

Metodi e tecniche di anatomia, isto e citologia

Salvatore Lorenzo Renne

October 9, 2024

Sommario

1	Fissazione tessuto istologico	7
1.1	Introduzione	7
1.1.1	Importanza della Fissazione dei Tessuti	7
1.1.2	Vantaggi e Svantaggi dei Fissativi	7
1.1.3	Perdita di Componenti Molecolari durante la Fissazione	7
1.1.4	Artefatti nei Tessuti Fissati	8
1.1.5	Conservazione della Struttura Molecolare	8
1.1.6	Interazione della Fissazione con Altri Processi	8
1.1.7	Fissativo Ideale in Patologia Diagnostica	8
1.1.8	Caratteristiche di un Buon Fissativo	8
1.2	Metodi Fisici di Fissazione	9
1.2.1	Fissazione per Calore	9
1.2.2	Fissazione con Microonde	9
1.2.3	Liofilizzazione e Sostituzione a Freddo	9
1.3	Fissazione Chimica	10
1.3.1	Fissativi Coagulanti	10
1.3.2	Fissativi Coagulanti Deidranti	10
1.3.3	Altri Tipi di Fissativi Coagulanti	12
1.3.4	Fissativi a Legame Incrociato Non Coagulanti	13
1.4	Fissazione con Formaldeide	13
1.4.1	Reazioni della Formaldeide con Proteine Nucleari e Acidi Nucleici	14
1.4.2	Catene Laterali Più Reattive con la Formaldeide	14
1.4.3	Reversibilità delle reazioni macromolecolari della formaldeide	14
1.4.4	Effetto del lavaggio prolungato	14
1.4.5	Conservazione a lungo termine in formalina	15
1.4.6	Importanza dei ponti metilenici	15
1.4.7	Correzione dell'iperfissazione	15
1.4.8	Tipi di legami crociati e loro stabilità	15
1.4.9	Saturazione dei tessuti con formalina	15

1.4.10	Effetto dell'acidità nella formalina	15
1.4.11	Uso della formalina acida in immunoistochimica	16
1.4.12	Effetto della formaldeide su proteine, nucleotidi e lipidi	16
1.5	Fattori che Influenzano la Qualità della Fissazione	16
1.5.1	Buffer e pH	16
1.5.2	Durata della Fissazione e Dimensione dei Campioni	17
1.5.3	Temperatura della Fissazione	18
1.6	Riassunto	18
2	Introduzione al campionamento	21
2.1	Introduzione	21
2.1.1	L'importanza dell'esame macroscopico	21
2.1.2	La dissezione come fase cruciale	21
2.1.3	L'esperienza è fondamentale per campioni complessi	22
2.2	Dall'accettazione alla processazione	22
2.2.1	Posizione ideale del laboratorio	22
2.2.2	Trattamento delle biopsie	22
2.2.3	La preparazione e la dissezione dei campioni	23
2.2.4	La stanza dell'accettazione	23
2.2.5	L'accettazione del campione	23
2.2.6	Regole per la verifica del campione	24
2.2.7	Il numero istologico	24
2.2.8	Valutazione iniziale dei campioni	24
2.2.9	Procedure speciali	24
2.2.10	Ruolo dei <i>Pathologists' Assistants</i>	25
2.2.11	La dissezione e il taglio del campione	25
2.3	Caratteristiche Generali della Sala Macroscopica	25
2.3.1	Dimensioni e Illuminazione	26
2.3.2	Stazioni di Lavoro	26
2.3.3	Postura durante la dissezione	27
2.3.4	Strumenti di dissezione	27
2.3.5	Conservazione e gestione dei campioni	27
2.4	Principi Generali per l'Esame Macroscopico	28
2.4.1	Identificazione e Orientamento del Campione	28
2.4.2	Difficoltà nell'Orientamento del Campione	28
2.4.3	Manipolazione del Campione	28
2.4.4	Importanza della Conoscenza Anatomica del Patologo	28
2.4.5	Margini Chirurgici e Diagnosi Istologica	29
2.4.6	Dissezione del Campione Chirurgico	29
2.4.7	Gestione di Campioni con Tessuti Molli e Ossa	29
2.4.8	Conservazione delle Sezioni e Campioni	29

2.4.9	Contaminazione dei Campioni	30
2.4.10	Errori di Etichettatura	30
2.4.11	Riassunto	30
3	Campioni chirurgici	33
3.1	Introduzione ai pezzi chirurgici	33
3.1.1	La chirurgia elettiva	33
3.1.2	La chirurgia non elettiva	33
3.1.3	Finalità del campionamento	34
3.1.4	Apertura del pezzo chirurgico	34
3.1.5	Orientamento del pezzo chirurgico	34
3.2	Distinzione fra pezzi neoplastici e non neoplastici	35
3.2.1	Cos'è una neoplasia	35
3.2.2	Caratteristiche delle neoplasie	35
3.2.3	Sierosite	36
3.2.4	Infiammazione	36
3.2.5	Fibrosi e granulomi	36
3.2.6	Campionamento dell'alterazione macroscopica	37
3.3	Campioni neoplastici	37
3.3.1	Impatto della diagnosi patologica	37
3.3.2	Valutazione dei margini chirurgici	38
3.3.3	Stadiazione TNM	39
3.3.4	Importanza del campionamento nella patologie neo- plastiche	40
4	Campionamento: cuti, piccoli campioni e biopsie	41
4.1	Campionamento di tessuti cutanei	41
4.2	Biopsie	41
5	Processazione pezzi chirurgici e bioptici	43
5.1	Tecniche di processazione	43
5.2	Problematiche nella processazione	43
6	Inclusione in paraffina	45
6.1	Procedura di inclusione	45
6.2	Considerazioni tecniche	45
7	Taglio al microtomo	47
7.1	Tipologie di microtomi	47
7.2	Tecniche di taglio	47

