

TECNICHE DI ISTOPATOLOGIA E IMMUNOISTOCHEMICA

L'ISTOLOGIA studia tutto ciò che è tessuto, basandosi sull'organizzazione cellulare e sull'aspetto micro e macroscopico, la CITOLOGIA studia invece la struttura di cellule disperse in liquidi (lavaggi, urine, aghi aspirati...); il PAP-TEST è un tipo di esame citologico su materiale che può pervenire in laboratorio su un vetrino strisciato o all'interno di un contenitore thin-prep da cui poi si allestirà il vetrino. Il pap-test è un test di screening in cui vengono prelevate poche cellule del collo dell'utero e in cui viene effettuato un tampone cervicale con lo scopo di indagare le alterazioni della cervice dell'utero.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE NELL'ESAME ISTOLOGICO

Le tipologie di campioni in anatomia patologica sono svariate, possono andare dalle piccole biopsie, come biopsie prostatiche, alle endoscopie, come la gastroscopia o colonscopia in cui vengono prelevati frammenti piccoli e rotondeggianti, ai pezzi" operatori di grandi dimensioni come parti di intestino, stomaco, cisti... . I campioni, qualsiasi sia la loro natura, una volta asportati devono essere messi a contatto con un conservante fissativo, la FORMALDEIDE.

Nel momento in cui il campione raggiunge il laboratorio va incontro a una serie di passaggi per costituire un vetrino, il quale verrà poi letto da un anatomopatologo che farà la diagnosi; le fasi comprendono:

1. **ACCETTAZIONE:** in laboratorio i campioni arrivano associati ad una richiesta cartacea; è necessario verificare i dati anagrafici, la data dell'esame, le notizie cliniche, il numero di contenitori, la richiesta e il tipo di prelievo e la conformità del campione. Tutti i dati verranno inseriti nel programma in modo tale da associare i blocchetti con il numero identificativo ed un QR code. I campioni (fissati o a fresco) devono pervenire in contenitori a tenuta, dove devono essere indicate le generalità del paziente e il reparto di provenienza, con allegata richiesta.
2. **CAMPIONAMENTO:** durante questa fase il patologo effettua una descrizione macroscopica e il campionamento dei pezzi chirurgici; questi devono essere descritti, quantificati (es. numero di frustoli), misurati (es. biopsie epatiche), pesati (es. turp-turp). Presso il nostro laboratorio, il campionamento delle biopsie viene eseguito dal personale tecnico, mentre per frammenti maggiori, quali neoformazioni polipoidi, biopsie cutanee..., che necessitano di una descrizione macroscopica vera e propria, viene eseguito dal medico. Le B.O.M., biopsie osteo-midollari, necessitano di una decalcificazione effettuata immergendo i campioni di trabecole ossee in una miscela di EDTA e acido cloridrico, la quali ammorbidirà il campione che altrimenti non potrebbe essere tagliato. Durante il campionamento è importante verificare il rapporto campione/formalina che deve essere di circa 1:10 per evitare ipo o iperfissazioni che potrebbero portare ad artefatti nelle fasi successive. Anche in questa fase verranno preparati delle biocassette con numero identificativo e QR code.
3. **PROCESSAZIONE:** effettuata da uno strumento formato da uno strumento composto da una camera e delle taniche contenenti vari solventi. All'interno della camera viene posto il contenitore forato contenente le biocassette con i vari campioni. Il primo passaggio all'interno dello strumento è la disidratazione, effettuata con immersione dei campioni in etanolo prima a 70°, poi 95° e 100°; questo passaggio eliminerà l'acqua e la formaldeide per permettere la successiva inclusione in paraffina, non idrosolubile. Il passaggio successivo prevede l'immersione dei campioni nelle isoparaffine, solvente di passaggio solubile sia in alcol che in acqua, che chiarifica il campione. L'ultimo step della processazione è l'immersione dei campioni in paraffina liquida a 56°C. La processazione delle biopsie e dei pezzi operatori avviene con due programmi diversi, in base alle dimensioni del campione. I Processatori automatici (Excelsior 2) sono un grande vantaggio in quanto non c'è nessuna manipolazione dei reagenti, il software è in grado di riconoscere il reagente più sporco e di sostituirlo con quello successivo più pulito, effettua la misura del grado alcolico del

