevolezza è particolarmente importante quando si trattano campioni complessi, per i quali è fondamentale avere un'adeguata esperienza e conoscenza. Tuttavia, si osserva una certa riluttanza tra i medici in formazione nel cercare il supporto di membri più esperti del personale per l'analisi di campioni difficili, nonostante la stessa ansia non si presenti nel caso delle sezioni microscopiche. Questa situazione è disdicevole, poiché la difficoltà nell'interpretazione di un vetrino può derivare proprio da una fase di campionamento macroscopico insufficiente.

Per garantire un'analisi accurata, è fondamentale che il laboratorio di anatomia patologica sia situato vicino alla sala operatoria. Questo consente ai campioni di essere trasferiti rapidamente in uno stato fresco, riducendo il rischio di deterioramento. I campioni, tranne che per le piccole biopsie, dovrebbero essere portati in sacchetti di plastica per evitare contaminazioni. Nel caso di biopsie di piccole dimensioni, è essenziale immergerle immediatamente in un fissativo appropriato, mentre per campioni di dimensioni maggiori, è consigliabile sigillarli in sacchetti sotto vuoto per un trasporto sicuro, sebbene questo possa creare l'erronea impressione che il campione stia già fissandosi.

La preparazione di un campione per l'analisi istologica non si limita al semplice taglio delle sezioni; ci sono numerosi passaggi da seguire, e il laboratorio deve essere dotato di personale adeguatamente formato per gestire i campioni in modo efficace. La sala di accettazione, dove i campioni vengono ricevuti, deve essere un ambiente ben organizzato e attrezzato per garantire la sicurezza e l'integrità dei campioni stessi. Qui, ogni campione deve essere identificato con un codice unico e confrontato con la documentazione clinica per verificare la sua provenienza. È consigliabile seguire rigide procedure di controllo, coinvolgendo più operatori per garantire l'accuratezza dei dettagli del campione.

Non meno importante è la valutazione iniziale dei campioni, che deve essere effettuata rapidamente in base alle informazioni cliniche e alle osservazioni macroscopiche. Questo primo esame consente di decidere se sono necessari ulteriori studi, come le sezioni congelate o esami specializzati. Inoltre, esistono diverse procedure speciali che possono essere necessarie a seconda delle caratteristiche del campione, come colture batteriche o tecniche di microscopia elettronica. L'impiego di assistenti del patologo ben addestrati può rivelarsi estremamente vantaggioso, poiché possono gestire compiti tecnici sotto la supervisione del patologo, contribuendo a garantire la coerenza e la qualità dei risultati.

La sala di dissezione deve essere un ambiente ben illuminato e ventilato, equipaggiato con strumenti ergonomici e attrezzature di sicurezza. Le dimensioni della sala dovrebbero consentire il lavoro simultaneo di più patologi, con stazioni di lavoro ben attrezzate che includano lavandini, accesso ai fissativi e spazi per la registrazione dei dati. È essenziale che il personale mantenga una postura corretta durante la dissezione per evitare affaticamenti e infortuni.

Ogni campione deve essere manipolato con attenzione per evitare contaminazioni. Anche il più piccolo frammento può compromettere l'analisi, rendendo cruciale mantenere l'integrità del campione in ogni fase del processo. La conoscenza anatomica di base è fondamentale per i patologi, poiché consente di identificare correttamente le strutture e i tessuti durante l'es-

me macroscopico. È importante esaminare attentamente tutti i campioni, annotando le dimensioni, il colore e altre caratteristiche rilevanti.

Nella gestione dei campioni che includono tessuti molli e ossei, le tecniche di dissezione devono essere adattate alle specifiche necessità patologiche, e i campioni devono essere conservati in modo appropriato dopo la dissezione, evitando di smaltire alcuna parte prima di chiudere il caso. Infine, la riduzione al minimo della contaminazione e degli errori di etichettatura è fondamentale. L'implementazione di tecnologie moderne, come i codici a barre, può significativamente ridurre gli errori e migliorare l'affidabilità del processo diagnostico.

Capitolo 3

Campioni chirurgici

3.1 Introduzione ai pezzi chirurgici

I campioni chirurgici rispetto alle piccole biopsie e alle cuti spesso richiedono una descrizione macroscopica più elaborata e un campionamento selettivo, pertanto l'esame macroscopico ed il campionamento richiedono che siano chiari quali siano gli elementi necessari per la formulazione della diagnosi patologica.

3.1.1 La chirurgia elettiva

Un paziente generalmente va incontro a chirurgia in due situazioni principali. La prima riguarda le chirurgie elettive, ovvero quelle pianificate, in cui c'è una diagnosi o un sospetto diagnostico molto forte che giustifica l'intervento chirurgico. Questo tipo di intervento ha lo scopo di rimuovere un processo patologico, che può essere di natura neoplastica o infiammatoria. Nel caso della chirurgia elettiva, tutto è programmato: il paziente si sottopone all'intervento sulla base di un sospetto diagnostico o di una diagnosi istologica precedente.

3.1.2 La chirurgia non elettiva

La seconda situazione è la chirurgia non elettiva, ovvero un intervento d'urgenza. Questi casi si presentano in varie circostanze, come traumi o, più comunemente in anatomia patologica, perforazioni di visceri. Ad esempio, una perforazione intestinale può derivare dall'ingestione di materiale estraneo o da patologie infiammatorie. In questa categoria, i campioni più frequenti sono quelli derivanti da chirurgie generali, come le appendiciti acute, sebbene oggi si preferisca spesso il trattamento con antibiotici. Altri esempi possono

includere perforazioni intestinali o infarti intestinali causati da processi come l'intussuscezione, in cui un segmento dell'intestino si invagina su se stesso, fenomeno associato a masse della parete, soprattutto negli adulti.

3.1.3 Finalità del campionamento

Il campionamento dei pezzi operatori è finalizzato alla formulazione di una diagnosi. Per le patologie neoplastiche, la diagnosi non si limita all'identificazione del tipo di tumore, ma cerca anche di fornire informazioni utili ai vari specialisti che si occupano del paziente oncologico, come oncologi, radioterapisti e chirurghi. Questo approccio è particolarmente importante per identificare i cosiddetti parametri *prognostici* e *predittivi*.¹ Per quanto riguarda i campioni di chirurgia non elettiva, l'obiettivo è capire il motivo dell'evento acuto o emergente che ha richiesto l'intervento. Anche qui, il fine è quello di formulare una diagnosi precisa. Questo è il motivo per cui il campione viene inviato in anatomia patologica: fornire una risposta che possa guidare la gestione clinica successiva.

3.1.4 Apertura del pezzo chirurgico

I campioni chirurgici, rispetto ai campioni bioptici o di piccole dimensioni, richiedono una cura particolare, soprattutto se il campionamento non viene eseguito tempestivamente dopo il prelievo. In questi casi, il rischio principale è l'autolisi o la sovrainfezione da muffe e batteri presenti sul campione. Per evitare tali complicazioni, si effettua l'apertura del pezzo. Il primo passo, quando il campione arriva in anatomia patologica, consiste nel sezionare il pezzo (se composto da parenchimi) o nell'aprire eventuali cavità, per permettere la penetrazione uniforme della formalina in tutto il campione. La formalina ha la funzione di bloccare tutti i processi biologici, sia quelli interni al campione che quelli derivanti da contaminazioni esterne. Questo procedimento è essenziale per garantire una fissazione omogenea, il che a sua volta assicura una buona immunoreattività del campione, come discusso nel capitolo dedicato alla fissazione.

¹I parametri *prognostici* forniscono informazioni sul probabile decorso della malattia, indipendentemente dal trattamento. In altre parole, aiutano a prevedere come si comporterà la patologia nel tempo. I parametri *predittivi*, invece, indicano la probabile risposta a un determinato trattamento, aiutando a scegliere la terapia più efficace.

3.1.5 Orientamento del pezzo chirurgico

Infine, oltre alla sfida del campionamento e della selezione del materiale che sarà processato per ottenere i vetrini, i campioni chirurgici pongono un ulteriore problema: l'orientamento del pezzo anatomico. Ma cosa significa orientare un pezzo chirurgico? Orientare un pezzo chirurgico significa documentare la sua disposizione tridimensionale e identificare con precisione la localizzazione delle strutture anatomiche importanti, come i margini di resezione. Questo passaggio è fondamentale poiché permette di fornire informazioni corrette su eventuali infiltrazioni neoplastiche e su altre caratteristiche rilevanti per la diagnosi e la stadiazione del tumore. Nel prossimo paragrafo vedremo come il campionamento debba tenere conto di questi aspetti per garantire una corretta interpretazione dei risultati da parte del patologo.

3.2 Distinzione fra pezzi neoplastici e non neoplastici

3.2.1 Cos'è una neoplasia

Il termine *neoplasia* deriva dal greco, con il prefisso *neo-* che significa "nuovo" e *plazo* che significa "crescere". Analogamente, in latino, il termine *tumor* si riferisce a un "gonfiore". Entrambi i termini, nel loro significato originario, indicano un processo di crescita anomala che non fa parte della normale anatomia. In epoca moderna, il termine *neoplasia* è usato per indicare un processo cellulare caratterizzato da una proliferazione di cellule anomale che crescono in maniera incontrollata. La neoplasia rappresenta quindi una crescita cellulare fuori dal controllo dei normali meccanismi di omeostasi cellulare.²

3.2.2 Caratteristiche delle neoplasie

Le malattie neoplastiche si presentano, dal punto di vista macroscopico, come masse o crescite anomale all'interno di un tessuto. Per identificare una neoplasia, è necessario avere una profonda conoscenza dell'anatomia normale, poiché l'aspetto macroscopico del campione patologico si confronta sempre con ciò che è considerato normale. Le neoplasie possono manifestarsi in

²In passato, il termine *tumore* era utilizzato per indicare qualsiasi gonfiore anomalo, mentre oggi si riferisce esclusivamente alla proliferazione clonale di cellule mutate, che hanno perso il controllo della crescita. Questo concetto è cruciale per comprendere le malattie neoplastiche.

modi diversi: all'interno dei parenchimi come masse che crescono in modo espansivo nelle tre dimensioni, oppure negli organi cavi come una crescita superficiale che si espande progressivamente verso strati più profondi con l'aggressività della neoplasia. Durante il campionamento, è essenziale prestare attenzione anche alle piccole masse, spesso non evidenziate dal chirurgo, poiché in anatomia patologica si ha la responsabilità finale di fornire una diagnosi definitiva.

3.2.3 Sierosite

Le patologie infiammatorie e non neoplastiche si distinguono macroscopicamente da quelle neoplastiche per alcuni aspetti caratteristici. Uno dei segni principali dell'infiammazione è l'opacizzazione delle sierose. Questo fenomeno è spesso osservato in patologie come l'appendicite o le malattie infiammatorie croniche intestinali. Le sierose, come il peritoneo, che normalmente sono lucide, diventano opache e possono essere ricoperte da un induito fibrinoso, ovvero un sottile strato biancastro di fibrina.

3.2.4 Infiammazione

In anatomia patologica, la descrizione macroscopica dell'infiammazione segue i criteri classici di Virchow: *tumor* (gonfiore), *rubor* (rossore), *calor* (calore), *dolor* (dolore) e *functio laesa* (alterazione della funzione). Sebbene non siano tutti apprezzabili macroscopicamente gonfiore (*tumor*) e arrossamento (*rubor*) sono visibili e utilizzati per identificare processi infiammatori. Ad esempio, in un caso di appendicite acuta, l'appendice appare edematosa, rigonfia e arrossata, e può presentare materiale purulento (raccolta di pus). Questo materiale purulento corrisponde, al microscopio, a un infiltrato di neutrofili e tessuto di granulazione. Quando si verificano raccolte più significative di pus, si può parlare di ascessi.

3.2.5 Fibrosi e granulomi

Un altro segno caratteristico di patologie non neoplastiche è la presenza di fibrosi, che distorce l'anatomia normale e può rendere difficile distinguere queste lesioni da masse neoplastiche. Un altro processo che spesso entra in diagnosi differenziale (ovvero si può confondere) con una lesione neoplastica è rappresentato dalle infezioni croniche sostenute da micobatteri o funghi, che possono causare la formazione di granulomi. Queste lesioni possono creare difficoltà diagnostiche, tanto che noduli polmonari non diagnosticati durante

biopsie spesso possono essere analizzati in estemporanea dove viene fatta diagnosi di flogosi granulomatosa gigantomacellulare con necrosi caseosa (il quadro morfologico della tubercolosi).

3.2.6 Campionamento dell'alterazione macroscopica

In conclusione, i pezzi neoplastici e non neoplastici spesso si distinguono chiaramente dal punto di vista macroscopico. Le neoplasie si presentano come crescite anomale e disorganizzate, spesso di natura espansiva o infiltrativa, mentre le patologie infiammatorie non neoplastiche sono caratterizzate da segni di infiammazione, fibrosi e talvolta raccolte di materiale purulento. La corretta identificazione di questi elementi macroscopici è fondamentale per identificare quali campioni scegliere per la microscopia, e in generale vale la regola in patologia chirurgica che tutte le alterazioni macroscopiche vanno confermate istologicamente.

3.3 Campioni neoplastici

3.3.1 Impatto della diagnosi patologica

La descrizione macroscopica dei campioni neoplastici è cruciale per comprendere la natura e l'estensione del processo patologico. Il referto anatomopatologico rappresenta il documento su cui si basa la gestione futura del paziente oncologico, sia che si tratti di una diagnosi iniziale, sia di una recidiva o di una metastasectomia. Le decisioni cliniche e terapeutiche dipendono strettamente dalle informazioni fornite nel referto.

Istotipo e Grado

Il referto anatomopatologico di un pezzo chirurgico è fondamentale nella gestione del paziente oncologico. Esso fornisce una diagnosi definitiva, indicando l'istotipo del tumore e stabilendo il grado di aggressività sulla base di parametri biologici. In particolare, il grado di un tumore descrive quanto esso perde somiglianza rispetto al tessuto di origine.

Ogni tipo di tumore ha il suo sistema di gradazione. Ecco alcuni esempi:

- **Carcinoma spinocellulare:** Il sistema di *Broder* valuta quanto il tumore si differenzia dall'epitelio spinocellulare normale.
- **Carcinoma mammario:** Il grading di *Elston-Ellis* si basa sulla formazione di dotti, il numero di mitosi e il pleomorfismo.

- **Carcinoma della prostata:** Il sistema di *Gleason* valuta l'architettura delle cellule neoplastiche all'interno della prostata.
- **Carcinoma del polmone:** Il carcinoma spinocellulare del polmone segue il grading di Broder, mentre l'adenocarcinoma polmonare (che oggi rappresenta l'istotipo più frequente) varia in base al sottotipo istologico: i tumori con crescita lepidica sono di grado 1, con crescita acinare o papillare sono di grado 2, mentre quelli con crescita solida o micropapillare sono di grado 3.

3.3.2 Valutazione dei margini chirurgici

Un elemento fondamentale del referto è la valutazione dei margini chirurgici, che indicano la fine del pezzo anatomico e l'inizio del tessuto sano. I margini possono essere campionati in modi diversi (Figura 3.1):

- **Margini campionati con inchiostro:** L'inchiostro di china viene applicato per evidenziare il margine anatomico. Se il tumore si trova su questa linea colorata, il margine è considerato positivo (*tumor on ink*).
- **Margini campionati *en face*:** Per organi cavi, il margine viene incluso sul versante che rappresenta il margine anatomico. In questo caso, se vi è tumore sul margine *en face*, il margine è coinvolto.

La valutazione dei margini varia a seconda del tipo di tumore. Ad esempio, nel tumore della prostata, la presenza di tumore sulla china indica un margine positivo. In altri casi, una semplice vicinanza del tumore al margine può bastare per stabilire una non radicalità oncologica.

Il sistema di radicalità chirurgica prevede tre livelli:

- **R0:** Radicalità microscopica, ovvero assenza di tumore sui margini.
- **R1:** Positività microscopica del margine.
- **R2:** Positività macroscopica, indicante che il chirurgo non è riuscito a ottenere una radicalità chirurgica completa.

3.3.3 Stadiazione TNM

La stadiazione è un altro aspetto critico della valutazione anatomopatologica. Il sistema più utilizzato è il *TNM*, adottato da organizzazioni internazionali come l'UICC (Unione Internazionale Contro il Cancro) e l'AJCC (American Joint Committee on Cancer). Il sistema valuta tre parametri:

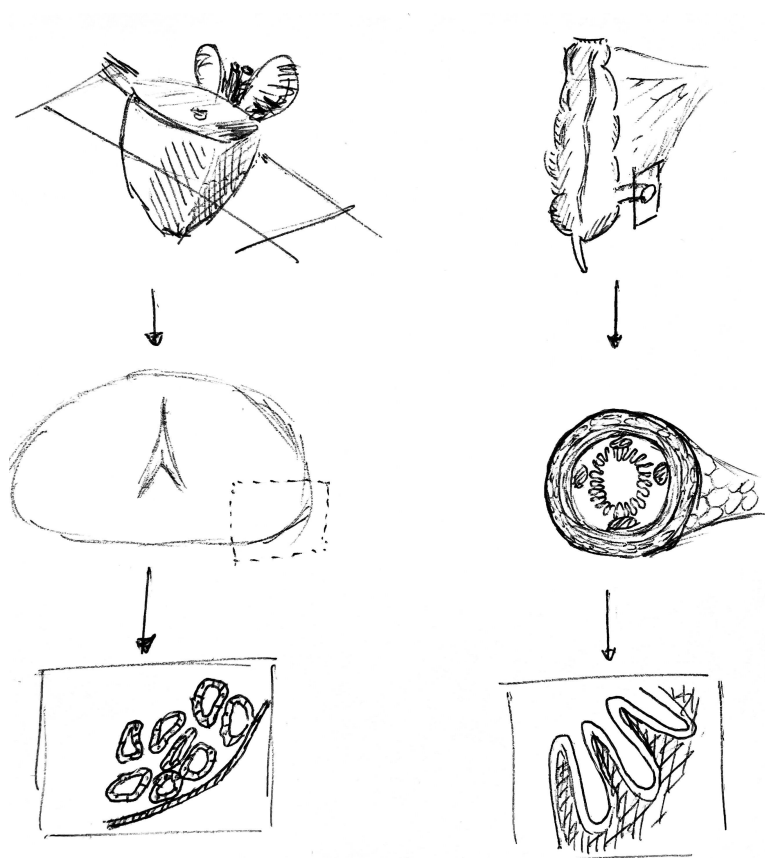


Figura 3.1: Il campionamento margini

- **T:** Dimensioni e estensione del tumore primitivo.
- **N:** Coinvolgimento dei linfonodi (nodes).
- **M:** Presenza di metastasi a distanza.