8 Automazione in anatomia patologica	49
8.1 Sistemi automatizzati	49
8.2 Vantaggi e svantaggi dell'automazione	49
9 Esame intraoperatorio: finalità e mezzi	51
9.1 Obiettivi dell'esame intraoperatorio	51
9.2 Strumenti utilizzati	51
10 Tecnica esame intraoperatorio	53
10.1 Procedura passo-passo	53
10.2 Problematiche e considerazioni pratiche	53

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 col-

orazione 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 tamponata 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 ($-NH_2 \rightarrow NH_3^+$) e ($COO^- \rightarrow COOH$), 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 ($-C-COO^-$) 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

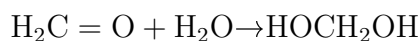
gruppi basici delle proteine, causando la coagulazione delle proteine. Se la soluzione viene neutralizzata, la proteina precipitata può ridissolversi. La fissazione con acido picrico produce colorazioni più intense, ma le soluzioni a pH basso possono causare idrolisi e perdita di acidi nucleici.

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 for-

mazione 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 formico

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

1.5. FATTORI CHE INFLUENZANO LA QUALITÀ DELLA FISSAZIONE¹⁷

di molti 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 contrattile 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 formali-

nato 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 eccellenti 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 MACROSCOPICA²⁵

- 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.



Figure 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 MACROSCOPICA²⁷

- 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'esame macroscopico. È importante esaminare attentamente tutti i campioni, anno-

tando 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

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.

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

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.

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 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

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.

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 induto 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 gigantomitotica 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 itologicamente.

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.

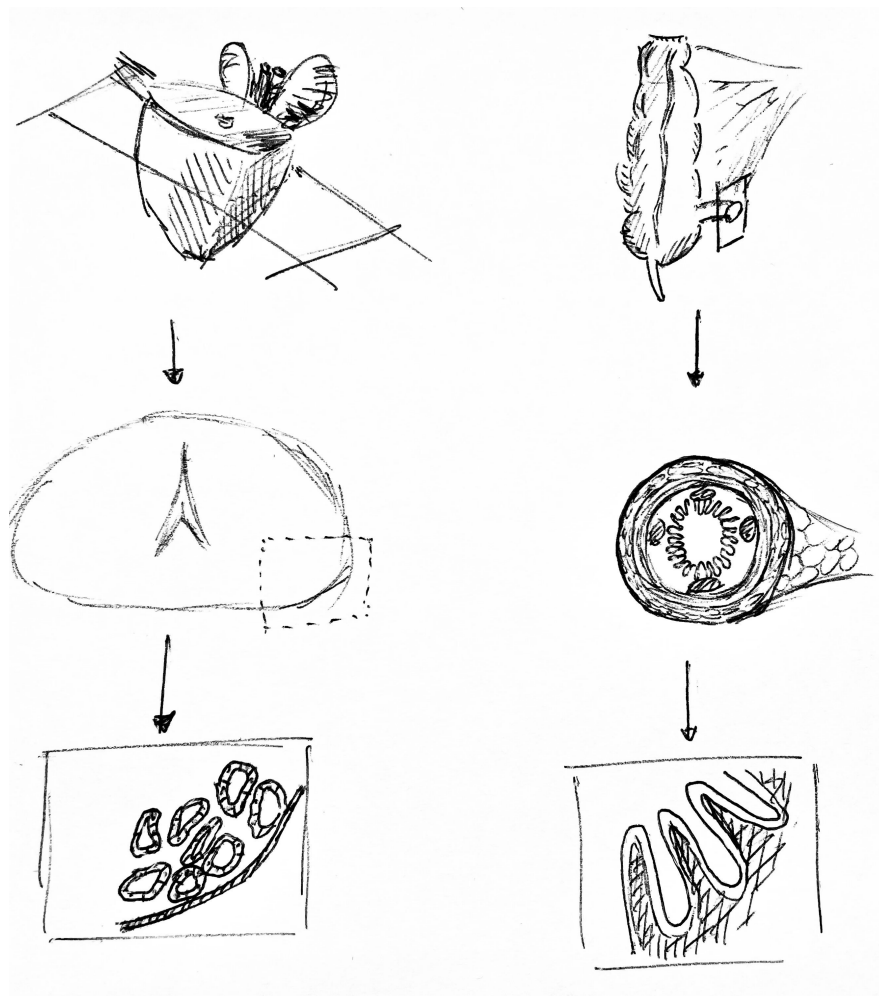


Figure 3.1: Il campionamento margini

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:

- **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:

- **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

Table 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.

Capitolo 4

Campionamento: cuti, piccoli campioni e biopsie

4.1 Campionamento di tessuti cutanei

4.2 Biopsie

Capitolo 5

Processazione pezzi chirurgici e biopistici

5.1 Tecniche di processazione

5.2 Problematiche nella processazione

Capitolo 6

Inclusione in paraffina

6.1 Procedura di inclusione

6.2 Considerazioni tecniche

Capitolo 7

Taglio al microtomo

7.1 Tipologie di microtomi

7.2 Tecniche di taglio

Capitolo 8

Automazione in anatomia patologica

8.1 Sistemi automatizzati

8.2 Vantaggi e svantaggi dell'automazione

Capitolo 9

Esame intraoperatorio: finalità e mezzi

9.1 Obiettivi dell'esame intraoperatorio

9.2 Strumenti utilizzati

Capitolo 10

Tecnica esame intraoperatorio

10.1 Procedura passo-passo

10.2 Problematiche e considerazioni pratiche