primo Alcool, effettua l'aspirazione dei vapori, ha un software interattivo, una batteria di back-up e la possibilità di richiedere assistenza a distanza. Lo strumento nel momento in cui deve erogare la paraffina aumenta la propria temperatura in modo da impedire che questa si solidifichi nel tubo di erogazione; la temperatura di fusione della paraffina è di circa 56 °C mentre lo strumento è settato a 58 °C; gli alcool e le Isoparaffine vengono mantenuti a temperatura ambiente oppure a 37 °C per ridurre il tempo di esposizione al solvente. Dal monitor è possibile vedere in che punto della processazione si trovavano i campioni. Il lavaggio previsto al termine del processo consiste nel ripetere il processo a ritroso: l'Isoparaffina elimina la paraffina dal tubo, si effettuano poi 2 bagni con alcool a 100°, 2 bagni con alcool al 95°, 1 bagno con alcool al 70°, lavaggio in acqua.

4. **INCLUSIONE:** lo strumento utilizzato è composto da dei vani riscaldati, una piastra fredda e un dispensatore di paraffina liquida. L'inclusione prevede il trasferimento del campione o del frammento in un piccolo contenitore di acciaio, facendo particolare attenzione all'orientamento del pezzo; dopo aver scelto il contenitore della giusta dimensione, vi si versa una piccola quantità di paraffina trasferendolo nella piastrina fredda, si appoggia il campione facendolo aderire alla paraffina parzialmente solidificata applicando una pressione, si appoggia la parte della biocassetta contenente il numero identificativo sulla superficie del blocchetto di acciaio che si riempirà di paraffina e si metterà a freddare fino alla completa solidificazione della stessa. L'inclusione verrà conservata per 10 anni, i vetrini per 5.
5. **TAGLIO** delle sezioni al microtomo: il blocchetto viene posto in una camera fredda, così che la paraffina rimanga rigida e venga tagliata più facilmente. Dopo aver stampato il vetrino del campione, il blocchetto viene inserito nel microtomo, composta da una lama, un supporto ed un rotore, per procedere alla "sgrossatura", l'eliminazione della paraffina superficiale in eccesso, per far sì che tutto il campione venga scoperto; dopo la sgrossatura si procederà al taglio vero e proprio a circa 4 µm, facendo attenzione che la sezione scelta per il vetrino sia completamente rappresentativa del campione. Una volta tagliata la sezione, questa verrà deposta in una bacinella di acqua a circa 45°C, dove si stenderà sulla superficie permettendone poi la raccolta con un vetrino che verrà poi appoggiato su una piastra calda per eliminare l'acqua.
6. **COLORAZIONE:** la colorazione classica utilizzata è l'ematossilina-eosina, effettuata da un coloratore automatico che immergerà i vetrini nei vari contenitori con solventi e coloranti. L'ematossilina è un colorante basico che colora i nuclei in blu, mentre l'eosina è un colorante debolmente acido che colora il citoplasma in rosa. Il vetrino prima della colorazione deve essere sparaffinato il processo viene effettuato immergendo i vetrini prima in isoparaffina poi in alcool decrescenti da 100°, 95°, 70° e infine in acqua, così che i coloranti, idrosolubili, possano penetrare meglio nella cellula e colorare i tessuti. il processo di colorazione totale prevede: 2 bagni in Isoparaffina per eliminare la paraffina dal vetrino, bagni in Soluzioni alcoliche a concentrazione decrescente, idratazione, acqua corrente bagno in EMATOSSILINA che colora le strutture nucleari (7 minuti), acqua corrente che elimina l'eccesso di colorante e permette il viraggio di colore dell'Ematossilina da ROSSO a BLU, EOSINA che colora le strutture citoplasmatiche (1 minuto), acqua corrente che elimina l'eccesso di colore, soluzioni Alcoliche a concentrazione crescente (disidratazione), bagno in Isoparaffina, in quanto il montante è solubile solo in isoparaffina, montaggio con montante dispensato da un erogatore automatico, apposizione di un vetrino coprioggetto, asciugatura sotto cappa, analisi da parte del patologo, refertazione o richiesta di colorazioni aggiuntive.
7. **ANALISI MICROSCOPICA** da parte del patologo. Lo scopo finale è quello di effettuare diagnosi, chiaramente è necessario conoscere il quadro clinico del paziente, indicando il più precisamente possibile la natura della patologia, lo stadio di sviluppo e prospettive evolutive, le indicazioni terapeutiche per la medicina personalizzata.