Il patologo è responsabile della stadiazione patologica ($pTNM$), che si differenzia dalla stadiazione clinica ($cTNM$) utilizzata per la diagnosi pre-operatoria. Ogni neoplasia ha un suo sistema di stadiazione TNM. Di seguito, riportiamo una tabella comparativa del sistema TNM per il tumore della mammella e per il tumore del colon:

Stadio	TNM Mammella	TNM Colon
T1	Tumore <2 cm	Tumore invade la sottomucosa
T2	Tumore 2-5 cm	Tumore invade la muscolare propria
T3	Tumore >5 cm	Tumore invade la sierosa
N1	1-3 linfonodi coinvolti	1-3 linfonodi regionali coinvolti
N2	4-9 linfonodi coinvolti	4-6 linfonodi regionali coinvolti
M1	Metastasi a distanza presenti	Metastasi a distanza presenti

Tabella 3.1: Confronto tra il sistema TNM della mammella e del colon

3.3.4 Importanza del campionamento nella patologie neoplastiche

Il referto anatomopatologico e la descrizione macroscopica sono essenziali per la diagnosi, la valutazione dei margini e la stadiazione di ogni tumore. Questi elementi determinano il trattamento e la gestione clinica del paziente oncologico, influenzando direttamente il successo terapeutico.

3.4 Tumore della mammella

Le resezioni di mammella per carcinoma rappresentano uno dei campioni chirurgici più frequenti in anatomia patologica, riflettendo la sua alta incidenza nell'epidemiologia oncologica. I campioni derivanti da interventi chirurgici possono essere di diversi tipi, inclusi quadrantectomie, nodulectomie, mastectomie radicali o mastectomie sottocutanee con risparmio del capezzolo. Ogni procedura ha lo scopo di rimuovere il tessuto mammario contenente la neoplasia, che nella maggior parte dei casi è un carcinoma. Gli istotipi più prevalenti sono il *carcinoma istotipo non speciale* e il *carcinoma lobulare*.

Questi due istotipi sono importanti perché la presentazione macroscopica e le modalità di campionamento possono variare significativamente.

Strategie di campionamento

Per una corretta valutazione, è essenziale applicare le corrette strategie di campionamento, che variano a seconda del tipo di intervento chirurgico e delle dimensioni del tumore.

Quadrantectomia Le quadrantectomie sono solitamente eseguite per tumori di piccole dimensioni, spesso inferiori a 2 cm. Il chirurgo orienta il pezzo tramite fili di reperi e, in alcuni casi, include la cute per aiutare l'anatomopatologo a identificare i margini. Questo tipo di campione viene frequentemente inviato per esame intraoperatorio, con l'obiettivo di valutare la distanza del tumore dai margini chirurgici (Figura 3.2).

Il campionamento macroscopico avviene dopo la marcatura della superficie esterna del campione con inchiostro di china. Successivamente, il quadrante viene sezionato con tagli sottili, generalmente con uno spessore massimo di 5 mm, per permettere una chiara identificazione anche di piccoli noduli. Spessori superiori potrebbero impedire l'identificazione di neoplasie più piccole, compromettendo la diagnosi.

Mastectomia Le mastectomie, eseguite per tumori di dimensioni maggiori o per indicazioni oncologiche specifiche, richiedono una strategia di campionamento più estesa. Il piano profondo del campione viene marcato con china e il pezzo viene orientato, identificando in quali quadranti si trovano le neoplasie. Anche in questo caso, il tessuto viene sezionato ogni 5 mm per garantire l'identificazione di eventuali masse tumorali nascoste.

Quando sono presenti più neoplasie, è essenziale campionare accuratamente il tessuto interposto tra i vari tumori per determinare se queste lesioni sono indipendenti o connesse tra loro. Due masse macroscopicamente separate potrebbero risultare parte della stessa neoplasia quando osservate al microscopio. Pertanto, è importante misurare le dimensioni di ciascun tumore e della massa complessiva nel caso di una singola neoplasia con tessuto interposto coinvolto.

Misurazione dei margini chirurgici

Uno degli obiettivi principali dell'esame macroscopico è determinare la distanza tra la neoplasia e i margini chirurgici, elemento fondamentale per la valutazione della radicalità dell'intervento. Nel caso di una quadrantectomia, il margine può essere valutato sia macroscopicamente che intraoperatoriamente, mentre nelle mastectomie l'intero tessuto asportato viene campionato per garantire un'adeguata valutazione dei margini.

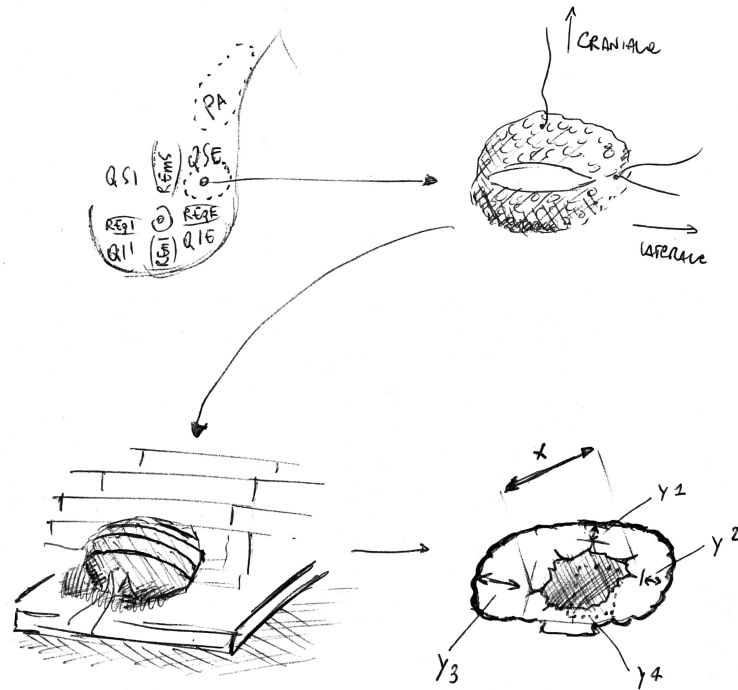


Figura 3.2: Il campionamento della quadrantectomia. La mammella (figura in alto a sinistra) viene divisa in quattro quadranti: supero esterno (QSE), infero esterno (QIE), infero interno (QII) e supero interno (QSI); inoltre si identificano le regioni equatoriale esterna (REqE) ed interna (REqI) ed emelica superiore (REmS) ed inferiore (REmI); ed infine il prolungamento ascellare (PA) e la regione retroareolare. Oggi la quadrantectomia è spesso una nodulectomia che rimuove solo parte del quadrante e arriva in anatomia patologica orientata da fili di repere (figura in alto a destra) che permettono al patologo di poter ricostruire la distanza dei margini dalla neoplasia. Il campione viene chinato e sezionato con delle sezioni di 4-5 mm di spessore (figura in basso a sinistra) e macroscopicamente si misurano (figura in basso a destra) il diametro massimo del tumore (x) e la distanza da tutti margini (y).

Fattori prognostici e predittivi

Nel tumore della mammella, oltre alla dimensione e alla diffusione del tumore, il referto anatomopatologico deve includere i cosiddetti fattori prognostico-predittivi. Questi comprendono:

- Il recettore per l'estrogeno (ER)
- Il recettore per il progesterone (PR)
- L'*HER2/neu*
- Il *Ki-67*, un marker di proliferazione cellulare.

Queste analisi vengono eseguite sul campione operatorio e sono cruciali per determinare il trattamento successivo, inclusa l'idoneità a terapie ormonali o mirate. Il campione prelevato al banco deve includere l'interfaccia tra il tumore e il tessuto mammario normale, per permettere un controllo interno adeguato delle reazioni immunoistochimiche.

Conclusione

La gestione dei campioni chirurgici del tumore della mammella richiede una meticolosa attenzione alla tecnica di campionamento e alla misurazione dei margini chirurgici. Un campionamento appropriato garantisce non solo una diagnosi accurata, ma fornisce anche le informazioni necessarie per la stadiazione del tumore e la determinazione dei fattori prognostici e predittivi essenziali per la gestione clinica del paziente.

3.5 Tumore del polmone

Il tumore del polmone, rispetto ad altre neoplasie cosiddette *Big Killers*, tende a presentarsi in stadi più avanzati e presenta delle peculiarità per quanto riguarda la stadiazione e il campionamento anatomopatologico. L'istotipo più frequente è l'adenocarcinoma, seguito dal carcinoma spinocellulare e, più raramente, dal carcinoma a piccole cellule.

Caratteristiche istologiche e distribuzione

L'adenocarcinoma del polmone si localizza prevalentemente nelle porzioni periferiche del parenchima polmonare, spesso in prossimità della pleura. Questa caratteristica rende frequente l'infiltrazione pleurica, un parametro cruciale per la stadiazione del tumore polmonare. Il carcinoma spinocellulare e il

carcinoma a piccole cellule, invece, tendono a svilupparsi in sede centrale, spesso lungo l'albero bronchiale principale. In particolare, il carcinoma spinocellulare può causare occlusione bronchiale, determinando un'atelettasia del tessuto polmonare distale³. Anche questa condizione è rilevante per la stadiazione, così come la presenza di infiltrazione linfonodale, frequente nei tumori centrali.

Approccio al campione chirurgico

Il campione chirurgico può derivare da una *resezione polmonare tipica* (lobectomia) o da una pneumonectomia. In generale, tali resezioni sono eseguite per adenocarcinomi e altre neoplasie polmonari. Nelle resezioni polmonari tipiche, si seziona la neoplasia insieme al tessuto circostante per garantire una corretta valutazione. Prima di sezionare il pezzo, si rimuove il margine chirurgico, spesso rappresentato da una suturatrice meccanica (*stapler*), che utilizza graffette metalliche per chiudere il tessuto. Le graffette vengono rimosse, ma il vero margine chirurgico sarà valutato solo se il margine parenchimale risulta positivo.

Il campione viene quindi sezionato in fette sottili, e si cerca il tumore, caratterizzato da una consistenza più dura rispetto al parenchima polmonare circostante, che risulta morbido. Un campionamento abbondante è raccomandato, con un prelievo per ogni centimetro di neoplasia, in quanto il grado istologico del tumore è un parametro cruciale. Vengono inoltre campionate le aree macroscopicamente disomogenee e le eventuali interazioni con la pleura.

Campionamento dell'albero bronchiale

Nelle resezioni lobari e nelle pneumonectomie, si campiona anche il margine dell'albero bronchiale. Dopo l'apertura del bronco con delle forbici, si cercano linfonodi lungo le diramazioni bronchiali, i quali sono rilevanti per la stadiazione linfonodale.

Carcinoma spinocellulare Nel carcinoma spinocellulare, che origina dall'epitelio bronchiale, è essenziale campionare accuratamente il bronco per dimostrare l'infiltrazione tumorale. È importante misurare la distanza del tumore dal margine bronchiale per valutare la radicalità chirurgica.

³L'atelettasia è il collasso parziale o totale del tessuto polmonare, che può avvenire a causa dell'ostruzione di un bronco da parte di un tumore o di un altro fattore.

Valutazione dei linfonodi

Il patologo deve campionare accuratamente i linfonodi sia in prossimità del tumore (N1) che nei livelli linfonodali più centrali (N2). I linfonodi inviati dal chirurgo durante l'intervento sono generalmente indicatori di uno stadio linfonodale avanzato (N2 o superiore), mentre i linfonodi recuperati direttamente dal campione chirurgico appartengono solitamente al livello N1.

Conclusione

La gestione dei campioni chirurgici del tumore del polmone richiede una valutazione meticolosa per determinare la presenza di infiltrazione pleurica, la distanza dai margini bronchiali e la stadiazione linfonodale. Questi parametri influenzano significativamente la prognosi e la scelta terapeutica per il paziente affetto da tumore polmonare.

3.6 Tumore del colon

Il tumore del colon presenta due tipologie di resezioni chirurgiche più frequenti: la *emicolectomia destra* e la *resezione sigma-rettale*, che può essere più o meno estesa, comprendendo anche il retto. In quest'ultimo caso, si parla di *resezione anteriore* del retto.

Il carcinoma del colon-retto è un *adenocarcinoma* che origina dall'epitelio ghiandolare del rivestimento colico e che progressivamente invade i vari strati della parete del viscere: mucosa, sottomucosa, muscolare propria e tessuto adiposo fino alla tonaca sierosa, che rappresenta lo stadio più avanzato.

Resezione anteriore del retto

Nel caso della resezione anteriore del retto, particolare attenzione va posta alla qualità della resezione chirurgica, poiché il retto non è una struttura peritonizzata e non presenta quindi una superficie sierosa che limiti l'espansione tumorale. La continuità della superficie di resezione è un parametro cruciale per valutare la radicalità chirurgica. Se la superficie risulta discontinua, si parla di *resezione non radicale*, con implicazioni importanti sulla prognosi del paziente.

Campionamento del pezzo chirurgico

I campioni chirurgici del colon, soprattutto nel caso di neoplasie del retto, possono derivare da interventi eseguiti dopo terapia neoadiuvante. In questi

casi, il tumore può risultare difficile da valutare a causa di modificazioni indotte dalla terapia stessa. Un campionamento esteso è raccomandato.

Il carcinoma può presentarsi sotto diverse forme macroscopiche:

- *Polipoidale o sessile*: la neoplasia si proietta nel lume intestinale.
- *Piatta*: la neoplasia non si proietta nel lume e può infiltrare la parete senza alterare significativamente la sua superficie.
- *Ulcerata*: con formazione di una perdita di sostanza nella parete del viscere.

Il campionamento del pezzo consiste nel sezionare il colon e identificare il punto di massima infiltrazione tumorale, campionando la sezione con la maggiore invasione degli strati della parete intestinale, soprattutto a livello della muscolare propria.

Analogamente al tumore della mammella, spesso viene eseguita la valutazione delle proteine del *mismatch repair* (MMR)⁴.

È necessario che il campione contenga un'interfaccia tra il tessuto tumorale e quello sano per permettere la corretta esecuzione delle analisi molecolari, incluse quelle per l'instabilità dei microsatelliti.

Margini chirurgici e linfonodi

Nel tumore del colon, si prelevano solitamente tre campioni per l'analisi istologica dell'adenocarcinoma, con particolare attenzione ai margini chirurgici. Il tessuto adiacente ai margini viene campionato per valutare la distanza del tumore dai margini, essenziale per giudicare la radicalità dell'intervento. Qualora il margine tumorale sia molto vicino, potrebbe essere necessaria un'ulteriore considerazione clinica.

Campionamento dei linfonodi L'identificazione dei linfonodi nei pezzi di resezione del colon può risultare impegnativa a causa della presenza del tessuto adiposo circostante. Per facilitare il processo, si può procedere con il campionamento sia sul tessuto fresco che su quello fissato, eventualmente utilizzando il fissativo di Carnoy, che aiuta a rimuovere parte del grasso e a evidenziare meglio i linfonodi.

⁴Le proteine del *mismatch repair* (MMR) sono coinvolte nella riparazione degli errori di appaiamento del DNA. L'assenza di queste proteine causa instabilità microsatellitare (MSI), un'alterazione molecolare presente in una quota di carcinomi del colon-retto, associata a una migliore prognosi e alla risposta alla terapia con inibitori del checkpoint immunitario.

La procedura di campionamento inizia dal margine vascolare, dove il chirurgo ha sezionato i principali vasi del viscere. Si eseguono sezioni seriate di qualche millimetro e si identificano tutte le strutture tondeggianti macroscopicamente visibili. Le strutture tondeggianti che non appaiono continue su più sezioni sono probabilmente linfonodi. Al contrario, quelle che appaiono continue su più sezioni sono solitamente vasi.

Quando si campiona una struttura tondeggianti che appare su due sezioni, è importante ricordare di segnalare che si tratta di due metà della stessa struttura. Questo evita errori nella valutazione del numero di linfonodi, che potrebbero influenzare la stadiazione del tumore e, conseguentemente, la terapia del paziente.

Conclusione

Il campionamento del tumore del colon richiede una valutazione accurata della neoplasia e dei linfonodi per stabilire la corretta stadiazione. La qualità della resezione e l'analisi dei margini chirurgici sono fondamentali per determinare la radicalità dell'intervento e influenzano significativamente la gestione clinica del paziente.

3.7 Tumore della prostata

Il tumore della prostata è il tumore più frequente nel sesso maschile, ma generalmente è meno aggressivo rispetto ad altri tipi di neoplasie, come il tumore al polmone. Con il passare del tempo, il trattamento del carcinoma prostatico è diventato sempre più conservativo. Per alcune categorie di pazienti, si adotta un approccio definito *sorveglianza attiva*, in cui il paziente viene monitorato senza ricorrere immediatamente all'intervento chirurgico, quando non vi è un'alta probabilità di progressione.

3.7.1 Incidenza e anatomia

L'incidenza del carcinoma prostatico aumenta con l'età e si stima che circa il 30% degli uomini oltre i 90 anni sviluppino questa neoplasia. Dal punto di vista anatomico, la prostata è una ghiandola situata tra la vescica e la base del pene, attraversata dall'uretra prostatica, che connette la vescica con l'uretra peniena. Posteriormente, la prostata è adiacente al fascio vasculonervoso, un'importante struttura implicata nella funzione erettile e nella continenza urinaria. La prostatectomia, l'intervento chirurgico di scelta per

molti pazienti, può causare perdita di potenza sessuale e incontinenza urinaria. Negli anni, si sono sviluppate tecniche chirurgiche sempre più precise, volte a preservare il fascio vasculonervoso e a minimizzare le complicanze.