L'esame istologico viene fatto per accertare e/o documentare il sospetto clinico, fare diagnosi di neoplasia, eseguire un trattamento terapeutico, analizzare lesioni incerte. Per quanto riguarda le Biopsie gastriche, per convenzione viene effettuata la colorazione di Giemsa per la ricerca dell' H.Pylori.

FISSAZIONE

È di primaria importanza che il campione dopo essere stato asportato venga immerso in un fissativo, che blocca l'azione degli enzimi autolitici e mantiene la struttura del campione in esame. La fissazione dei campioni istologici viene fatta con formalina, formaldeide diluita al 10% in una soluzione tampone a pH 7. È tossica e cancerogena. La formalina è il più potente fissativo ed il migliore in assoluto in quanto ha: buona conservazione, penetra lentamente nei tessuti permettendo una buona fissazione, e gli artefatti che provoca sono minori rispetto ad altri fissativi che sono meno tossici e non cancerogeni.

La formalina impedisce l'azione distruttiva di agenti esterni (batteri, funghi, ...), blocca i costituenti tissutali in uno stato simile a quello vitale, preserva il campione da stress chimici e fisici, indurisce i tessuti e mantiene un buon grado di reattività e riproducibilità dei campioni, impedisce la degradazione da parte degli enzimi autolitici. Una fissazione ottimale sarà quella che produce la migliore morfologia con il tempo minimo richiesto per conservare l'antigene.

L'ischemia fredda è il tempo che passa da quando il pezzo viene staccato dai vasi a quando viene messo in fissativo.

Il laboratorio di anatomia patologica presenta in ogni stanza un impianto di aspirazione e ricambio dell'aria; la stanza dell'accettazione presenta un banco aspirato per eliminare i vapori di formalina che possono fuoriuscire dal barattolo. I contenitori che contengono la formalina devono essere aperti solamente sotto la cappa aspirata.

La formalina ha un tempo di penetrazione di 1mm/h, a mano a mano che il pezzo si fissa questo tempo aumenta in quanto la superficie esterna si indurisce. Per questo motivo i pezzi operatori di grandi dimensioni vengono incisi a volte per facilitare la penetrazione.

La fissazione è l'azione di agenti chimici o fisici su tessuti e cellule, che ne favoriscono la conservazione. Il compito principale della fissazione è quello di mantenere inalterate le caratteristiche del tessuto.

Il campione contiene solo una quantità finita di Antigeni che durante la processazione possono andare persi. Un risultato ottimale si ottiene utilizzando diversi tipi di fissativo in modo da preservare sia le caratteristiche Antigeniche che la Morfologia del prodotto. Un tessuto non adeguatamente fissato può presentare artefatti che potrebbero compromettere il risultato finale. Ci può essere ipofissazione, che danneggia la morfologia del tessuto, oppure iperfissazione che causa un eccessivo mascheramento ed un'eventuale perdita degli Ag.