3.7.2 Descrizione macroscopica della prostata

La prostata è spesso descritta come una *castagna*, con una base rivolta cranialmente verso la vescica e un apice posizionato in direzione caudale. Essa presenta un piano anteriore e un piano posteriore, così come una suddivisione laterale che i chirurghi chiamano "lobi", anche se dal punto di vista anatomico non sono veri e propri lobi. La prostata è inoltre in continuità con le vescicole seminali e i dotti deferenti.

3.7.3 Campionamento della prostata

Il campionamento della prostata per l'esame istologico è sempre eseguito in *totum*. Questo perché, sebbene il tumore prostatico sia a volte riconoscibile macroscopicamente, non è possibile determinare con precisione la sua estensione microscopica basandosi solo sull'aspetto macroscopico. A differenza di altri tumori, come quello della mammella o del colon, il carcinoma prostatico non presenta una consistenza macroscopica nettamente diversa rispetto al tessuto circostante.

Campionamento seriate L'intera prostata viene sezionata in fette seriate, come se fosse un *pancarré*, in modo da garantire una valutazione completa di tutti i margini chirurgici e dell'estensione tumorale. Le sezioni dell'apice e della base vengono campionate in modo perpendicolare rispetto alle altre sezioni per assicurare una valutazione accurata di queste zone critiche.

Stadiazione e prognosi La stadiazione del carcinoma prostatico si basa su diversi fattori:

- Se il tumore è monolaterale o bilaterale.
- Il volume del tumore presente nella ghiandola.
- L'estensione microscopica del tumore, che può essere limitata alla prostata, estendersi oltre di essa o coinvolgere le vescicole seminali e altre strutture adiacenti.

Un altro aspetto critico nella prognosi del carcinoma prostatico è il *grado* del tumore. Questo viene determinato valutando l'architettura ghiandolare

neoplastica con un sistema di punteggi, come il *Gleason score*. Si assegnano due punteggi: uno al pattern più frequente e uno al secondo pattern più rappresentato. Questo sistema di grading aiuta a predire l'aggressività del tumore e la sua potenziale evoluzione.

In conclusione, il campionamento della prostata è un processo completo e meticoloso, necessario per una corretta valutazione della stadiazione, dei margini chirurgici e del grado di differenziazione del carcinoma, tutti fattori determinanti per la gestione clinica del paziente.

3.8 Campionamento dei linfonodi

Il campionamento dei linfonodi è un'attività fondamentale per una corretta stadiazione oncologica, specialmente nella classificazione TNM, e ha un ruolo cruciale nella pianificazione terapeutica del paziente. Tuttavia, questo compito è spesso sottovalutato e delegato ai patologi meno esperti, nonostante la sua importanza clinica. Studi hanno dimostrato che i migliori campionatori di linfonodi sono i patologi assistenti, mentre i peggiori sono spesso i professori o i patologi con cariche dirigenziali, seguiti dai patologi dello Stato e dai medici specializzati.

3.8.1 Importanza del campionamento completo

Un campionamento incompleto dei linfonodi, limitato a quelli macroscopicamente patologici, può fornire un quadro fuorviante della malattia metastatica. Per esempio, una malattia che metastatizza in 5 linfonodi su 100 presenti avrà un potenziale metastatico diverso rispetto a una che metastatizza in 5 su 5 linfonodi disponibili. Di conseguenza, un campionamento accurato è essenziale non solo per la diagnosi, ma anche per evitare errori nella pratica clinica, soprattutto nelle neoplasie in cui la stadiazione linfonodale è fondamentale per decidere il trattamento.

3.8.2 Tecniche di campionamento nei vari distretti

- **Linfonodi ascellari e inguinali:** Per i linfonodi situati in regioni come l'ascella o l'inguine, un metodo efficace consiste nell'applicare pressione sul tessuto adiposo con le dita, massaggiandolo su una superficie assorbente per separare gradualmente i linfonodi. L'uso di strumenti da taglio come lame o forbici ricurve facilita ulteriormente la separazione del tessuto adiposo dai linfonodi, che vengono identificati e isolati con cura.

- **Linfonodi colici:** I linfonodi del colon sono generalmente più difficili da identificare, soprattutto nei tessuti fissati, dove il peritoneo compattata il tessuto adiposo rendendo complicata la ricerca con la semplice palpazione. In questi casi, si possono utilizzare tecniche di chiarificazione del tessuto adiposo tramite il fissativo di Carnoy, che scioglie il grasso, oppure sezioni seriate del tessuto per identificare i linfonodi.
- **Linfonodi polmonari:** I linfonodi del polmone, come già descritto nel campionamento polmonare, presentano una peculiarità: quelli provenienti dal chirurgo di solito stadiano un N2, mentre quelli trovati dal patologo corrispondono a uno stadio N1. Seguendo l'albero bronchiale, si possono identificare i linfonodi nel polmone, che spesso presentano un colore scuro dovuto alla presenza di particolato aereo, essendo il polmone un organo di filtro.

3.8.3 Ricerca dei linfonodi patologici

Nelle malattie neoplastiche, è obbligatorio cercare tutti i linfonodi presenti nel pezzo anatomico, senza limitarsi a un numero arbitrario. Un linfonodo che appare ingrandito macroscopicamente può indicare una patologia, sia essa infiammatoria o neoplastica. È quindi essenziale campionare tutti i linfonodi sospetti per garantire una diagnosi accurata e una stadiazione corretta.

In conclusione, il campionamento accurato dei linfonodi è una procedura cruciale per la stadiazione delle neoplasie e per garantire il miglior trattamento possibile per il paziente. L'identificazione e il campionamento di tutti i linfonodi presenti sono essenziali, poiché un'analisi incompleta può condurre a un'errata stadiazione della malattia e a un'inadeguata pianificazione terapeutica.

3.9 Campionamento delle patologie infiammatorie e neoplastiche

Il campionamento delle patologie infiammatorie intestinali croniche è fondamentale per la diagnosi e il trattamento. Le principali patologie di questo gruppo includono le *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), come la rettocolite ulcerosa e il morbo di Crohn. Queste due patologie, pur avendo punti in comune, richiedono approcci di campionamento differenti.

3.9.1 Rettocolite ulcerosa

La rettocolite ulcerosa presenta una tendenza alla trasformazione neoplastica e coinvolge principalmente il grosso intestino, partendo sempre dal retto e progredendo in maniera continua lungo il colon. La malattia interessa solo la mucosa e la sottomucosa senza coinvolgere gli strati profondi della parete intestinale. Il campionamento in questi casi deve coprire l'intera lunghezza del viscere resecato per documentare l'estensione della malattia, l'eventuale presenza di displasia e lo stato infiammatorio attivo o quiescente.

3.9.2 Morbo di Crohn

Il morbo di Crohn, al contrario, può colpire qualsiasi segmento del tratto gastrointestinale, dalla bocca all'ano. La caratteristica distintiva di questa malattia è il coinvolgimento transmurale della parete intestinale, che causa alterazioni a tutto spessore. Il campionamento deve includere sezioni rappresentative di tutte le aree affette, documentando eventuali complicanze come fistole, perforazioni o stenosi. A differenza della rettocolite ulcerosa, il morbo di Crohn può presentare aree di tessuto sano intercalate a zone infiammate (salto di lesioni), e questo deve essere documentato nella relazione patologica.

3.9.3 Patologie tiroidee

Nell'ambito delle patologie funzionali, un esempio comune è il campionamento della tiroide per la presenza di *gozzo*, che deve essere descritto accuratamente in termini di peso, dimensioni e aspetto. Si campionano in modo rappresentativo entrambi i lobi e l'istmo, prestando particolare attenzione alla presenza di noduli che possano suggerire una neoplasia. Il campione viene sezionato in modo che ogni lobo sia rappresentato da almeno una sezione del polo craniale, medio e caudale.

3.9.4 Chirurgia mammaria e bariatrica

I campioni di mastectomia riduttiva, spesso associati alla simmetrizzazione dei seni dopo mastectomia per carcinoma mammario, vengono campionati per descrivere la struttura tissutale ed escludere neoplasie occulte. Analogamente, i campioni di gastrectomia *sleeve* (per chirurgia bariatrica) vengono campionati in maniera rappresentativa, senza necessità di un'analisi estesa a meno che non vi siano sospetti di patologie gastriche preesistenti.

3.9.5 Colectistectomia per litiasi

Un campione molto frequente è la colecisti resecata per calcolosi. In questo caso, si campiona sistematicamente il margine chirurgico, il corpo e il fondo della colecisti. Una condizione patologica spesso associata è l'adenomiomatosi, che va descritta insieme alla qualità della bile e dei calcoli, siano essi biliari o colesterinici, specificando dimensioni e quantità. È sempre importante cercare e campionare il linfonodo del colletto, poiché in caso di patologia neoplastica della colecisti sarà fondamentale per la stadiazione della malattia.

3.9.6 Appendicectomia

Nelle chirurgie non elettive, l'appendicectomia è uno degli interventi più frequenti. Nonostante l'appendice sia un organo di dimensioni ridotte, è necessario eseguire un campionamento attento, tagliando a fette il margine appendicolare e prelevando campioni lungo tutta la lunghezza, incluso l'apice appendicolare. In casi rari, l'appendicite può essere associata a neoplasie, come i tumori neuroendocrini, o a condizioni infiammatorie meno comuni come l'appendicite granulomatosa.

3.9.7 Chirurgie emergenti

Infine, nelle chirurgie emergenti più complesse, come le perforazioni o le ischemie intestinali, il ruolo del patologo è cruciale per determinare la causa dell'emergenza. Il campionamento deve essere eseguito con estrema attenzione, con descrizioni dettagliate delle alterazioni macroscopiche, come perforazioni o infarti, e la conferma delle alterazioni patologiche tramite esame istologico. Sebbene in molti casi la diagnosi patologica non modifichi la gestione terapeutica immediata, essa fornisce informazioni essenziali per la gestione a lungo termine del paziente.

3.10 Riassunto

In questo capitolo, abbiamo esplorato l'importanza del campionamento in anatomia patologica, soffermandoci su diverse tipologie di campioni provenienti sia da patologie neoplastiche che infiammatorie. Il campionamento accurato è essenziale per garantire una corretta diagnosi e influenzare positivamente le decisioni terapeutiche.

Abbiamo iniziato discutendo il campionamento dei linfonodi, un passaggio cruciale nella stadiazione delle malattie neoplastiche. Il campionamento metodico e accurato dei linfonodi consente di valutare l'estensione della

malattia e di determinare il piano di trattamento. Le tecniche descritte includono il riconoscimento e l'isolamento dei linfonodi dal tessuto adiposo circostante, con metodi che variano a seconda della regione anatomica di interesse.

Successivamente, abbiamo affrontato il campionamento nelle patologie infiammatorie croniche intestinali, con particolare attenzione alla rettocolite ulcerosa e al morbo di Crohn. Abbiamo sottolineato come queste due condizioni, pur essendo entrambe malattie infiammatorie dell'intestino, richiedano strategie di campionamento differenti a causa delle loro peculiari caratteristiche anatomopatologiche e cliniche. In entrambi i casi, il campionamento esteso lungo il tratto intestinale colpito è fondamentale per documentare l'estensione e l'attività della malattia.

Per quanto riguarda le patologie funzionali e neoplastiche, come le patologie tiroidee e la chirurgia bariatrica, abbiamo evidenziato l'importanza di un campionamento rappresentativo per ottenere una diagnosi accurata. Nel caso della tiroide, la presenza di noduli sospetti per neoplasia richiede un'attenzione particolare, mentre nei campioni di chirurgia bariatrica, il campionamento viene eseguito principalmente per documentare eventuali alterazioni patologiche associate.

Abbiamo poi discusso il campionamento in casi chirurgici frequenti come la colecistectomia per litiasi e l'appendicectomia. Nel primo caso, la ricerca del linfonodo del colletto e la descrizione della bile e dei calcoli sono aspetti fondamentali. Nell'appendicectomia, nonostante si tratti di un campione spesso considerato semplice, è necessario prestare attenzione a possibili sorprese diagnostiche come neoplasie o condizioni infiammatorie meno comuni.

Infine, abbiamo esaminato il ruolo del patologo nelle chirurgie emergenti, dove la descrizione macroscopica e la conferma microscopica delle cause sottostanti, come perforazioni o ischemie, sono cruciali per una gestione ottimale del paziente. Sebbene in molti casi la diagnosi patologica non influisca direttamente sul trattamento d'urgenza, essa rimane essenziale per comprendere pienamente il processo patologico che ha portato all'emergenza e per pianificare la gestione a lungo termine.

In sintesi, questo capitolo ha evidenziato come il campionamento rappresenti un momento chiave nella pratica anatomopatologica, influenzando sia la diagnosi che le decisioni terapeutiche. Una corretta tecnica di campionamento, adattata alle specificità del campione e della patologia, è indispensabile per garantire accuratezza e affidabilità nella valutazione patologica.

Capitolo 4

Campionamento: cuti, piccoli campioni e biopsie

Il campionamento delle biopsie e delle piccole resezioni viene trattato separatamente rispetto ai campioni chirurgici, poiché questi ultimi spesso non richiedono orientamento e non necessitano di un campionamento macroscopico mirato. In altre parole, viene effettuata una selezione casuale del materiale da inviare per l'analisi, mentre il resto del materiale viene conservato per eventuali ulteriori esami. Si noti che per le resezioni di grandi dimensioni o per le radicalizzazioni post-chirurgiche può essere necessaria la conservazione del campione.

Il campionamento di solito segue procedure standardizzate, con campionamento a "caso", ovvero campionando solo una parte del materiale senza una selezione accurata. La prima sezione di questo capitolo è dedicata alle biopsie cutanee.

4.1 Biopsie Cutanee

Le biopsie cutanee possono essere eseguite in qualsiasi ambulatorio e possono essere classificate in due categorie principali: biopsie incisionali e biopsie escissionali. Le biopsie incisionali prevedono il prelievo di solo una parte della lesione, mentre le biopsie escissionali mirano all'asportazione totale del tessuto ritenuto patologico.

Tra i tipi di campioni operatori che possono essere inviati al laboratorio vi sono:

4.1.1 Biopsia Punch

La biopsia punch consiste in un prelievo a carota di tessuto, che include l'epidermide e il derma. Se il punch è eseguito in profondità, può includere anche la quota di tessuto sottocutaneo. Viene utilizzato un cilindro metallico tagliente, appoggiato sulla cute, per estrarre una carota di tessuto. I punch sono disponibili in vari diametri e vengono frequentemente utilizzati per piccole lesioni o per malattie infiammatorie della pelle. A seconda delle dimensioni del punch, si può decidere se includere l'intero campione o suddividerlo per analizzare la lesione al centro del punch stesso. In caso di malattie infiammatorie, è spesso necessario congelare metà del campione per effettuare ulteriori analisi.

4.1.2 Biopsia Shave

La biopsia shave prevede l'abrasione della lesione cutanea, che può essere piatta o rilevata, mediante l'uso di una lama. Vengono rimosse solo le porzioni più superficiali del derma. È importante indicare il margine e il piano profondo per orientare il tecnico all'inclusione e per valutare la radicalità chirurgica.

4.1.3 Losange Cutanee

Le biopsie a forma di losanga prevedono un campione cutaneo con una forma romboidale, caratterizzato da due angoli acuti e due angoli arrotondati. Questa forma consente una migliore gestione chirurgica della ferita, con i due angoli acuti utilizzati come punto di partenza per la sutura. Le losange possono essere orientate, soprattutto in siti con margini ristretti, come sul volto, per facilitare l'asportazione di tessuto in caso di margine positivo.

4.1.4 Descrizione Macroscopica

Nella descrizione dei campioni cutanei è cruciale fornire dettagli macroscopici, per due motivi principali: primo, una diagnosi preliminare può essere fatta basandosi sull'aspetto macroscopico; secondo, la presenza di non concordanza tra la descrizione macroscopica e quella microscopica può suggerire ulteriori indagini. La descrizione delle neoformazioni cutanee deve includere dimensioni (in millimetri), caratteristiche morfologiche (rilevate, piatte, depressed), e dettagli sulla superficie (croste, escoriazioni, ulcere), oltre ai margini (netti o sfumati) e al colore, che è rilevante sia per lesioni melanocitarie che non melanocitarie.

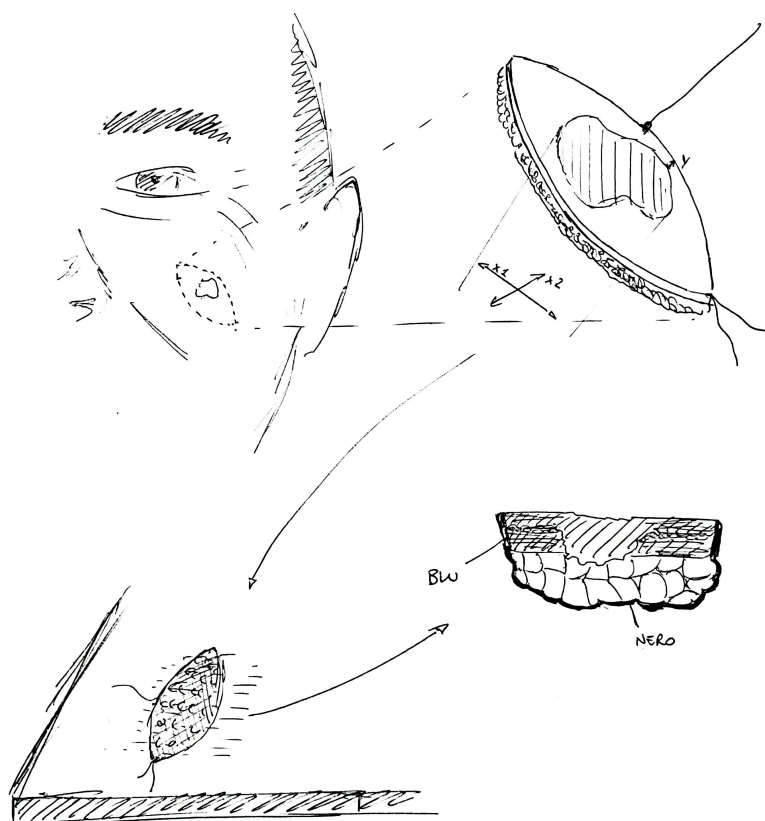


Figura 4.1: Il campionamento delle losanghe cutanee.

4.2 Campionamento delle piccole biopsie

Il campionamento delle piccole biopsie differisce sostanzialmente da quello dei pezzi chirurgici in due aspetti fondamentali: la selezione delle aree da campionare e l'orientamento del campione. Nel caso delle piccole biopsie, spesso si procede con l'inclusione totale del materiale, senza selezionare specifiche aree come avviene nei pezzi chirurgici. Inoltre, l'orientamento non riguarda più l'identificazione anatomica dei margini, bensì la necessità di mostrare chiaramente le relazioni tra i diversi strati tissutali o la disposizione dei frustoli all'interno del bocchetto.

4.2.1 Biopsie endoscopiche

Le biopsie endoscopiche possono variare da piccoli frammenti difficilmente orientabili a resezioni più ampie e complesse, talvolta orientate. Un esempio significativo sono le resezioni endoscopiche sottomucose, in cui il campionamento deve permettere di osservare chiaramente tutti gli strati del tessuto, dalla mucosa alla sottomucosa. Questi campioni richiedono una particolare attenzione nella preparazione e nell'inclusione, per garantire che le sezioni seriate mostrino tutte le strutture rilevanti sul vetrino.

4.2.2 Campionamento delle Biopsie Endoscopiche

Le biopsie endoscopiche possono variare da semplici frammenti a resezioni di grandi dimensioni. Questi campioni spesso arrivano in formalina e sono difficilmente orientabili. Tuttavia, quando si tratta di resezioni sottomucose (resezione della mucosa separata dalla muscolare tramite endoscopia), l'orientamento è cruciale. **Punti principali per il campionamento:**

- Rimozione del pezzo dal supporto con delicatezza dopo fissazione.
- Sezionamento seriate delle resezioni e inclusione orientata in modo che tutti gli strati, dalla mucosa alla sottomucosa, siano visibili sul vetrino.
- I margini apicali vanno campionati separatamente.

4.2.3 Resezioni Endoscopiche Orientate

Le resezioni endoscopiche orientate, come quelle fissate su supporti con spilli, devono essere trattate in modo specifico. La parte importante è campionare in maniera tale che le sezioni seriate includano la rappresentazione completa degli strati del campione.

Punti di attenzione:

- Orientamento a 90° rispetto alla posizione originaria del campione.
- Inclusione delle sezioni in modo da vedere chiaramente tutti gli strati tissutali.

4.2.4 Resezioni Transuretrali Prostatiche (TURP)

Le resezioni transuretrali prostatiche richiedono un campionamento che segue criteri specifici:

- Pesatura del materiale per determinare il numero di cassette necessarie.
- Campionamento minimo di cinque cassette per resezione (indicativamente 15 g).
- Un'ulteriore cassetta ogni 10 g di materiale resecato.
- in caso di diagnosi di carcinoma all'istologia il materiale viene successivamente incluso in toto.

L'obiettivo è garantire che non vi siano tumori prostatici nascosti, pur trattando resezioni per patologie non oncologiche come l'ipertrofia prostatica.

4.2.5 Frustoli da core needle biopsy

I cilindri di tessuto ottenuti tramite core biopsy rappresentano un'altra sfida per il campionamento. A causa della loro forma e della tendenza a piegarsi durante la fissazione, è importante cercare di mantenere il tessuto il più lineare possibile. Questo può essere ottenuto utilizzando spugnette o carta per mantenere i frustoli dritti e allineati, facilitando una corretta inclusione e minimizzando la perdita di tessuto durante la lavorazione. Inoltre, nel caso di campioni più ampi o multipli, può essere utile distribuire i frustoli su più cassette, soprattutto se si prevede la necessità di ulteriori sezioni o esami molecolari.

Le *core biopsies*, ovvero biopsie a cilindro, devono essere trattate in modo da ottimizzare la fissazione e inclusione.

Aspetti pratici per le core biopsies:

- Utilizzo di spugnette per mantenere i frustoli dritti durante la fissazione.
- Stendere i frustoli in modo che non si pieghino, per evitare che si perda parte della superficie utile.
- Dividere su più cassette nel caso di campioni abbondanti o quando si prevede di eseguire ulteriori analisi (coronazioni o esami molecolari).

4.2.6 Biopsie Frammentate e Biopsie Core

Per le biopsie frammentate, si raccomanda di campionare abbondantemente in caso di sospetto diagnostico. In caso di dubbio, si dovrebbe consultare un patologo esperto per decidere come procedere.

4.3 Riassunto

Il campionamento delle piccole biopsie differisce dal campionamento dei pezzi chirurgici per la mancanza di un criterio specifico di selezione delle aree e per un diverso approccio all'orientamento. Le biopsie cutanee possono essere incisionali o escissionali. Tra le tecniche, vi sono la biopsia punch, che preleva un cilindro di tessuto cutaneo, la biopsia shave, che rimuove solo le porzioni superficiali del derma, e le losanghe cutanee, usate per una gestione ottimale della ferita. La descrizione macroscopica di questi campioni è essenziale per una diagnosi accurata. Le biopsie endoscopiche richiedono un'attenzione particolare nella preparazione per assicurare che tutte le strutture rilevanti siano visibili, mentre le resezioni transuretrali prostatiche (TURP) seguono un campionamento basato sul peso. Nel caso delle core biopsy, è importante mantenere i frustoli allineati per facilitare l'inclusione e ottimizzare la quantità di tessuto a disposizione per la diagnosi.

Capitolo 5

Processazione pezzi chirurgici e bioptici

5.1 Introduzione

Dopo la rimozione di un campione di tessuto dal paziente, una serie di processi fisici e chimici deve essere effettuata per garantire che i preparati microscopici finali siano di qualità diagnostica. I tessuti vengono esposti a una sequenza di reagenti che li fissano, disidratano, chiarificano e infiltrano. Infine, il tessuto viene inglobato in un mezzo che ne fornisce supporto per il microtomo. La qualità della conservazione strutturale dei componenti del tessuto è determinata dalla scelta dei tempi di esposizione ai reagenti durante la processazione. Ogni fase della processazione del tessuto è cruciale, dalla selezione del campione alla determinazione dei protocolli e reagenti appropriati, fino alla colorazione e diagnosi finale. La produzione di preparati di qualità per la diagnosi richiede competenze che si sviluppano con la pratica continua e l'esperienza. Con lo sviluppo di nuove tecnologie e strumentazioni, il ruolo del laboratorio di istologia nell'assistenza ai pazienti continuerà ad evolvere, migliorando la standardizzazione dei processi, aumentando la produttività e ottimizzando l'uso delle risorse disponibili. Questo capitolo fornirà una panoramica dei passaggi necessari e dei reagenti utilizzati per preparare i tessuti alla valutazione microscopica.

5.2 Etichettatura dei Tessuti

A ciascun campione di tessuto deve essere assegnato un numero o codice di accesso univoco, come discusso nel Capitolo 2. Questo codice deve accompagnare i campioni durante tutto il processo in laboratorio e può essere

generato manualmente o elettronicamente. Le nuove tecnologie hanno reso disponibili in molti laboratori sistemi di riconoscimento a codice a barre, risposta rapida (QR) e caratteri. Sistemi di pre-etichettatura automatizzati, che incidono o imprime permanentemente cassette e vetrini, insieme a penne e matite resistenti ai reagenti chimici, sono utilizzati di routine nei laboratori di patologia. Indipendentemente dal fatto che si usi un sistema manuale o automatizzato, devono essere implementate procedure e politiche adeguate per garantire l'identificazione positiva dei blocchi di tessuto e dei vetrini durante la processazione, la diagnosi e l'archiviazione.

5.3 Principi della processazione dei Tessuti

la processazione dei tessuti è finalizzato alla rimozione di tutta l'acqua estraibile dal tessuto, sostituendola con un mezzo di supporto che fornisce sufficiente rigidità per consentire il sezionamento del tessuto senza danneggiare o distorcere il tessuto stesso.

5.3.1 Fattori che influenzano la velocità di processazione

Quando il tessuto è immerso in un fluido, si verifica uno scambio tra il liquido presente nel tessuto e il fluido circostante. La velocità di questo scambio dipende dalla superficie del tessuto esposta ai reagenti di processazione. Diversi fattori influenzano la velocità con cui avviene l'intercambio: agitazione, calore, viscosità e vuoto.

Agitazione

L'agitazione aumenta il flusso di soluzioni fresche intorno al tessuto. I processatori automatici utilizzano meccanismi di oscillazione verticale o rotativa o la rimozione e sostituzione pressurizzata dei fluidi a intervalli di tempo per agitare i campioni. Un'agitazione efficiente può ridurre il tempo totale di processazione fino al 30%.

Calore

Il calore accelera la penetrazione e lo scambio di fluidi. Tuttavia, il calore deve essere usato con parsimonia per ridurre il rischio di restringimento, indurimento o fragilità del campione. Temperature superiori ai 45°C possono essere dannose per le successive tecniche di immunoistochimica.

Viscosità

La viscosità è la proprietà che misura la resistenza di un fluido al flusso. Soluzioni con molecole di dimensioni più piccole presentano una penetrazione più rapida (bassa viscosità), mentre molecole più grandi rallentano lo scambio (alta viscosità). La maggior parte dei reagenti usati nella processazione, nella disidratazione e nello schiarimento hanno viscosità simili, tranne l'olio di cedro. I materiali per l'inclusione hanno viscosità differente e la paraffina fusa ha una minore viscosità, aumentando la velocità di impregnazione.

Vuoto

L'uso della pressione per aumentare il tasso di infiltrazione riduce il tempo necessario per completare ogni fase della processazione dei campioni. Il vuoto, se applicato, non deve superare i 50,79 kPa per evitare danni ai tessuti. Può essere utile anche per rimuovere l'aria intrappolata nei tessuti porosi, accelerando l'impregnazione di tessuti densi e grassi.

5.4 Fasi della processazione dei Tessuti

- **Fissazione:** stabilizza e indurisce il tessuto con una distorsione minima delle cellule.
- **Disidratazione:** rimozione dell'acqua e del fissativo dal tessuto.
- **Chiarificazione:** eliminazione delle soluzioni disidratanti per rendere i componenti del tessuto ricettivi al mezzo infiltrante.
- **Infiltrazione:** impregnazione del tessuto con un mezzo di supporto.
- **Inclusione:** orientamento del campione nel mezzo di supporto e solidificazione del preparato.

5.5 Fissazione

Preservare le cellule e i componenti tissutali con la minima distorsione possibile è l'obiettivo principale della processazione dei campioni di tessuto. La fissazione stabilizza le proteine, rendendo la cellula e i suoi componenti resistenti all'autolisi. È fondamentale che la fissazione sia completata prima di iniziare i passaggi successivi.

5.6 Disidratazione

La disidratazione consiste nella rimozione dell'acqua libera e dei fissativi acquosi dai componenti del tessuto. La disidratazione deve essere eseguita gradualmente attraverso una serie di soluzioni a concentrazione crescente. L'etanolo è uno dei reagenti disidratanti più comuni.

5.7 Disidratazione

La prima fase della processazione consiste nella rimozione dell'acqua "libera" non legata e dei fissativi acquosi dai componenti del tessuto. Molti dei reagenti disidratanti sono idrofili, cioè "amano l'acqua", e possiedono forti gruppi polari che interagiscono con le molecole d'acqua nel tessuto tramite legami idrogeno. Altri reagenti influenzano la disidratazione mediante diluizioni ripetute dei fluidi acquosi presenti nei tessuti.

La disidratazione deve essere eseguita gradualmente. Se il gradiente di concentrazione è eccessivo, le correnti di diffusione attraverso le membrane cellulari possono aumentare la possibilità di distorsione cellulare. Per questo motivo, i campioni vengono processati attraverso una serie graduale di reagenti con concentrazioni crescenti. Una disidratazione eccessiva può rendere i tessuti duri, fragili e ristretti. Al contrario, una disidratazione incompleta comprometterà la penetrazione dei reagenti di chiarificazione, lasciando il campione morbido e non ricettivo all'infiltrazione.

Esistono numerosi agenti disidratanti come etanolo, acetone, metanolo, isopropanolo, glicoli e alcol denaturato.

5.8 Fluidi Disidratanti

5.8.1 Etanolo (C_2H_5OH)

L'etanolo è un liquido limpido, incolore e infiammabile. È idrofilo, miscibile con acqua e altri solventi organici, rapido e affidabile. Oltre ai rischi per la salute umana, l'etanolo è soggetto a tassazione in molti paesi, richiedendo quindi un'attenta gestione dei registri.

Concentrazioni graduali di etanolo vengono utilizzate per la disidratazione; il tessuto è immerso in una soluzione di etanolo al 70%, seguita da soluzioni al 95% e al 100%. L'etanolo assicura una disidratazione totale, il che lo rende il reagente di scelta per la processazione nei casi di microscopia elettronica. Per i tessuti delicati si consiglia di iniziare con una concentrazione di etanolo al 30%.

5.8.2 Spirito Metilato Industriale (Alcol Denaturato)

Questo fluido ha le stesse proprietà fisiche dell'etanolo. L'alcol denaturato è composto da etanolo con l'aggiunta di metanolo (circa 1%), isopropanolo o una combinazione di alcoli. Per la processazione dei tessuti, viene utilizzato allo stesso modo dell'etanolo.

5.8.3 Metanolo (CH_3OH)

Il metanolo è un fluido limpido, incolore e infiammabile, miscibile con acqua, etanolo e la maggior parte dei solventi organici. È altamente tossico, ma può essere utilizzato come sostituto dell'etanolo nei protocolli di processazione.

5.8.4 Propan-2-olo, Alcol Isopropilico ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$)

L'alcol isopropilico è miscibile con acqua, etanolo e la maggior parte dei solventi organici. Viene utilizzato nei protocolli di processazione a microonde. L'alcol isopropilico non provoca un eccessivo indurimento o restringimento del tessuto.

5.8.5 Butanolo ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$)

Utilizzato principalmente per l'istologia vegetale e animale, il butanolo è un disidratante lento che causa meno restringimento e indurimento del tessuto.

5.8.6 Acetone (CH_3COCH_3)

L'acetone è un fluido limpido, incolore e infiammabile, miscibile con acqua, etanolo e la maggior parte dei solventi organici. Agisce rapidamente, ma ha una scarsa penetrazione e può causare fragilità nei tessuti se usato a lungo. L'acetone rimuove i lipidi dal tessuto durante la processazione.

5.9 Additivi agli Agenti Disidratanti

Quando viene aggiunto agli agenti disidratanti, il fenolo agisce come ammorbidente per tessuti duri come tendini, unghie, tessuto fibroso denso e masse di cheratina. Si consiglia di aggiungere il 4% di fenolo a ciascuno stadio con etanolo al 95%. In alternativa, i tessuti duri possono essere immersi in una miscela di glicerolo e alcol.

5.10 Solventi Universali

I solventi universali non sono più utilizzati per la processazione di routine a causa delle loro proprietà pericolose e devono essere maneggiati con estrema cautela. I solventi universali disidratano e chiarificano i tessuti durante la processazione. Dioxano, butanolo terziario e tetraidrofurano sono considerati solventi universali. Non sono raccomandati per la processazione di tessuti delicati a causa delle loro proprietà indurenti.

5.11 Chiarificazione

Gli agenti di chiarificazione agiscono come intermediari tra i reagenti di disidratazione e quelli di infiltrazione. Essi devono essere miscibili con entrambe le soluzioni. La maggior parte degli agenti chiarificanti sono idrocarburi con indici di rifrazione simili a quelli delle proteine. Quando il disidratante viene completamente sostituito da questi solventi, il tessuto assume un aspetto traslucido, da cui deriva il termine "agente chiarificante".

5.11.1 Criteri di selezione per un agente chiarificante

I criteri per la scelta di un agente chiarificante adatto includono:

- Rapida penetrazione nei tessuti;
- Rapida rimozione dell'agente disidratante;
- Facilità di rimozione mediante cera paraffinica fusa;
- Danno minimo ai tessuti;
- Bassa infiammabilità;
- Bassa tossicità;
- Costo ridotto.

La maggior parte degli agenti chiarificanti sono liquidi infiammabili e richiedono quindi un uso cauto. Il punto di ebollizione dell'agente chiarificante indica la velocità con cui viene sostituito dalla cera paraffinica fusa. I fluidi con un punto di ebollizione basso tendono a essere sostituiti più rapidamente. La viscosità influisce sulla velocità di penetrazione dell'agente chiarificante. Un'esposizione prolungata agli agenti chiarificanti può rendere il tessuto fragile, pertanto è importante monitorare attentamente il tempo di esposizione.

per garantire che i blocchi di tessuto denso siano adeguatamente chiarificati e che quelli più piccoli e fragili non vengano danneggiati. Il costo deve essere considerato, specialmente per quanto riguarda lo smaltimento dei reagenti. Poiché la maggior parte degli agenti chiarificanti sono idrocarburi aromatici o alifatici a catena corta, le questioni ambientali devono essere affrontate. La maggior parte delle istituzioni ha una politica per lo stoccaggio, lo smaltimento e i requisiti di sicurezza relativi ai materiali infiammabili utilizzati in laboratorio.

5.11.2 Agenti chiarificanti per uso routinario

Xilene

Lo xilene è un liquido infiammabile, incolore, con un caratteristico odore di petrolio o aromatico, miscibile con la maggior parte dei solventi organici e con la cera paraffinica. È adatto per chiarificare blocchi di tessuto inferiori a 5 mm di spessore e sostituisce rapidamente l'alcool dal tessuto. Un'eccessiva esposizione allo xilene durante la processazione può causare indurimento dei tessuti. È comunemente utilizzato nei laboratori di istologia e può essere riciclato.