Il fissativo viene scelto in base al tessuto e all'indagine da eseguire. I fissativi si distinguono in:

- Fisici:
 - congelamento: Si può ottenere con abbassamento delle temperature, ad esempio nell'esame in intraoperatoria, ausilio di CO₂, in disuso perché poco maneggevole e rischiosa (da una bombola esce gas a -70°C che ricopre con uno strato di ghiaccio secco il campione), gas liquidi.
 - essiccazione (citologia)
 - calore
- Chimici: aldeidi, alcoli, agiscono principalmente sulle proteine, impiegati come vapori, in perfusione, in immersione. I fissativi chimici si dividono in:
 - Primari: Etanolo, poco penetrante, e metanolo utilizzati per preparati citologici, Formaldeide (soluzione 4%), conserva i lipidi e fosfolipidi, compatibile con molte colorazione istochimiche; pH < 5 determina la formazione di un pigmento bruno; forma ponti metilenici con i gruppi chimici portatori di H reattivo
 - Semplici: consistono nell'aggiunta di sali inerti che migliorano le caratteristiche dei fissativi primari

Il fissativo ideale penetra facilmente, fornisce una fissazione omogenea, non provoca la coartazione del tessuto, non interferisce con le colorazioni.

FISSATIVI IN USO: in ISTOLOGIA Formalina al 10% (4%) tamponata, pH: 7,2 – 7,4, Glutaraldeide, in microscopia elettronica; in CITOLOGIA Alcool 96°, Fissativo – conservante, Essiccazione all'aria.

TIPOLOGIE DI PRELIEVI

BIOPSIE ENDOSCOPICHE, BIOPSIE ESCISSINALI con asportazione completa della neoplasia, Biopsie incisionali con asportazione parziale della neoplasia, AGOBIOPSIE, utilizzando aghi di diverse dimensioni in ecoguidato, MAMMATOMIE, ORGANI INTERI, TRUCH-CUT con una lama tagliente che raschia, PUNCH dove si ottengono sezioni circolari di vario diametro e profondità.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE CITOLOGICO

La Citologia studia le cellule sotto il profilo morfologico e funzionale. La Citodiagnostica é quella branca dell'Anatomia Patologica che valuta con diverse tecniche le alterazioni di diversi organi al fine di identificare l'entità morbosa da cui é affetto il paziente. I criteri diagnostici si basano quasi esclusivamente sulle caratteristiche delle cellule e quindi sulle caratteristiche morfologiche di nuclei e citoplasmi: forma, colore, dimensioni. Con l'esame citologico sono visibili cellule sparse, ma non é possibile vederne l'organizzazione come accade nell'istologico. Prima di sottoporre un paziente a biopsia o, in alcuni casi, ad intervento si procede con un esame citologico. I campioni citologici possono essere campioni di urina, agoaspirati (mammella, tiroide, ...), liquidi da versamento. Con la CITOLOGIA ESFOLIATIVA si vanno a ricercare e ad analizzare le cellule che si sono esfoliate spontaneamente; l'esfoliazione cellulare é un processo fisiologico che avviene in continuazione in seguito al rinnovamento dei tessuti; la % di cellule esfoliate varia a seconda dei tessuti e del loro funzionamento e metabolismo, le cellule in parte esfoliano fisiologicamente, in parte in condizioni patologiche e potranno essere ritrovate in: urine, espettorati, versamenti, secrezioni, liquor. Lo SPAZZOLATO è un prelievo possibile in organi cavi oppure in organi accessibili dall'esterno, cervice uterina e vagina, trachea e bronchi, utero, tubo digerente e consiste nell'inserire una sorta di spazzolino e appunto spazzolare via le cellule presenti (esfoliazione provocata). Il LAVAGGIO (o meglio, il broncolavaggio) consiste nell'introduzione di un liquido nell'albero bronchiale e nella sua rapida aspirazione, ed andando poi a ricercare le eventuali cellule presenti. Lo SCRAPING consiste nel grattare la superficie di una lesione. L'ASPIRAZIONE CON AGO SOTTILE può essere fatta su organi o lesioni superficiali o profonde; per le sedi profonde viene effettuata sotto monitoraggio radiologico (TAC) oppure in Ecoguidata.