Toluene

Il toluene ha proprietà simili allo xilene, ma è meno dannoso in caso di immersione prolungata del tessuto. Tuttavia, è più infiammabile e volatile rispetto allo xilene.

Cloroformio

Il cloroformio è più lento nell'azione rispetto allo xilene, ma provoca meno fragilità nei tessuti. Può essere utilizzato per blocchi di tessuto di spessore maggiore di 1 mm. I tessuti immersi nel cloroformio non diventano traslucidi. È non infiammabile ma altamente tossico e produce gas tossico di fosgene quando riscaldato. Viene utilizzato principalmente nella processazione dei campioni del sistema nervoso centrale.

Sostituti dello Xilene

I sostituti dello xilene sono idrocarburi alifatici che esistono in forme a catena lunga e corta. Differiscono per il numero di atomi di carbonio nella catena carboniosa. Gli alifatici a catena corta hanno proprietà di evaporazione simili a quelle dello xilene e non hanno affinità per l'acqua. Gli alifatici a catena

lunga non evaporano rapidamente e possono contaminare la cera paraffinica nei processori di tessuto.

Oli di agrumi - Reagenti a base di limonene

I reagenti a base di limonene sono estratti dalle bucce di arancia e limone; sono non tossici e miscibili con l'acqua. Lo smaltimento dipende dai centri di trattamento delle acque e dalle normative locali o nazionali. I principali svantaggi includono la possibilità di sensibilizzazione e il forte odore pungente che può causare mal di testa. Inoltre, piccoli depositi minerali come rame o calcio possono dissolversi e fuoriuscire dai tessuti. Sono estremamente oleosi e non possono essere riciclati.

5.12 Reagenti di Infiltrazione e Inclusione

5.12.1 Paraffina

La cera paraffinica continua a essere il mezzo di infiltrazione e inclusione più popolare nei laboratori di istopatologia. È una miscela di idrocarburi a catena lunga, prodotta dalla fratturazione dell'olio minerale. Le sue proprietà variano a seconda del punto di fusione utilizzato, che può variare tra 47 e 64°C. La cera paraffinica permea il tessuto in forma liquida e si solidifica rapidamente quando raffreddata. Il tessuto viene impregnato con il mezzo, formando una matrice che previene la distorsione della struttura durante il microtomia.

La cera paraffinica ha una vasta gamma di punti di fusione, il che è importante per l'uso in diverse regioni climatiche del mondo. Per favorire la formazione di nastri desiderabili durante la microtomia, è opportuno scegliere una cera paraffinica di adeguata durezza a temperatura ambiente. Riscaldare la cera paraffinica a temperature elevate può alterarne le proprietà. Le cere paraffiniche con un punto di fusione più alto offrono un supporto migliore per i tessuti più duri.

5.13 Mezzi di inclusione alternativi

In alcuni casi, la paraffina può risultare inadatta per l'inclusione di determinati tipi di tessuti, come nei seguenti esempi:

- I reagenti di processazione rimuovono o distruggono i componenti tissutali oggetto dell'indagine, come i lipidi;

- È necessario ottenere sezioni più sottili, ad esempio nei linfonodi;
- L'uso del calore può danneggiare i tessuti o gli enzimi;
- Il mezzo di infiltrazione non è sufficientemente rigido per supportare il tessuto.

5.13.1 Resina

La resina è utilizzata esclusivamente come mezzo di inclusione per la microscopia elettronica, in particolare per ottenere sezioni ultrafini ad alta risoluzione e per sezioni di osso non decalcificato.

5.13.2 Agar

Il gel di agar, da solo, non fornisce un supporto sufficiente per sezionare i tessuti. Il suo uso principale è come agente coesivo per piccoli frammenti di tessuto friabili dopo la fissazione, in un processo noto come "doppia inclusione". I frammenti di tessuto vengono immersi in agar fuso, lasciati solidificare e poi tagliati per la processazione di routine. Un metodo superiore e più raffinato consiste nel filtrare il fissativo contenente i frammenti di tessuto attraverso un filtro Millipore con l'ausilio di una pompa di aspirazione. L'agar fuso viene quindi versato con cura nel filtro e, una volta solidificato, il pellet di agar ottenuto viene processato e incluso in paraffina.

5.13.3 Gelatina

La gelatina è utilizzata principalmente per la produzione di sezioni di organi interi con la tecnica Gough-Wentworth e per le sezioni congelate. Il suo utilizzo è raro.

5.13.4 Celloidina

L'uso della celloidina o di LVN (nitrocellulosa a bassa viscosità) è sconsigliato a causa dei requisiti particolari necessari per ospitare i reagenti di processazione e per l'uso limitato che queste sezioni trovano in neuropatologia. L'uso della celloidina è quindi molto raro.

5.14 Inclusione in paraffina

L'inclusione prevede l'incapsulamento di campioni orientati correttamente, dopo essere stati adeguatamente processati, in un mezzo di supporto che fornisca stabilità durante il microtaglio. Il mezzo di inclusione deve riempire la matrice del tessuto, sostenendo i componenti cellulari. Dovrebbe anche fornire elasticità, resistenza alla distorsione durante il taglio, facilitando al contempo il processo di sezionamento.

La maggior parte dei laboratori utilizza centri di inclusione modulari, composti da un dispensatore di paraffina, una piastra fredda e un'area riscaldata per stampi e cassette tissutali. La paraffina viene automaticamente dispensata in uno stampo della dimensione appropriata. Il tessuto viene orientato nello stampo, si applica una cassetta che produce una superficie piana con lati paralleli, e lo stampo viene quindi raffreddato rapidamente, garantendo una struttura cristallina fine e minimizzando gli artefatti durante il taglio.

5.15 Processazione automatizzata dei tessuti

Il principio di base per la processazione dei tessuti prevede lo scambio di fluidi utilizzando una serie di soluzioni per un periodo di tempo predeterminato in un ambiente controllato. Le attrezzature per la processazione dei tessuti sono rimaste relativamente invariate per decenni, ma i recenti progressi includono forni a microonde specializzati, processatori a throughput costante e processatori con retorti multi-sezione.

5.15.1 Processori a microonde

I forni a microonde progettati specificamente per la processazione dei tessuti sono ora comuni. Questi strumenti riducono i tempi di processazione da ore a minuti, accelerando la diffusione delle soluzioni nei tessuti attraverso l'aumento del calore interno del campione. I forni a microonde da laboratorio hanno un controllo preciso della temperatura, dei tempi e dei sistemi di estrazione dei fumi. Tuttavia, questo metodo richiede attenzione per il controllo della temperatura, e i costi di tali forni possono risultare elevati.

5.15.2 Vantaggi delle nuove tecnologie

I vantaggi principali offerti dalle nuove tecnologie di processazione includono:

- Programmi personalizzabili in base al tipo di tessuto;

- Schedulazione rapida;
- Contenimento dei fluidi e dei fumi;
- Reagenti ecologici.

5.16 Riassunto

La processazione dei campioni chirurgici e biotici è un passaggio fondamentale per la preparazione dei tessuti alla valutazione microscopica. Ogni campione viene prima etichettato con un codice unico, garantendo la sua identificazione lungo tutte le fasi del processo. La fissazione stabilizza i tessuti, impedendone la degradazione, mentre la disidratazione elimina l'acqua. Successivamente, il chiarimento prepara i tessuti per l'infiltrazione, che consiste nell'impregnazione con un mezzo di supporto, solitamente paraffina, necessario per il sezionamento. La qualità del campione dipende da fattori come agitazione, calore, viscosità e vuoto, che influenzano la velocità di penetrazione dei reagenti nei tessuti. Alcuni campioni richiedono orientamenti specifici durante l'inclusione, per garantire una corretta visualizzazione microscopica. Le nuove tecnologie, come i processori a microonde, hanno rivoluzionato il settore, riducendo i tempi di lavorazione e migliorando la qualità delle preparazioni. L'uso di strumenti automatizzati consente una standardizzazione maggiore, personalizzazione dei protocolli e un impatto ambientale ridotto, aumentando efficienza e affidabilità.

Capitolo 6

Inclusione in paraffina e taglio al microtomo

6.1 Introduzione

L'inclusione in paraffina è una fase fondamentale della preparazione istologica. Consiste nel lasciare permeare il tessuto da una sostanza solida a temperatura ambiente, in grado di supportare il taglio in sezioni sottili, solitamente dell'ordine di pochi micron. Questa sostanza è, nella pratica comune, la **paraffina**.

6.2 La Processazione

Prima dell'inclusione vera e propria, il tessuto deve essere sottoposto a un processo detto **processazione**, durante il quale viene progressivamente disidratato attraverso una scala alcolica crescente (dal 70% al 100%), quindi chiarificato con un intermedio come xilolo e infine infiltrato con paraffina calda (58–60 °C).

6.3 Centralina di Inclusione

La **centralina di inclusione** è lo strumento dove avviene il passaggio finale dell'infiltrazione: il campione viene posizionato in appositi stampi metallici (*base molds*) e immerso nella paraffina fusa. Una volta orientato correttamente, il campione viene fatto solidificare.



Figura 6.1: Blocchetto di paraffina con tessuto incluso.

6.4 Criteri di Inclusione

Un'inclusione corretta è essenziale per ottenere sezioni di qualità. I principali criteri da seguire sono:

- Orientamento corretto del frammento.
- Scelta adeguata dello stampo.
- Assenza di bolle o crepe nella paraffina.
- Completa immersione del tessuto nella paraffina.

6.5 Inclusione in paraffina

L'inclusione in paraffina è una fase fondamentale nella preparazione istologica, che consente il corretto sezionamento al microtomo. Il processo si svolge utilizzando una stazione di inclusione composta da tre elementi principali: la consolle termica, la consolle di dispensazione e la consolle criogenica.

6.5.1 Panoramica dell'attrezzatura

- **Consolle termica:** mantiene i contenitori (mold o barchette) e le cassette di tessuto caldi dopo la processazione. Sono disponibili stampi di diverse dimensioni (piccolo, medio, grande). È consigliato mantenere questa zona pulita e asciutta.
- **Consolle di dispensazione:** contiene la paraffina fusa. Il serbatoio non deve essere riempito oltre i 3/4. Dispone di piastra calda, scaldapinze e una leva per il rilascio della paraffina.
- **Consolle criogenica:** raffredda rapidamente i blocchi per solidificare la paraffina. Mantenere tra -4°C e -7°C . Accendere solo 20–30 minuti prima dell'uso per evitare danni.

6.5.2 Procedura di inclusione

1. **Preparazione:** accendere in anticipo la consolle termica e quella di dispensazione. Accendere la consolle criogenica la mattina stessa.
2. **Gestione delle cassette:** aprire una sola cassetta per volta per evitare scambi accidentali di campione.
3. **Scelta dello stampo:** selezionare la barchetta in base alla dimensione del campione. Campioni piccoli (testicoli, reni di topo) usano stampi piccoli; campioni grandi (es. fegato, cervello) richiedono stampi medi o grandi.
4. **Incorporamento del tessuto:**
 - (a) Aggiungere una piccola quantità di paraffina nella barchetta preriscaldata.
 - (b) Orientare il tessuto con pinzette calde, rispettando il protocollo del laboratorio (es. sezione sagittale o trasversale). Mantenere sempre la stessa direzione di orientamento.
 - (c) Posizionare brevemente la barchetta sulla piastra fredda per fissare il campione con uno strato sottile di paraffina.
 - (d) Completare il riempimento della barchetta con paraffina, evitando la formazione di bolle (usare la croce sul coperchio per ridurle).
 - (e) Apporre il coperchio della cassetta e spostare la barchetta sulla consolle criogenica per il raffreddamento finale.

5. Note operative:

- **Pinzette:** alternare regolarmente tra pinzette calde per evitare che il campione si attacchi.
- **Raffreddamento rapido:** usare le zone più fredde per migliorare la cristallizzazione della paraffina e facilitare il sezionamento.
- **Campioni multipli:** allineare più campioni in una singola barchetta richiede velocità e precisione.
- **Uso di pesi:** appiattare campioni delicati (es. utero con ovaie) con pesi metallici appositi.
- **Posizionamento strategico:** posizionare il campione verso il basso della barchetta per facilitare il drenaggio durante la microtomia.

6.5.3 Gestione dopo l'inclusione

- **Rimozione del blocco:** i blocchi devono staccarsi facilmente una volta completamente raffreddati. Se si oppongono resistenza, è segno che il raffreddamento non è stato sufficiente.
- **Controllo del livello:** i campioni devono essere incorporati sullo stesso piano. Eventuali dislivelli possono causare la perdita di sezioni durante il taglio.
- **Pulizia dei blocchi:** rimuovere la paraffina in eccesso dai bordi con un coltello smussato. Questo evita alterazioni dell'angolo di taglio al microtomo.
- **Conservazione:** se non si completa l'inclusione, avvolgere i campioni in carta stagnola e conservarli in modo ermetico. Evitare di lasciarli troppo a lungo nella zona calda.

6.5.4 Pulizia e manutenzione

Alla fine di ogni sessione:

- Raschiare la paraffina residua da superfici e piastre con un coltello smussato.
- Svuotare il cassetto raccogli-paraffina.

- Riporre ordinatamente gli stampi per dimensione, facilitando il drenaggio e mantenendo l'area pulita.

La pulizia regolare è essenziale per evitare accumuli, mantenere l'efficienza della stazione e garantire risultati riproducibili.

6.5.5 Difetti Comuni nell'Inclusione

- **Crepe o bolle:** causate da raffreddamento troppo rapido o tessuti secchi.
- **Errata dispensazione della paraffina:** può causare spazi vuoti nel blocchetto.
- **Errore di orientamento:** compromette la leggibilità diagnostica.
- **Inquinamento da riporti:** contaminazione da tessuti diversi.

6.6 Il Taglio al Microtomo

Dopo l'inclusione, i blocchetti vengono tagliati con un **microtomo**. Le tipologie principali includono:

- Microtomo rotativo (il più comune)
- Microtomo a slitta

6.6.1 Fasi di Allestimento

1. Raffreddare i blocchetti su piastra refrigerata a $-15/-5$ °C.
2. Pulire i blocchetti da eccessi di paraffina.
3. Agganciare il blocchetto al porta blocco.
4. Effettuare la sgrossatura.
5. Tagliare sezioni dello spessore desiderato ($3-5\mu m$).

6.7 Caratteristiche di una Sezione Ottimale

Una sezione ideale deve:

- Essere ben centrata sul vetrino.
- Presentare spessore omogeneo.
- Essere priva di pieghe, strappi o bolle.
- Non presentare inquinamenti.
- Comprendere tutto il tessuto presente nel blocchetto.

6.8 La tecnica di taglio

Il microtomo è uno strumento progettato per ottenere sezioni sottili da campioni inclusi in paraffina, rendendoli idonei per la colorazione e l'osservazione microscopica. Di seguito si riassumono le principali operazioni da compiere per ottenere sezioni corrette.

6.8.1 Fissaggio del blocchetto

Utilizzare la leva dedicata per fissare saldamente il blocchetto al **porta-campione**. Questa operazione è fondamentale per garantire la stabilità durante il taglio.

6.8.2 Impostazione della lama

La lama deve essere maneggiata con estrema attenzione. È buona norma sostituirla o regolarla prima del taglio di ogni nuovo campione. Il porta-lama è regolabile su tre piani mediante apposite manopole:

- **Manopola anteriore:** regola l'inclinazione antero-posteriore.
- **Manopola sinistra:** consente l'allineamento laterale.
- **Manopola destra:** modifica l'angolo d'inclinazione.

In genere, si ottengono risultati ottimali con un'inclinazione piuttosto accentuata.

6.8.3 Preparazione del blocchetto

Prima del taglio vero e proprio, è necessario rimuovere lo strato esterno di paraffina per esporre il tessuto. Il blocchetto può essere immerso in acqua fredda per un periodo variabile da 1 a 24 ore per prevenire il distacco o lo “shattering” del tessuto durante il sezionamento.

Una volta esposto il tessuto, si può rafilare l'eccesso di paraffina con una lama da bisturi per ottimizzare la superficie da sezionare.

6.8.4 Impostazione del microtomo

Regolare lo spessore della sezione tramite l'apposita manopola (solitamente $3-5\mu m$). Utilizzare la ruota principale per avanzare il blocchetto contro la lama. Per motivi di sicurezza, il pomello laterale va abbassato e la manopola frontale estratta per attivare il movimento. Al termine dell'uso, riportare la manopola nella posizione iniziale.

6.8.5 Raccolta delle sezioni

Tagliare le sezioni in “nastri” di circa 6 sezioni ciascuno. Raccoglierli con pinzette e adagiarli delicatamente in un bagno d'acqua calda ($45-50\text{ }^{\circ}\text{C}$) per distendere la paraffina. Con l'ausilio di un vetrino caricato (frosted side), raccogliere le sezioni e adagiarle su un nuovo vetrino portaoggetti.

6.8.6 Essiccazione

Etichettare il vetrino con una matita indelebile e posizionarlo su una piastra riscaldante o in stufa a $37-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ per almeno un'ora, in modo da far aderire perfettamente le sezioni e rimuovere l'umidità residua.

6.9 Difetti di Sezione e Correzioni

6.9.1 Effetto a Tapparella

Linee parallele visibili nella sezione, spesso causate da disidratazione incompleta del tessuto.

6.9.2 Pieghe

Causate da compressione della sezione, dovuta a un blocco troppo caldo, lama non affilata o accumulo di cera.

6.9.3 Bolle d'Aria

Possono aderire sotto la sezione nel bagno d'acqua. Si consiglia di rimuovere bolle con un pennello prima di inserire la sezione.

6.9.4 Crepe

Si verificano con tessuti secchi o troppo processati. Visibili anche al microscopio dopo colorazione.

6.9.5 Sezione Disintegrante

Causata da tessuti poco infiltrati. Le sezioni assorbono acqua rapidamente e si disintegrano nel bagno caldo.

Risoluzioni possibili:

- Aumentare lo spessore della sezione ($3-5\mu m$).
- Raffreddare meglio il blocchetto prima del taglio.

6.10 Conclusioni

L'inclusione in paraffina rappresenta una delle fasi più critiche nella preparazione di campioni istologici. Una corretta processazione, insieme a un'accurata inclusione e sezionamento, garantisce campioni di alta qualità per una diagnosi istopatologica precisa e affidabile.

Capitolo 7

Automazione in anatomia patologica

7.0.1 Perché automatizzare

L'automazione sta trasformando profondamente le procedure di laboratorio, in particolare nei settori che richiedono elevata ripetibilità e precisione. Questo fenomeno è particolarmente evidente nelle attività di colorazione, dove la variabilità individuale può influire significativamente sui risultati finali, soprattutto nelle colorazioni istochimiche e immunoistochimiche. La necessità di ridurre tali variabilità spinge verso una maggiore adozione di tecnologie automatizzate, garantendo così risultati più omogenei e affidabili.

7.0.2 Automazione e Sicurezza in Laboratorio

Un altro aspetto cruciale dell'automazione riguarda la sicurezza. In molti passaggi, i tecnici di laboratorio possono essere esposti a sostanze chimiche pericolose, come avviene nella processazione dei campioni. In questi casi, l'automazione riduce il rischio di esposizione e contribuisce a migliorare la sicurezza sul lavoro. La processazione automatizzata è già diffusa nella maggior parte dei laboratori di anatomia patologica, soprattutto nei paesi con risorse economiche maggiori. Questo include anche le procedure di colorazione, come l'ematossilina-eosina e le colorazioni immunoistochimiche.

7.1 Analisi Economica dell'Automazione

7.1.1 Costo Opportunità e Efficienza

Dal punto di vista economico, il principale fattore limitante nella diffusione dell'automazione è legato ai costi. Se un tecnico può svolgere il lavoro di una macchina con velocità e accuratezza comparabili, l'adozione della macchina diventa giustificabile solo se economicamente conveniente. In altre parole, la macchina deve avere un costo d'acquisto, operatività e manutenzione talmente basso da rendere più conveniente la sua adozione rispetto all'assunzione di un tecnico umano. Questo ragionamento si basa sul concetto di *costo opportunità*, ovvero il costo delle risorse impiegate in un'opzione piuttosto che in un'altra.

7.1.2 Tecnologie Disruptive e Innovazione

In questo contesto, il concetto di *disruptive technology* di Christensen diventa fondamentale. Le tecnologie disruptive sono quelle che, pur inizialmente non competitive rispetto alle soluzioni tradizionali in termini di qualità o costo, evolvono rapidamente e cambiano radicalmente il mercato, rendendo obsolete le tecnologie precedenti. L'automazione rappresenta un classico esempio di tecnologia disruptive nei laboratori biomedici: inizialmente vista come un'opzione costosa e non sempre vantaggiosa, oggi si sta rapidamente affermando come standard, soprattutto in risposta alla crescente complessità delle procedure e all'aumento della domanda di esami avanzati.

7.2 Aumento della Complessità delle Procedure

7.2.1 Crescente Richiesta di Esami Complessi

Oggi, rispetto a 50 anni fa, la diagnostica richiede un numero significativamente maggiore di blocchetti e colorazioni per ogni caso clinico. Per esempio, in un tumore del colon, oltre alla diagnosi istologica di adenocarcinoma, vengono richieste ulteriori colorazioni, come quelle per il *mismatch repair*, che aggiungono altri blocchetti da processare. Anche il numero di linfonodi analizzati è aumentato, così come l'utilizzo di colorazioni immunoistochimiche per la valutazione di dettagli diagnostici come il *budding* tumorale o il livello di invasione. Questi esami complessi sono oggi essenziali per una diagnosi accurata e per la personalizzazione del trattamento.

7.2.2 Maggiore Complessità = Maggiore Cura nelle Variabili Preanalitiche

Con l'aumentare della complessità delle tecnologie utilizzate nelle fasi successive del processo diagnostico (ad esempio, esami molecolari sui campioni paraffinati o l'analisi digitale delle immagini), cresce anche l'importanza di un controllo rigoroso delle variabili preanalitiche. Queste includono tutte le fasi che precedono l'analisi del campione, come la fissazione, l'inclusione in paraffina e la preparazione dei vetrini. Ogni errore in queste fasi può compromettere irrimediabilmente i risultati delle analisi successive, che sono sempre più sofisticate e sensibili.

Per questo motivo, l'automazione diventa non solo una scelta economica o di efficienza, ma un'utile risposta per garantire l'affidabilità dei risultati in un contesto in cui la variabilità preanalitica può avere un impatto decisivo sulla qualità delle analisi.

7.3 Crisi Vocazionale e Trasformazione dei Ruoli

7.3.1 Impatto della Crisi Vocazionale

Un ulteriore fattore che spinge verso l'automazione è la crisi vocazionale che colpisce sia il comparto tecnico che quello medico, in particolare in settori come l'anatomia patologica. Con un numero decrescente di medici e tecnici qualificati, l'automazione rappresenta una risposta utile per mantenere elevati standard di produttività e qualità nel laboratorio.

7.3.2 Nuovi Ruoli per i Tecnici di Laboratorio

Questa crisi vocazionale porta anche a una ridefinizione dei ruoli nel laboratorio. I tecnici, grazie a percorsi formativi specifici, stanno assumendo competenze e responsabilità che in passato erano appannaggio esclusivo dei medici. In futuro, la diminuzione del numero di patologi potrebbe portare i tecnici a svolgere compiti più complessi, come il campionamento o altre mansioni mediche, lasciando che le macchine si occupino di molte delle attività manuali tradizionalmente associate al loro ruolo.

7.4 Conclusioni

L'automazione è un probabile futuro dei laboratori di anatomia patologica. Non solo per ragioni economiche o di sicurezza, ma soprattutto per garantire la qualità e l'affidabilità dei risultati diagnostici in un contesto in cui le tecnologie a valle stanno diventando sempre più complesse e sensibili alle variabili preanalitiche. Nei prossimi paragrafi, esploreremo il funzionamento delle macchine per la processazione e la colorazione automatica, oltre a discutere delle tecnologie emergenti per l'inclusione e il taglio automatico, settori che mostrano un grande potenziale di crescita nel prossimo futuro.

Capitolo 8

Esame intraoperatorio: finalità e mezzi

8.1 Introduzione

L'esame intraoperatorio ha rivoluzionato la patologia chirurgica, portando il patologo all'interno della sala operatoria. Originariamente, i chirurghi operavano solo su anomalie palpabili al seno e facevano diagnosi macroscopica (e grossolana) per differenziare tra benigno e maligno. Nella storia della medicina si riporta spesso la diagnosi di comedocarcinoma (carcinoma duttale in situ) descritto da Halsted e Bloodgood nel 1893 mediante semplice ispezione macroscopica:

"Assistetti il Dr. Halsted nell'esplorazione di un tumore clinicamente benigno al seno. Nel momento in cui lo sezionammo, apparvero molti cilindri grigiastri e granulari dalla superficie, che chiamai allora comedoni. Sulla base dell'aspetto macroscopico del tumore, diagnosticammo la malignità e procedemmo con un intervento radicale. I linfonodi non risultavano coinvolti."

8.2 Veloce ma non velocissima

Tuttavia Bloodgood riporta che alcuni anni prima (1891):

"Il Dr. Halsted rimosse un tumore al seno che considerava clinicamente benigno. Dopo la rimozione, mentre sezionava il tumore, manifestò dubbi sulla sua natura. Chiese una diagnosi con sezione congelata inviando l'esemplare a Dr. Welch nel laboratorio

patologico, a circa cinque minuti di cammino. Quando Welch raggiunse la sala operatoria, Halsted aveva già concluso l'operazione e chiuso la ferita. Da quel momento, Halsted non chiese più una seconda sezione congelata in sala operatoria per oltre venticinque anni.”

8.3 La Richiesta di Consulenze in Sala Operatoria

Già nel 1905, il chirurgo William J. Mayo espresse l'importanza di poter avere una diagnosi istopatologica in tempo reale durante l'intervento:

”Vorrei che voi patologi trovaste un modo per dirci se una crescita è cancro o meno mentre il paziente è ancora sul tavolo operatorio.”

Louis Blanchard Wilson (1866–1943) sviluppò il primo metodo rapido per preparare tessuti per il microscopio (Figura 8.1) e rispondendo alle esigenze dei colleghi chirurghi: “l'intero processo può essere completato in un minuto e mezzo.”

8.4 Glossario

Esistono diversi termini per descrivere l'esame intraoperatorio:

- Esame microscopico di tessuto fresco congelato
- Diagnosi su tessuto fresco
- Sezione rapida
- Sezionamento criogenico
- Sezione congelata
- Diagnosi patologica intraoperatoria
- Consulto intraoperatorio
- Esame intraoperatorio con sezione congelata (*frozen section examination* FSE)

Tutti questi termini sottolineano l'aspetto procedurale del congelamento. La diagnosi intraoperatoria, analogamente alla diagnosi su sezioni stabili, si può comporre anche della parte macroscopica e per alcune patologie la valutazione macroscopica dei margini è l'unica richiesta.

A METHOD FOR THE RAPID PREPARATION OF FRESH TISSUES FOR THE MICROSCOPE.

LOUIS B. WILSON, M.D.
Pathologist St. Mary's Hospital.
ROCHESTER, MINN.

While engaged in general pathologic work I shared the common distrust of frozen sections of fresh tissues for microscopic diagnosis. On taking charge recently of the laboratories of the Drs. Mayo, surgeons, I carefully tested the various methods hitherto published and found them either too slow for results while the patient waits under the anesthetic or else giving poorly differentiated cell detail. After considerable experimentation the following technic was discovered, and for the last six months it has given uniformly excellent preparations:

1. Bits of fresh tissue not more than 2x10x10 mm. are frozen in dextrin solution and cut in sections of from 10 to 15 microns thick.
2. The sections are removed from the knife with the tip of the finger and allowed to thaw thereon.
3. The sections are unrolled with camel's-hair brushes in 1 per cent. NaCl solution.
4. The sections are stained from 10 to 20 seconds in neutral Unna's polychrome methylene blue.
5. They are washed out in 1 per cent. NaCl solution.
6. They are mounted in Brun's glucose medium.

The microtome which I use is the Spencer automatic with a CO₂ attachment in which vulcanite is substituted for brass in the wall of the freezing chamber, thus insulating the freezing plate. Thawing the section on the finger prevents to a great extent the formation of bubbles. The well-made camel's-hair brushes used by artists are much more useful for handling tissues than those usually furnished by laboratory supply houses. A heavy, shallow watch glass over a black surface is the best receptacle in which to unroll sections. Sections are best handled in the stain folded over a lifter made of a small glass rod drawn out and bent at convenient angle. The section is kept constantly moving while it is in the stain. The stain is contained in a minute cup to facilitate the rapid recovery of the section should it slip from the lifter. Washing out is done in several ounces of salt solution in a white porcelain dish and is continued only while the stain comes away freely. Brun's glucose medium (which is made by mixing distilled water 140 c.c., glucose 40 c.c., and glycerin 10 c.c., then adding camphorated spirit 10 c.c. and filtering), is held in an oval dish of porcelain (an "undecorated match safe") of such a size that a three-inch slide will rest in a slanting position, with one end in the bottom of the dish and the other on its edge. The section is spread out on the slide while it is in this position. The slide is then carefully withdrawn from the dish, the excess fluid removed, a cover-slip dropped over the section and the specimen is ready for the microscope.

The whole process can be gone through in one and a half minutes from the time the tissue is placed on the freezing plate of the microtome until the stained specimen is on the stage of the microscope. The resulting coloring is uniformly good with the tissue elements sharply contrasted in red, purple and dark blue.

A diagnosis may be made from such preparations in a large percentage of surgical cases in which a diagnosis is possible by a study of sections of the same thickness cut from fixed tissues and stained with hematoxylin and eosin.

Figura 8.1: Wilson, L. B. A method for the rapid preparation of tissues for the microscope. J. Am. Med. Assoc. 45, 1737 (1905).

8.5 Finalità del FSE

Il principale obiettivo dell'Esame con Sezione Congelata (FSE) è fornire una valutazione istologica rapida che permetta decisioni terapeutiche in tempo reale, essenziali nelle procedure intra- o peri-operatorie. Questo strumento diagnostico è cruciale in situazioni in cui la conferma immediata della natura patologica del tessuto influenza direttamente il corso dell'intervento e, in ultima analisi, l'outcome del paziente.

Le diagnosi per le quali l'FSE è comunemente richiesto includono:

- **Identificazione di processi patologici sconosciuti:** In presenza di tessuti o lesioni la cui natura non è chiara, l'FSE permette di determinare se il processo è maligno, benigno o reattivo, consentendo di adattare la procedura chirurgica alle necessità del paziente.
- **Valutazione dei margini di resezione:** Uno degli usi più frequenti dell'FSE è la verifica dei margini chirurgici per garantire che tutto il tessuto neoplastico sia stato rimosso, riducendo il rischio di recidiva e minimizzando la necessità di interventi aggiuntivi.
- **Identificazione di metastasi nei linfonodi:** L'FSE permette di rilevare la presenza di metastasi linfonodali, informazione essenziale in neoplasie come il carcinoma mammario o il melanoma, dove il coinvolgimento linfonodale può influenzare il piano di trattamento post-operatorio.
- **Conferma della presenza di tessuto lesionale:** Prima della rimozione definitiva o della raccolta di campioni per studi speciali, l'FSE conferma che il tessuto lesionale è presente, riducendo l'invasività della procedura e ottimizzando il campionamento per l'analisi finale.

8.6 Limiti delle Sezioni Congelate

Le sezioni congelate rappresentano uno strumento essenziale nella diagnostica intraoperatoria, ma presentano alcuni limiti significativi rispetto alle sezioni permanenti. Questi limiti devono essere ben compresi da patologi e chirurghi per evitare interpretazioni errate o decisioni operative subottimali.

- **Campionamento:** A causa della necessità di operare rapidamente, il tessuto disponibile per l'FSE può essere ridotto, il che comporta un rischio di rappresentazione incompleta. Questo aspetto è particolarmente rilevante nei casi di valutazione dei margini chirurgici dove i margini possono risultare difficili da interpretare.

- **Assenza di studi speciali:** Le sezioni congelate non consentono l'esecuzione di colorazioni speciali, immunoistochimica o altre tecniche avanzate, che spesso sono fondamentali per una diagnosi definitiva. L'assenza di questi studi riduce la capacità diagnostica dell'FSE, specialmente per patologie rare o complesse.
- **Artefatti di congelamento e colorazione:** Il processo di congelamento rapido e colorazione affrettata può introdurre artefatti che complicano l'interpretazione microscopica. Ad esempio, le distorsioni cellulari indotte dal congelamento possono mascherare i dettagli morfologici e interferire con l'accuratezza della diagnosi.

8.7 Artefatti

Gli artefatti derivanti dal processo di congelamento e dalla colorazione rapida possono influire negativamente sull'accuratezza diagnostica. Minimizzare tali artefatti è essenziale per mantenere la qualità dell'FSE e garantire diagnosi precise.

Artefatti di Congelamento: Questi artefatti si manifestano quando il tessuto subisce il congelamento rapido necessario per il taglio istologico. Tra gli effetti più comuni vi sono la formazione di cristalli di ghiaccio che possono dislocare le strutture cellulari e mascherare dettagli importanti. L'uso di criostati moderni e di tecniche di congelamento controllato riduce l'incidenza di questi problemi.

Artefatti di Colorazione: La colorazione accelerata del campione, necessaria per la diagnosi intraoperatoria, può comportare variazioni nell'intensità dei coloranti, alterando la qualità dell'immagine microscopica. L'adozione di protocolli standardizzati e la scelta di coloranti ottimali sono strategie efficaci per limitare tali artefatti.

8.8 FSE Inappropriate

L'uso dell'FSE dovrebbe essere attentamente valutato per evitare interventi non necessari o dannosi per il paziente. Si riconoscono tre principali categorie di sezioni congelate inappropriate:

1. **Inappropriate, ma non dannose per il paziente:** Ad esempio, eseguire una sezione congelata su una massa tumorale ampia senza che sia previsto ulteriore trattamento chirurgico fino alla diagnosi definitiva

può rappresentare un uso inefficiente delle risorse, aumentando i costi della procedura senza apportare benefici clinici.

2. **Inappropriate e potenzialmente dannose:** In casi di lesioni primarie molto piccole, come alcune lesioni cutanee pigmentate o noduli al seno, l'intero tessuto potrebbe essere compromesso. Le lesioni pigmentate, in particolare, sono soggette a distorsione durante il congelamento, rendendo difficile una diagnosi accurata e potenzialmente impedendo l'analisi permanente.
3. **Bassa sensibilità e specificità, ma raramente utili:** In alcune situazioni particolari, come l'esame dei margini di lesioni follicolari tiroidee, il FSE potrebbe risultare d'aiuto in casi specifici, ma con sensibilità e specificità limitate. È essenziale che il chirurgo sia informato della possibilità di cambiamenti nella diagnosi su sezioni permanenti, e in questi casi è cruciale una collaborazione stretta con il patologo.

8.9 Consulto Intraoperatorio

Il consulto intraoperatorio con il patologo prima dell'FSE è un elemento essenziale per assicurare un'interpretazione accurata e appropriata del tessuto. Ecco alcuni elementi da considerare:

- **Identificatori del paziente e storia clinica rilevante:** Il chirurgo dovrebbe fornire informazioni dettagliate sul paziente e sulle patologie in corso, soprattutto in presenza di infezioni come HIV, epatite B o C, e tubercolosi (TB), che rappresentano un rischio per il personale di laboratorio.
- **Conferma delle caratteristiche del campione:** Un'accurata documentazione delle caratteristiche macroscopiche del campione e la conferma della sua posizione anatomica sono indispensabili. Questa documentazione fornisce una base per confronti futuri, facilitando l'interpretazione dei risultati.
- **Motivo dell'esame intraoperatorio:** Se lo scopo dell'esame intraoperatorio non è chiaro, bisogna contattare il chirurgo per evitare azioni inappropriate.