A partire dai suddetti liquidi si allestiscono dei vetrini con un apposito strumento, con lo scopo di andare ad isolare le cellule contenute nel liquido. Il vetrino verrà poi colorato e osservato al microscopio. Per le urine e per gli espettorati si richiedono 3 campioni di 3 giorni consecutivi per aumentare la probabilità di trovare cellule neoplastiche. I liquidi, come i campioni istologici, hanno bisogno di un fissativo, in questo caso si utilizza una soluzione a base di metanolo (basse concentrazioni) che stabilizza il campione per una settimana. I campioni vengono trasferiti in un barattolo apposito contenente un conservante, si aggiunge l'etichetta corrispondente al paziente, si inserisce il barattolino nel supporto dello strumento (Thin-Prep) e si attende l'allestimento del vetrino.

CONCENTRAZIONE CAMPIONE CITOLITICO (urine): 3 campioni di giorni consecutivi, dopo una iniziale centrifugazione, viene eliminato il sovrnatante, viene trasferito il contenuto del barattolino del thin-prep per risospendere il sedimento al vortex spostando il contenuto da una falcon all'altra, ed infine si riporta il contenuto nel barattolino predisposto per l'inserimento nello strumento. L'arricchimento mediante centrifugazione viene effettuato anche per altri liquidi come versamenti o liquidi di lavaggio, ma questi saranno costituiti da un solo campione.

TP5000: lo strumento necessita di vetrini, filtri e alcol a 95°, ed è in grado di preparare i vetrini dei vari materiali biologici. Le richieste dei vari campioni devono essere inviate allo strumento tramite computer. I

contenitori preparati in precedenza vengono inseriti all'interno dello strumento tramite un rack. I campioni vengono lavorati uno per volta, quindi un braccio meccanico prende un contenitore e lo mette all'interno di un rotore, in seguito prende un filtro formato da un cilindro aperto da un lato e una membrana dall'altro, il filtro viene inserito all'interno del barattolo e con una pressione negativa il liquido viene aspirato, la parte cellulare si blocca sul filtro, mentre la fissativa supera la membrana. È presente un sensore che misura la concentrazione cellulare nel filtro, il quale viene rimosso una volta raggiunta la giusta concentrazione. La parte della membrana del filtro viene poi poggiata sul vetrino e grazie a una pressione inversa le cellule verranno rilasciate dalla membrana; il vetrino verrà poi messo in una vasca contenente alcol 95° che fisserà il vetrino. Sullo strumento THINPREP è possibile fare allestimenti: Citologici: urine, liquidi, ecc., o Vaginali, i pap-test in cui si procede al prelievo cervico-vaginale e alla sua processazione in fase liquida (vetrino monostrato)

Al termine dell'allestimento del vetrino si procede alla colorazione. La principale colorazione per i preparati citologici è PAPANICOLAOU dove: l'Ematossilina colora i nuclei, Orange G colora il citoplasma e si fissa con alcool al 95°.

COLORAZIONE PAPANICOLOU: Dopo allestimento del vetrino si procede alla colorazione: con Idratazione del vetrino con soluzioni alcoliche decrescenti, bagno in Ematossilina di Harris che colora i nuclei, acqua corrente che elimina il colore in eccesso, Orange G che colora le strutture citoplasmatiche, 2 bagni di alcool al 95°, EA50 o EA60 che colorano le strutture citoplasmatiche, 2 bagni in alcool a 95°, Isoparaffina, deposizione di montante e vetrino coprioggetto, lettura al microscopio

Altri tipi di colorazioni sono: MayGrunwald-Giemsa (H. Pylori) che richiede la fissazione del vetrino a secco, Zihel-Neelsen per la ricerca di micobatteri, Grocott per la ricerca di funghi

I campioni citologici vengono conservati con: Alcool 70° in barattolino thin-prep 1 mese, Alcool etilico 50°, Alcool 95° per 3 settimane, Alcool 3-5° per 1 settimana in falcon fornita al paziente.

Come per i preparati istologici anche per i preparati citologici possono essere richieste colorazioni aggiuntive, le colorazioni immunocitochimiche e colorazioni istochimiche.