8.10 Accuratezza della Sezione Congelata

L'accuratezza dell'FSE varia in base all'obiettivo diagnostico specifico. Per quanto riguarda la valutazione dei margini, le metastasi linfonodali e l'identificazione tissutale, l'accuratezza può raggiungere il 100%. Tuttavia, per la diagnosi di processi patologici sconosciuti, l'accuratezza è inferiore, approssimativamente all'80%.

In generale, l'FSE ha un'accuratezza riportata tra il 94% e il 97% rispetto alla sezione permanente. Il College of American Pathologists (CAP) suggerisce che un tasso accettabile di discrepanza significativa sia intorno al 3%, un valore considerato sicuro per l'accuratezza diagnostica in ambito intraoperatorio.

8.11 Conclusioni

L'uso dell'FSE deve essere riservato a situazioni in cui è probabile che il risultato influenzi la gestione intra- o peri-operatoria del paziente. Sebbene l'FSE offra alta accuratezza in molte applicazioni, è necessario che chirurghi e patologi siano consapevoli dei suoi limiti, lavorando insieme per garantire la sicurezza e l'efficacia delle decisioni cliniche. Il ruolo del patologo è quindi quello di mediare tra le esigenze diagnostiche e la sicurezza del paziente, evitando sezioni congelate inutili o inappropriate.

Capitolo 9

Tecnica del dell'esame intraoperatorio

Tagliare sezioni congelate con un criostato è un processo tecnico complesso che richiede abilità raffinate e una comprensione della istologia tissutale, della microanatomia e della patologia. L'obiettivo è preparare rapidamente vetrini di alta qualità per l'interpretazione microscopica, sia per diagnosi intraoperatoria in patologia chirurgica che per applicazioni di ricerca. Sviluppare abilità e sensibilità nell'uso del pennello consente di tagliare sezioni ripetute in movimento continuo senza esitazioni, in modo simile al suonare uno strumento musicale.

9.0.1 Preparazione e configurazione del criostato

Prima di iniziare il processo di sezionamento, è fondamentale assicurarsi che il criostato e i suoi componenti siano correttamente configurati e mantenuti.

- **Inserire il supporto (chuck) e controllare il criostato:** Il blocco di tessuto deve essere **ben fissato** nel supporto del chuck. Tutti i pomelli, leve o viti di fissaggio per la lama, il portalama, il chuck, il supporto del chuck e il micrometro devono essere **ben serrati e privi di detriti** per evitare qualsiasi movimento che possa influenzare lo spessore delle sezioni. Anche un leggero movimento può compromettere sezioni sottili fino a 5 micron.
- **Il pennello per sezioni congelate:** Il pennello viene usato per afferrare il bordo della sezione mentre viene tagliata e guidarla sul piano del criostato.

- **Selezione:** Sono consigliati pennelli a setole rigide, come quelli piatti da 3/16 o 1/4 di pollice (spesso reperibili nei negozi di articoli per artisti), piuttosto che pennelli flosci in pelo di cammello, grazie alla loro superficie di presa più ampia e funzionalità, soprattutto quando la sezione tende ad arricciarsi.
 - **Preparazione:** Tagliare le setole del pennello a un angolo di circa 45 gradi, in modo che, tenuto inclinato, il pennello incontri il tessuto in modo piatto, come una scopa angolata. L'eccesso di manico dei pennelli lunghi da artista dovrebbe essere rimosso.
 - **Pulizia:** Mantenere il pennello pulito riduce l'aderenza delle sezioni, in particolare nei tessuti grassi. Una rapida procedura di pulizia prevede sapone e acqua, asciugatura rapida con garza, immersione in alcol (ETOH) e xilene con asciugatura veloce, seguita dal raffreddamento del pennello sulla superficie fredda del criostato.
 - **"Brush-brush":** È possibile realizzare un "brush-brush" fissando un pezzo di garza o un piccolo pennello vicino alla mano sinistra all'interno del criostato, permettendo all'operatore di pulire rapidamente il pennello mantenendo il movimento continuo.
- **La lama:** Si consiglia di utilizzare una nuova lama monouso per ogni campione del paziente, al fine di garantire la migliore qualità di sezione.
 - **Usura:** Tessuti duri, collagene o calcificati possono smussare rapidamente la lama, rendendo necessaria la sostituzione quando la qualità della sezione diminuisce.
 - **Sicurezza:** Cambiare la lama per ogni caso è una misura di sicurezza importante, poiché riduce il rischio di trasmissione di malattie in caso di tagli accidentali.
 - **Ascoltare la lama:** Una buona sezione non dovrebbe produrre suoni. Rumori stridenti o vibrazioni indicano problemi come un blocco troppo freddo, un angolo della lama errato, movimento o detriti nel supporto lama.
 - **Angolo della lama:** L'angolo corretto della lama dovrebbe essere leggermente superiore all'angolo del bisello inferiore della lama, ma il meno possibile, per evitare la compressione del tessuto o la piegatura della sezione. Questo vale sia per i microtomi vibranti che per i criostati.
 - **Posizione del corpo e della mano:**

- **Posizione del corpo:** È consigliato sedersi comodamente su uno sgabello regolabile, a un'altezza che consenta alle braccia di poggiare comodamente sul piano del criostato, per massimizzare il controllo della mano che usa il pennello. Evitare di incurvarsi.
- **Impugnatura del pennello:** Tenere il pennello come una penna con la mano sinistra, stabilizzando la mano appoggiando delicatamente il lato del mignolo sul piano del criostato. Ciò consente di usare le abilità motorie fini delle dita, come nella scrittura. Il pennello va tenuto a circa 45 gradi rispetto sia alla faccia del blocco che al piano.

9.0.2 Rifilatura del blocco

Rifilare, o livellare, il blocco ha lo scopo di rimuovere rapidamente la superficie più esterna fino a raggiungere la profondità e i punti di riferimento desiderati.

- **Avanzamento grossolano e fine:** Usare il meccanismo di avanzamento grossolano del criostato per rimuovere rapidamente gli strati iniziali. Quando i punti di riferimento diventano visibili, passare al controllo fine o girare manualmente la ruota del criostato per una rifilatura precisa.
- **Lettura del blocco:** Il criotomista deve imparare a riconoscere grossolanamente l'anatomia e i punti di riferimento sulla faccia del blocco e capire come il tessuto rifilato si relaziona all'area che il patologo esaminerà al microscopio. Questo comporta distinguere una “faccia prematura” (dove la struttura sembra presente ma è sfocata o non completamente esposta) da una “faccia matura” (dove tutti i punti di riferimento sono chiaramente visibili con linee nette e colori vividi). Il confronto tra la faccia del blocco e la sezione tagliata può aiutare.
- **Asse X-Y e orientamento:** Per ridurre al minimo lo spreco di tessuto e ottenere completamente la faccia desiderata con poca rifilatura, il tessuto deve essere incorporato in un piano piatto e il blocco correttamente orientato sull'asse X-Y (il piano della faccia del blocco deve essere parallelo al piano della lama).
 - **Regolazione:** Le regolazioni dell'orientamento del blocco devono essere fatte in incrementi molto piccoli. Un blocco ben orientato incontrerà per primo la lama al centro. Se invece inizia a tagliare da un bordo o un angolo, l'orientamento X-Y va corretto

spostando indietro la parte tagliata e in avanti quella non ancora raggiunta.

- **Rotazione del blocco:** Molti criostati permettono la rotazione del blocco a 360 gradi, permettendo all'operatore di orientare il tessuto in modo ottimale rispetto alla lama. Questo è particolarmente utile se emergono elementi grassi o calcificati inattesi, o se il tessuto si arriccia, permettendo di fare in modo che gli elementi problematici tocchino la lama per ultimi. Attenzione: ruotare il blocco può alterare la sua orientazione X-Y, rendendo necessaria una nuova regolazione.
- **Rimozione e reinserimento del blocco:** Quando si rimuove il blocco, fare un piccolo segno alle ore 12 per poterlo riposizionare nel chuck nello stesso modo, evitando cambiamenti di orientamento e spreco di tessuto. Riportare sempre il blocco indietro prima di rifilare nuovamente per valutare eventuali variazioni di orientamento.
- **Rifilatura di campioni minuti:** Per biopsie minute o core biopsies sottili (meno di un millimetro di diametro), è essenziale incorporare il tessuto nel piano più piatto possibile e iniziare con un blocco ben orientato. Se il tessuto è visibile ma non coperto da mezzo di inclusione, iniziare con uno strato di copertura. Rifilare delicatamente, osservando il tessuto mentre viene scoperto, e tagliare sezione per sezione per preservare materiale per sezioni in paraffina.

9.0.3 Taglio delle sezioni finali: tecnica del pennello in movimento continuo

L'obiettivo è girare la ruota del criostato in modo continuo e uniforme, senza esitazioni, imitando un criostato automatizzato. Il pennello guida la sezione appena tagliata verso il piano del criostato.

- **Quattro movimenti semplici** (che creano un percorso ellittico del pennello):
 1. **Seguire il blocco:** Dalla posizione iniziale (come una base nel baseball, centro, ultimi due millimetri inferiori del blocco), il pennello si muove verso il basso, seguendo il blocco mentre scende verso la lama [207, 209a].
 2. **Sollevare delicatamente durante l'attraversamento della lama:** Quando il pennello incontra la lama, si solleva delicatamente tenendo il bordo della sezione appena formata [207, 209b].

3. **Trattenere l'arricciamento:** Quando la sezione si arriccia, il pennello in movimento si posiziona sopra il ricciolo, trattenendolo. Poi il pennello cambia direzione in un movimento orizzontale verso l'operatore, seguendo una forma a "gomito" [208, 209b].
 4. **Far scivolare la sezione sul piano:** Continuare il movimento orizzontale, trascinando delicatamente la sezione sul piano, senza premere il tessuto contro il piano, per evitare aderenze o sbavature, soprattutto nei tessuti adiposi.
- **Uso del "manico":** Preparare i blocchi con un bordo di mezzo di inclusione ("manico") attorno al tessuto è vantaggioso. Questo bordo fornisce un margine di sicurezza per afferrare la sezione senza toccare direttamente il tessuto, stabilizza tessuti più fragili (es. necrotici o grassi) e offre uno "slancio iniziale" per sezioni difficili.

9.0.4 Recupero della sezione

Recuperare la sezione consiste nel trasferire la sezione congelata tagliata su un vetrino per microscopio. Questo va fatto tenendo conto della delicatezza del tessuto e della cinetica del processo, per evitare piegature, stiramenti o lacerazioni.

- **Recupero dal piano:** Tenere il vetrino appena sopra la sezione e inclinarlo verso il basso per toccare una parte del tessuto. L'attrazione elettrostatica farà aderire la sezione e scioglierla rapidamente sul vetrino caldo. Si può usare la punta del dito per stabilizzare il bordo anteriore del vetrino mentre lo si abbassa. Se è difficile recuperare la sezione, lasciar cadere il vetrino da circa mezzo centimetro sopra il tessuto. Pennelli puliti aiutano a prevenire l'adesione. Le sezioni tagliate alla temperatura ideale restano piatte e sono più facili da recuperare e posizionare.
- **Recupero dal blocco:** In caso di difficoltà nel recupero dal piano (es. arricciamento, aderenza o elettricità statica), tagliare il tessuto lasciando 1–2 mm prima del distacco completo. Girare la ruota del criostato all'indietro per riportare la sezione ancora attaccata sopra la faccia del blocco. Il bordo fisso della sezione può quindi essere delicatamente tirato verso il basso con il pennello, mentre il vetrino viene posizionato sopra il blocco per raccogliere la sezione.

9.0.5 Variabili che influenzano le proprietà di taglio dei tessuti

La qualità delle sezioni congelate è fortemente influenzata da vari fattori, principalmente dalla temperatura del blocco. Riconoscere gli artefatti quando compaiono consente correzioni tempestive.

- **Temperatura del blocco:**

- **Blocco troppo caldo:** Se il mezzo di inclusione ha un tono grigiastro, il tessuto si accartoccia o viene “strappato via” (completamente estratto dal blocco) perché non è abbastanza solido o non si è ancora indurito rispetto al mezzo.
- **Stadio di accartoccamento:** Raffreddandosi, le sezioni iniziano a formarsi ma si accartocciano leggermente, segnalando che il tessuto non è ancora abbastanza rigido da mantenere la forma.
- **Temperatura ideale:** Quando il tessuto inizia a produrre sezioni complete e pulite con facilità (tipicamente tra -16 e -20°C per la maggior parte dei tessuti), ha raggiunto la temperatura ideale. A questa temperatura, le sezioni restano piatte, si arricciano poco e non si spezzano, consentendo il taglio a nastro.
- **Blocco troppo freddo:** Sotto i -25°C aumentano arricciamento e fratture, ostacolando l'interpretazione. Blocchi eccessivamente raffreddati possono anche causare sezioni irregolari o “vibrazioni” (chatter).
- **Regolare la temperatura:**
 - * **Riscaldare:** Per blocchi troppo freddi, premere delicatamente il pollice guantato o il palmo sulla faccia del tessuto per alcuni secondi. Si può anche usare un estrattore di calore rivestito con nastro adesivo. Agire rapidamente: il riscaldamento è temporaneo.
 - * **Raffreddare:** Per blocchi troppo caldi o che si accartocciano, applicare un blocco di raffreddamento sopra il chuck o un estrattore di calore per alcuni secondi. Si possono usare spray congelanti, soprattutto per tessuti grassi, con cautela per evitare sovraraffreddamento e aerosolizzazione.
- **Taglio a nastro:** Avviene quando il tessuto è alla temperatura ideale, con pennello e piano puliti, e tecnica a movimento continuo.

- **Comportamento di taglio di tessuti specifici:**

- **Tessuti molli non grassi:** Si tagliano facilmente con una lama affilata e buona tecnica, anche in pezzi grandi.
- **Tessuti acquosi** (es. cervello, tessuti edematosi): Tendono a frantumarsi; sezionare alla temperatura più calda possibile. La frantumazione aumenta con lo spessore della sezione.
- **Tessuti collagenosi duri** (es. cuoio capelluto, cervice): Si tagliano bene in piccoli pezzi. In pezzi grandi possono causare chatter o sezioni irregolari. Scaldare il blocco fino allo stadio di accartoccamento, poi raffreddare delicatamente alla temperatura ideale. Orientare l'asse lungo diagonalmente o perpendicolare alla lama.
- **Tessuti ossei duri:** Danneggiano rapidamente le lame monouso. Per osso trabecolare, rafilare, cambiare lama e tagliare con pochi giri. L'osso corticale solitamente non si taglia con lame monouso; si può rimuovere "scavando" e poi stuccando il difetto.
- **Tessuti necrotici o liquefatti:** Possono lasciare buchi e staccarsi durante la colorazione per perdita di integrità strutturale. Includere tessuto vitale se possibile. Un manico di mezzo e il movimento continuo aiutano. Minimizzare l'agitazione durante la colorazione.
- **Tessuti adiposi:** Il "nemico giurato" del criotomista. Il grasso si spalma e impedisce il taglio perché non congela sufficientemente alle temperature normali e aderisce male al mezzo.

* **Tecniche:**

1. **Rimuovere il grasso non necessario:** Eliminare accuratamente il grasso dai linfonodi migliora la qualità della sezione.
2. **Lama affilata e blocco molto freddo:** Essenziali per sezionare tessuti grassi. Usare spray congelanti, teste criogeniche, azoto liquido, ecc.
3. **Pulire piano e lama:** Rimuovere qualsiasi residuo o tessuto spalmato.
4. **Sezioni spesse di grasso:** Sezioni più spesse (es. 50 μm) possono risultare trasparenti e interpretabili, mostrando strutture in 3D. Aumentare i tempi di colorazione e ridurre l'agitazione.
5. **Tecnica "scavo del grasso":** Il grasso morbido può essere raschiato via con una pinza e il difetto riparato con stucco.

- 6. **Applicare azoto liquido:** Indurisce direttamente gli elementi grassi.
- **Arricciamento inverso:** Si verifica quando il tessuto si separa dal mezzo di inclusione, spesso per presenza di grasso, epidermide o tessuto necrotico. Il diverso comportamento tra tessuto e mezzo causa il problema.
 - * **Rimedi:** Scaldare il blocco alla temperatura ottimale. Se causato da grasso, usare la tecnica dello scavo e stuccare. Per l'epidermide, incidere con un bisturi in punti specifici (es. ore 3, 6, 9) e stuccare. Incorporare la pelle con epidermide perpendicolare alla lama e punte allontanate dalla lama aiuta.
- **Spessore della sezione:** Ideale intorno a 5 μm per la diagnosi, anche se 6 μm è spesso preferito per una colorazione più intensa. Sezioni più sottili (es. 3 μm) sono più flessibili; quelle più spesse (es. 10 μm) più rigide. La conferma visiva è importante poiché il criostato può essere impreciso. Il movimento continuo aiuta a mantenere lo spessore costante.
- **Sezioni spesse e sottili / Striature e vibrazioni:**
 - * **Sezioni spesse e sottili alternate:** Possono essere causate da stress sulla lama o angolo errato. Una lama arcuata può tagliare i bordi lasciando il centro intatto.
 - * **Striature sottili:** Perpendicolari alla lama, indicano incisioni sulla lama, spesso causate da tessuti calcificati, punti di sutura, graffette o urti accidentali.
 - * **Striature larghe / lacerazioni:** Dovute all'adesione del tessuto sotto la lama, frequenti nei tessuti grassi. La lama va pulita o sostituita.
 - * **Chatter (linee ondulate):** Linee ondulate regolari indicano movimento nel sistema. Tutti i componenti devono essere saldi e privi di detriti. Può anche essere causato da tessuto troppo duro o freddo per essere tagliato senza stress.

9.1 Artefatti e consigli professionali per evitarli

Come tecnico di laboratorio che esegue sezioni al congelatore, la comprensione e la mitigazione degli artefatti sono cruciali per produrre vetrini di alta qualità e garantire un'interpretazione microscopica accurata. La vostra

capacità di riconoscere questi problemi non appena si presentano e di applicare misure correttive ridurrà significativamente gli errori e farà risparmiare tempo prezioso.