CITOICLUSO: cellule incluse in paraffina come i preparati istologici. Il preparato citologico rimane conservato al massimo per 1 mese, dato che dopo questo tempo il conservante perde la sua efficacia; l'allestimento della colorazione di immoistochimica per i preparati citologici viene meglio su materiale fissato come un preparato istologico rispetto al vetrino da THINPREP. Il citoincluso si può allestire dalla Falcon in cui è presente il campione con il conservante (3-5%) o dal contenitore del Thin-prep

Il citoincluso consiste nel raccogliere tutto il materiale presente nel campione con inclusione in paraffina. Per allestire il citoincluso si centrifuga il campione, si getta il sovrantante, si raccoglie il sedimento con alcool 95° con formazione di una sorta di coagulo sul fondo, si incuba per 24 ore, si ricentrifuga e si butta il sovrantante, si raccoglie con la pasteur il sedimento e si trasferisce in una biocassetta, che seguirà il processo come fosse un istologico: processazione, inclusione in paraffina, taglio al microtomo, allestimento del vetrino e colorazione.

Il liquor, date le scarse quantità, non si concentra mediante centrifugazione (come le urine) ma si trasferisce direttamente nella vials da Thin-prep, dopo aver tolto circa 1cc di conservante.

La citocentrifugazione è una tecnica che permette la concentrazione di preparati citologici scarsamente cellulati. Sul citoincluso si può procedere a colorazioni con Ematossilina-eosina e colorazioni

Immunocitochimiche che permettono di localizzare 1 o più Antigeni mediante l'utilizzo di 1 o più Anticorpi; tali colorazioni permettono di: identificare agenti patogeni e tipizzare neoplasie.

I principali vantaggi della citodiagnostica sono la rapida esecuzione, prelievi senza anestesia, facile ripetibilità del prelievo, elevata specificità e sensibilità in mani esperte.

COLORAZIONI SUPPLEMENTARI

Dopo l'allestimento dei vetrini e dopo aver effettuato le colorazioni "base", il patologo può richiedere colorazioni supplementari che possono aiutare a confermare o escludere determinate patologie. Queste colorazioni possono essere di immunoistochimica o di istochimica, le quali vanno a ricercare particolarità all'interno della struttura e sono basate su reazioni chimiche.

Le tecniche di immunoistochimica si basano sulle reazioni di Antigene-Anticorpo e possono essere effettuate su: preparati istologici, preparati citologici e citoinclusi.

Alcuni tumori possono essere diagnosticati con i soli esami istologici, altri necessitano di approfondimenti con istochimica, immunoistochimica e biologia molecolare. Con la biologia molecolare è possibile determinare la presenza o meno di una mutazione e tale informazione permette di confermare o escludere una malattia e di adattare o meno una determinata terapia.

Nell'immunoistochimica l'Anticorpo è legato ad un cromoforo, il colore perdura nel tempo ed è visibile ad occhio nudo e con microscopio ottico; nell'immunofluorescenza si ha invece sviluppo di fluorescenza che richiede un microscopio a fluorescenza; L'Anticorpo è legato ad un fluoroforo e la fluorescenza prodotta dopo un tot di tempo decade. Il decalcificante può dare antigenicità sul campione.

Il tracciante sugli Anticorpi può essere: Enzimatico, in immunoistochimica si utilizzano enzimi come marcatori o fluorescente nell'immunofluorescenza, in cui si utilizzano fluorocromi come marcatori.

Per l'immunoistochimica si utilizzano vetrini polarizzati (caricati) o collanti sopra che favoriscono l'adesione degli anticorpi

Le **COLORAZIONI IMMUNOISTOCHIMICHE** possono essere richieste dopo la colorazione ematossilina-eosina o durante l'esame macroscopico. Come tutte le colorazioni anche quelle di immunoistochimica prevedono la sparaffinatura e l'idratazione (con soluzioni alcoliche a concentrazione decrescente).

Nelle colorazioni di immunoistochimica vengono utilizzati anticorpi Monoclonali, costituiti da Anticorpi identici tra loro e diretti contro lo stesso determinante antigenico, policlonali costituiti da Anticorpi diversi tra loro e diretti contro differenti determinanti antigenici, ibridi costituiti da Ig modificate in modo tale che ciascun frammento abbia specificità per un differente determinante antigenico. Il complesso Antigene-anticorpo non è di per se visibile, sono per cui necessari dei marcatori che direttamente o indirettamente possono evidenziarne la formazione; nell'immunofluorescenza i marcatori maggiormente utilizzati sono l'Isotiocianato, la Cianina e il Rosso Texas.