9.1.1 Artefatti legati alla temperatura

La temperatura del blocchetto di tessuto è probabilmente una delle variabili più critiche che influenzano la qualità delle sezioni al congelatore.

Stadio di accartocciamento

Quando un blocchetto congelato è **troppo caldo**, tipicamente indicato dal mezzo di inclusione che ha ancora una tonalità leggermente grigiastra, il tessuto si accartoccerà completamente durante il taglio. Ciò si verifica perché il tessuto non è abbastanza solido da mantenere una forma piatta, simile a un foglio di carta. Man mano che il blocchetto si raffredda, le sezioni possono iniziare a formarsi ma si accartocceranno ancora leggermente poiché il tessuto non è abbastanza rigido da mantenere la sua vera forma e l'attrito del coltello lo fa ammassare.

Frantumazione

Al contrario, se il blocchetto di tessuto è **troppo freddo**, le sezioni diventeranno dure e rigide, portando a una tendenza a **frantumarsi** o rompersi mentre vengono tagliate. Questo perché la lama, agendo come un cuneo, costringe il tessuto a piegarsi; se il tessuto è troppo duro per flettersi, si romperà. La frantumazione aumenta con la diminuzione delle temperature, lo spessore maggiore della sezione e un più alto contenuto di acqua nel tessuto. Ciò può ostacolare gravemente l'interpretazione.

Distacco di frammenti

Un artefatto particolarmente frustrante si verifica quando il tessuto viene **"staccato a pezzi"** dal blocchetto. Questo accade quando il tessuto o il mezzo di inclusione non è completamente congelato, il che significa che il mezzo non ha aderito saldamente al tessuto. Quando la lama tenta di tagliare, gli elementi fibrosi nel tessuto non congelato resistono al taglio e causano il distacco del tessuto dal blocchetto. Questo è spesso visibile come una dominante grigiastra nel blocco di inclusione.

Consigli professionali per la regolazione della temperatura

- **Temperatura ideale:** L'obiettivo è tagliare la maggior parte dei tessuti (esclusi i tessuti adiposi) a una temperatura ideale, tipicamente intorno a -17°C a -20°C . A questa temperatura, le sezioni di tessuto scorreranno in modo pulito sulla lama, con minimo arricciamento o frantumazione, e si adageranno piatte sul piatto del criostato, consentendo un facile recupero e persino la formazione di nastri. Anche i tessuti acquosi come il cervello e i tessuti duri si sezionano meglio in questo intervallo.
- **Riscaldare un blocchetto troppo freddo:** Se un blocchetto è troppo freddo e si frantuma, è possibile riscaldarne la superficie premendo delicatamente il pollice guantato o il palmo della mano sul tessuto per alcuni secondi. Prestare attenzione alla vicinanza della lama e assicurarsi che il volantino del microtomo sia bloccato per prevenire infortuni. Un'alternativa più sicura è un estrattore di calore coperto con nastro adesivo a temperatura ambiente. Dopo il riscaldamento, la prima sezione potrebbe essere più spessa, quindi tagliare rapidamente alcune sezioni fino a ottenere lo spessore e la qualità appropriati.
- **Raffreddare un blocchetto caldo:** Se un blocchetto è troppo caldo e si accartoccia, raffreddarlo applicando un blocco di congelamento sopra il chuck o un estrattore di calore sulla superficie del blocchetto per alcuni secondi. Si possono anche usare spray congelanti, ma con giudizio, poiché possono raffreddare eccessivamente il blocchetto.
- **Movimento continuo:** Tagliare con un movimento continuo e uniforme aiuta a stabilire un equilibrio di temperatura e consistenza, portando a spessore e qualità più uniformi.

9.1.2 Difficoltà di taglio specifiche per tessuto

Diversi tipi di tessuto presentano sfide uniche a causa delle diverse composizioni di grasso, acqua e collagene, nonché della loro durezza intrinseca.

Tessuti adiposi

I tessuti adiposi sono la "nemesi" del criotomista.

- **Spalmatura:** Il grasso non congela bene e deve essere raffreddato a temperature molto basse per indurirsi abbastanza per il sezionamento.

Se non è abbastanza freddo, il grasso si spalmerà e impedirà il taglio di qualsiasi tessuto sul suo percorso.

- **Arricciamento e scarsa aderenza:** Il grasso non aderisce bene al mezzo di inclusione. Se un tessuto più gestibile (come un linfonodo) è circondato da grasso, il grasso può impedire l'adesione, causando l'arricciamento del tessuto lontano dal mezzo, lasciando dei buchi.
- **Consigli professionali:**
 - **Dissezione del grasso in eccesso:** Rimuovere meticolosamente il grasso non essenziale, specialmente intorno ai linfonodi, per migliorare la qualità della sezione.
 - **Lama affilata e blocchetto freddo:** Usare una lama nuova e affilata. Raffreddare il blocchetto a temperature molto basse usando spray congelante, un estrattore di calore a bassissima temperatura o la testa di congelamento del criostato. L'azoto liquido può essere applicato direttamente sulle aree adipose con un pennello.
 - **Orientare il grasso per ultimo:** Quando possibile, orientare il tessuto in modo che il grasso colpisca la lama per ultimo o da solo, e assicurarsi sempre che ci sia una "maniglia" di mezzo di inclusione che circonda il tessuto. Questa maniglia fornisce supporto e tiene insieme la sezione, anche se il grasso si spalma.
 - **Sezioni spesse di grasso:** Per alcune interpretazioni (ad es. margini mammari nella chirurgia di Mohs), può essere utile prelevare sezioni più spesse di grasso (ad es. $50\mu\text{m}$). Queste possono fornire una visione tridimensionale in cui il grasso è trasparente, consentendo la visualizzazione di strutture come capillari e cellule tumorali. Aumentare i tempi di colorazione e utilizzare un'agitazione minima per le sezioni più spesse.
 - **La manovra di sgombero del grasso:** Se il grasso impedisce il taglio, è possibile rimuoverlo dal blocchetto usando una pinza o un altro strumento, quindi riparare il difetto "intonacando" con mezzo di inclusione.

Tessuti collagene duri

Tessuti come il cuoio capelluto e la cervice sono duri e possono stressare la lama, specialmente a basse temperature o con lame più sottili. Questo può portare a sezioni spesse e sottili o a vibrazioni (chatter).

- **Consigli professionali:** Tagliare pezzi più piccoli. Per pezzi grandi, riscaldare il blocchetto fino allo stadio di accartoccamento, quindi raffreddare di nuovo delicatamente fino a quando le sezioni si formano. Posizionare l'asse lungo del tessuto in diagonale o perpendicolarmente alla lama per minimizzare il diametro effettivo e ridurre lo stress.

Tessuti acquosi

I tessuti con un alto contenuto di acqua, come il cervello o i tessuti edematosi, hanno una maggiore tendenza a frantumarsi a causa della formazione di cristalli di ghiaccio.

- **Consigli professionali: Sezionare alla temperatura più calda possibile.** Iniziare leggermente caldi e raffreddare con un estrattore di calore se necessario. La frantumazione aumenta anche con lo spessore della sezione, quindi considerare di tagliare più sottile se problematico.

Tessuti necrotici e liquefattivi

Questi tessuti hanno perso l'integrità strutturale e possono lasciare buchi al sezionamento o staccarsi durante la colorazione.

- **Consigli professionali:** Campionare macroscopicamente per includere tessuto vitale per il supporto strutturale. Una maniglia di mezzo di inclusione aiuterà a sostenere la sezione. Usare una lama affilata e un movimento continuo. Ridurre al minimo l'agitazione durante la colorazione.

Tessuti duri e ossei

I tessuti contenenti osso trabecolare possono essere sezionati, ma **danneggeranno rapidamente le lame monouso**. L'osso corticale è generalmente troppo duro per le lame monouso.

- **Consigli professionali:** Per l'osso trabecolare, rifilare il blocchetto, quindi passare a una nuova sezione della lama prima di prelevare la sezione finale. Usare il minor numero di giri possibile e prevedere cambi multipli della lama. Per l'osso corticale, rimuovere l'osso e riparare il blocchetto "intonacando".

9.1.3 Artefatti meccanici e tecnici

Anche i problemi legati alla meccanica del criostato o alla tecnica dell'operatore possono introdurre artefatti.

Sezioni spesse e sottili / Vibrazioni (Chatter)

Questo si manifesta come sezioni alternate più spesse e più sottili dell'impostazione desiderata.

- **Cause:**

- **Sovraccarico della lama:** Troppa resistenza del tessuto può stressare la lama.
- **Angolo della lama improprio:** Un angolo della lama errato può causare compressione.
- **Componenti allentati:** Qualsiasi allentamento nel portalama, nel chuck, nel portachuck o nei meccanismi del microtomo causerà movimento e porterà a spessore di sezione incoerente o "vibrazioni".
- **Fluttuazione di temperatura:** Quando il blocchetto riposa per più di pochi secondi, i cambiamenti di temperatura superficiale possono causare espansione, portando a una prima sezione più spessa seguita da altre più sottili.

- **Consigli professionali:**

- **Garantire la tenuta:** Controllare regolarmente che tutte le manopole, le leve e le viti di bloccaggio siano strette e prive di detriti.
- **Ottimizzare l'angolo della lama:** L'angolo corretto della lama dovrebbe essere leggermente al di sopra dell'angolo dello smusso inferiore della lama, ma il più piccolo possibile, per evitare la compressione o l'eccessiva piegatura del tessuto.
- **Movimento continuo:** Mantenere un movimento fluido e continuo durante il taglio per garantire uno spessore uniforme.

Strie

- **Strie sottili:** Sono linee perpendicolari alla lama, che indicano tipicamente intaccature sulla lama. Ciò può essere causato da calcificazioni, suture o graffette nel tessuto, o toccando accidentalmente il bordo della lama su una superficie dura.
- **Consiglio professionale:** Cambiare con una lama nuova e affilata.

- **Strie larghe / Lacerazione:** Si verifica quando il tessuto (spesso tessuto adiposo) aderisce alla parte inferiore della lama.
- **Consiglio professionale:** Rimuovere con cura la lama e pulirla o sostituirla. Invertire sempre il blocchetto prima di pulire o cambiare la lama.

Arricciamento (non legato al grasso)

Oltre ai tessuti adiposi, anche altre parti di tessuto possono separarsi dal mezzo di inclusione e arricciarsi. Questo è chiamato "**arricciamento**". Ad esempio, l'epidermide della pelle tende a separarsi a causa dello strato corneo desquamante.

- **Consigli professionali:**
 - **Riscaldare il blocchetto:** Riscaldare il blocchetto alla temperatura ottimale può minimizzare l'arricciamento sia del tessuto che del mezzo.
 - **Ruotare il blocchetto:** Se solo una parte si sta arricciando, ruotare il blocchetto in modo che il punto di separazione sia lontano dal coltello (l'ultimo a colpire il coltello).
 - **Intaccare e intonacare:** Per la pelle o il tessuto coperto di grasso incline all'arricciamento, intaccare la superficie epidermica o il grasso nella faccia del blocchetto in diversi punti (ad es. alle posizioni 3, 6 e 9) e quindi intonacare i difetti con mezzo di inclusione. Ciò espone il tessuto sottostante che aderisce meglio al mezzo.
 - **Orientamento per l'inclusione:** Quando si include la pelle, orientare l'epidermide perpendicolarmente alla lama e, se possibile, orientare le punte lontano dalla lama per minimizzare il ribaltamento.

Scarsa aderenza / Caduta del tessuto dal vetrino

Le sezioni occasionalmente cadono dal vetrino durante il processo di colorazione.

- **Cause:**
 - **Natura del tessuto:** Tessuti molto secchi, sclerotici o necrotici/liquefattivi hanno meno "colla" intrinseca o integrità strutturale per aderire al vetrino.

- **Sezioni sovrapposte:** Se una sezione si sovrappone al mezzo di inclusione di un'altra sezione sul vetrino, non aderirà altrettanto bene.
- **Soluzioni di colorazione:** Un viraggio all'ammoniaca troppo forte o l'uso errato di etanolo al 100% invece che al 95% nel barattolo del fissativo possono indebolire l'adesione. La fissazione in formalina può anche ridurre la coesione del tessuto.
- **Agitazione:** Un'agitazione eccessiva o vorticoso durante la colorazione esercita pressione sui bordi del tessuto, staccandoli, specialmente le strisce sottili con un alto rapporto perimetro/superficie.
- **Cartilagine:** Il tessuto cartilagineo ha un effetto di arricciamento naturale che lo rende incline a staccarsi.

- **Consigli professionali:**

- **Usare vetrini caricati:** Per una migliore aderenza, usare vetrini a carica positiva o vetrini rivestiti con polimeri come la polilisina.
- **Minima agitazione:** Immergere delicatamente i vetrini su e giù nelle soluzioni di colorazione, evitando movimenti vorticosi. Per i coloratori automatici, abbassare la pressione del lavaggio con acqua.
- **Riscaldare il retro del vetrino:** Dopo aver posizionato le sezioni, riscaldare brevemente il retro del vetrino per favorire l'adesione.
- **Acetone per la cartilagine:** Immergere brevemente i vetrini contenenti sezioni di cartilagine in acetone prima della fissazione con etanolo al 95%.
- **Garantire un congelamento adeguato:** Assicurarsi che il mezzo di inclusione sia diventato completamente bianco, indicando il congelamento completo e l'aggancio corretto con le scanalature del chuck, per evitare che il blocchetto si separi dal chuck.

9.1.4 Artefatti di preparazione e colorazione

Oltre al taglio, anche le fasi di preparazione macroscopica e di colorazione presentano opportunità per la creazione di artefatti.

Artefatto da essiccamento

Una volta che una sezione di tessuto o un campione citologico tocca un vetrino caldo, inizia immediatamente a sviluppare un artefatto da essiccamento se non viene fissato rapidamente.

- **Aspetto:** Causa ingrandimento cellulare e nucleare, dettagli nucleari sfumati, perdita di contrasto e offuscamento dei bordi citoplasmatici, facendo apparire le cellule come fuse o sparse sul vetrino.
- **Consigli professionali:** Fissare i vetrini il più rapidamente possibile. Avere i barattoli del fissativo aperti e immediatamente accessibili. Per le preparazioni citologiche essiccate all'aria (spesso usate con la colorazione Diff-Quick), assicurarsi uno strato sottile di cellule e un'asciugatura rapida (ad es. agitando il vetrino).

Margini errati/falsi (Inchiostrazione)

L'inchiostrazione dei margini di resezione è fondamentale per guidare il chirurgo. Errori in questa fase possono portare a interpretazioni falsamente positive o falsamente negative.

- **Falso negativo:** Si verifica quando l'inchiostro non viene applicato accuratamente a un vero margine di resezione, quindi il coinvolgimento tumorale non viene rilevato microscopicamente.
- **Falso positivo:** Risulta da superfici non marginali falsamente colorate (a causa di un'errata interpretazione anatomica, spalmatura o perdita), o da un vero margine etichettato erroneamente con il colore sbagliato. Un'applicazione eccessiva di inchiostro può portare a spalmatura, fuoriuscita nelle fessure o falsi margini.
- **Consigli professionali:**
 - **Applicazione meticolosa:** Applicare l'inchiostro con la massima precisione.
 - **Mordente:** Una rapida applicazione di acido acetico al 5% agisce come mordente per fissare l'inchiostro e prevenirne la diffusione.
 - **Asciugare il tessuto:** Asciugare sempre il tessuto e posizionarlo su un tovagliolo di carta asciutto prima di inchiostrare per evitare che l'inchiostro coli.

- **Tamponare:** Tamponare delicatamente i colori appena inchiostrati per rimuovere l'inchiostro in eccesso e prevenire la contaminazione delle superfici adiacenti.
- **Pulizia:** Cambiare i guanti se si sporcano, specialmente quando si usano più colori, per evitare la contaminazione incrociata.
- **Etichettatura convenzionale:** Stabilire e aderire a uno schema di etichettatura convenzionale per inchiostri multicolori (ad es. ROSSO per SUPERIORE, GIALLO per INFERIORE) per evitare confusione durante l'interpretazione microscopica.
- **Verificare:** Verificare sempre l'etichettatura del campione e l'identificazione del paziente. Comprendere i veri margini di resezione prima di inchiostrare. In caso di incertezza, chiedere chiarimenti al chirurgo.

Bolle d'aria (Montaggio del vetrino coprioggetto)

Le bolle d'aria sotto il vetrino coprioggetto possono oscurare l'immagine microscopica.

- **Cause:** Far cadere il vetrino coprioggetto, usare troppo mezzo di montaggio.
- **Consiglio professionale:** Applicare il mezzo di montaggio con cura (goccia da 4-5 mm). Utilizzare un metodo specifico per il montaggio del vetrino coprioggetto che minimizzi le bolle, come ad esempio appoggiare il vetrino sul coprioggetto contenente il mezzo con un movimento a cerniera. Se il mezzo è denso, diluirlo con xilene.

9.1.5 Considerazioni finali

Riconoscere questi artefatti e conoscere i "consigli professionali" per evitarli o correggerli fa parte del vostro percorso verso l'eccellenza nella tecnica delle sezioni al congelatore. Vi permette di diventare un collaboratore più efficace e affidabile per la diagnosi intraoperatoria rapida. *** Pensate alla preparazione di sezioni al congelatore di alta qualità come a uno chef esperto che prepara un delicato soufflé. Ogni ingrediente (tipo di tessuto), impostazione della temperatura (criostato) e tecnica (taglio, inclusione, colorazione) deve essere gestito con precisione. Proprio come un soufflé può sgonfiarsi, rompersi o diventare gommoso se un qualsiasi passaggio è sbagliato, una sezione al congelatore può subire frantumazioni, arricciamenti, spalmature o essiccamento se non maneggiata con cura esperta. La vostra comprensione

di queste variabili e la vostra capacità di regolarle sono gli ingredienti segreti per produrre costantemente un risultato perfetto.