Le tecniche immunoenzimatiche sono le più utilizzate in quanto non si ha il decadimento della fluorescenza; nell'immunofluorescenza la reazione è su campo scuro per cui si perde la struttura del tessuto mentre nell'immunoistochimica (o immunoenzimatica) la struttura del tessuto è ben visibile e quindi si riconosce il punto in cui avviene la reazione (sul nucleo, sulla membrana...). I metodi di indagine possono essere:

- **DIRETTI:** Si utilizza un solo Anticorpo marcato con fluorocromo o enzima che si va a legare all'Antigene. Con il metodo diretto in immunofluorescenza è possibile fare una doppia colorazione utilizzando Anticorpi marcati con fluorocromi differenti. In immunoenzimatica il metodo diretto è poco utilizzato in quanto scarsamente sensibile.
- **INDIRETTO:** si utilizzano 2 Anticorpi: l'anticorpo 1 è specifico e si va a legare all'Antigene presente nel tessuto mentre l'anticorpo 2 è universale, marcato con il fluorocromo o l'enzima, e si va a legare all'Anticorpo 1. Il metodo indiretto in immunoistochimica è molto sensibile ed ha il vantaggio che 1 solo Anticorpo marcato, può essere utilizzato per riconoscere diversi Anticorpi primari, appartenenti alla stessa specie.

Per l'**IMMUNOFLUORESCENZA** il tessuto fresco viene campionato e congelato; il congelamento non interferisce con la reazione Antigene-anticorpo e può essere effettuato a basse temperature o con azoto liquido, più rapido rispetto all'inclusione ma meno sicuro. Una volta congelato si effettuano sezioni al criostato di circa 4µm, si asciuga all'aria, si fissa con acetone al 4%, li lava con PBS e si procede alla

colorazione con anticorpo marcato e lavaggio con tampone; il montaggio viene effettuato con sistemi acquosi ed è necessaria la conservazione al buio fino alla lettura con il microscopio a fluorescenza. L'IMMUNOENZIMATICA O IMMUNOISTOCHEMICA prevede l'uso di enzimi legati direttamente come marcatori all'anticorpo primario o secondario per evidenziare il complesso antigene-anticorpo. L'enzima catalizza la formazione di un precipitato colorato e insolubile, visibile al microscopio nel punto in cui si forma il complesso. Il tracciante enzimatico può essere: Perossidasi (immunoperossidasi), Fosfatasi, Glucosidasi e β -galattosidasi. La perossidasi è legata ad una molecola di destrano (zucchero), tutto il complesso zucchero-enzima è legato all'anticorpo ed il substrato utilizzato è il perossido di idrogeno. I cromogeni utilizzati possono essere: DAB, da un precipitato marrone, insolubile nei solventi organici, è cancerogeno. L'insolubilità e la stabilità del precipitato permettono il montaggio e l'archiviazione dei preparati, AEC che da un precipitato rossiccio solubile nei solventi organici, non è cancerogeno. Nell'immunofosfatasi l'enzima è la fosfatasi alcalina, i substrati sono esteri fosforici, il cromogeno è il tetrazolio che dà colorazione rossa.

La colorazione immunoenzimatica richiede Sparaffinatura con iso-paraffina, Idratazione con Alcol a concentrazione decrescente, inibizione degli enzimi endogeni: alcuni enzimi utilizzati come traccianti possono essere presenti nel tessuto da analizzare e per impedire un risultato falso positivo è necessario inibire gli enzimi endogeni; nel caso delle perossidasi endogene l'inibizione viene fatta con il perossido di idrogeno (H_2O_2), smascheramento degli Antigeni: i vari processi a cui sono sottoposti i tessuti possono danneggiare l'antigenicità del tessuto stesso; lo smascheramento può essere fatto in due modi: con trattamento enzimatico o alte temperature. Nel trattamento enzimatico si utilizzano enzimi che rendono disponibili gli antigeni per il legame con l'anticorpo; alcuni enzimi sono: pepsina, proteasi XXIV, tripsina, proteasi K. L'azione di tali enzimi avviene a $37^\circ C$ per tempi variabili (5 – 30 min) e dipende da vari fattori: concentrazione dell'enzima, durata della fissazione, spessore della sezione, tipo di enzima. Le alte temperature sono il processo più utilizzato, permette di ristabilire l'originale struttura dopo la fissazione del tessuto. Si possono raggiungere temperature di $90-95^\circ C$ utilizzando: forno a microonde, pentola a pressione, bagno termostato, autoclave. Dopo lo smascheramento verranno aggiunti gli anticorpi e successivamente il cromogeno, la DAB nel caso della perossidasi, sviluppando un colore con intensità proporzionale alla concentrazione di antigene. Si effettua poi la colorazione di contrasto che nel caso della perossidasi richiede l'ematosilina con un colore azzurro chiaro, così che il patologo riesca a localizzare la reazione. La preparazione prosegue con disidratazione con Alcol a concentrazione crescente, diafanizzazione con isoparaffina, montaggio con montante e Copri-oggetto, lettura dei risultati.

La lettura dei risultati e la loro interpretazione non è semplice; vi sono degli artefatti che possono dare positività anche dove non è avvenuta la "vera" reazione Ag-Ab. Gli artefatti possono essere dovuti a: presenza di perossidasi endogene non ben inibite, Cross-reattività dell'Ab1 con un altro Ag, legame aspecifico Ag-Ab, inadeguata fissazione.

I principali anticorpi utilizzati per la diagnostica di patologie neoplastiche sono: Citocheratine nel linfonodo sentinella, Actina del muscolo liscio e mammella, S-100, Calponina nella mammella, E-caderina nella mammella, Estrogeni, Progesteroni, Ki67 per la proliferazione, HER-2 per mammella (colorazione di membrana).

Le Colorazioni di istochimica evidenziano le caratteristiche chimiche del campione; sono:

- PERLS-BLU DI PRUSSIA: Usata per rilevare e identificare Ferro Ferrico (Fe^{3+}) utilizzabile sia in istologia che in citologia per tessuti, strisci di sangue e midollo osseo. Il ferro apparirà blu, i nuclei rossi.
- PAS A: Permette di rilevare mucine neutre e vi si utilizza il Reattivo di Schiff (rosso porpora). Si esegue manualmente in associazione all'Alcian Blue. Il PAS A prevede il pretrattamento da un enzima che degrada il glicogeno e permette di vedere solo le mucine. Sostanze PAS positive rosso magenta, nuclei blu (emallume di Mayer).
- PAS DIASTASI (PAS D): Ha lo stesso effetto del PAS A, cioè digerisce il glicogeno. La reazione si basa sull'ossidazione con Acido periodico di 2 gruppi glicolici (2 legami, uno è 1,2 glicolitico ed i gruppi

amminico primario e secondario), che vengono poi rilevati con il Reattivo Shiff. Si fa una controcolorazione con ematossilina eosina. Nucleo: blu scuro. Glicogeno e Mucine: rosso magenta.

- **IMPREGNAZIONE ARGENTICA-GOMORI:** Serve per visualizzare le fibre reticolari che appaiono nere, mentre il collagene giallo.
- **ROSSO CONGO:** Utilizzato per visualizzare accumuli di sostanza amiloide. La sostanza amiloide si colora in rosso (rosso congo), i nuclei blu (emallume di Mayer).
- **TRICROMICA (MASSON):** Si utilizza per evidenziare nel tessuto connettivo, gameti (nero), nuclei (nero), neurofibrille, nevroglia, collagene (blu/verde), cheratina (rosso), fibre intracellulari e immagine in negativo nell'apparato di Golgi, eritrociti (gialli).

ESAME ESTEMPORANEO o INTRAOPERATORIO

Richiede l'analisi rapida di un frammento o altro che può servire al chirurgo per poter decidere di proseguire con l'intervento in un modo o un altro. Può essere richiesto in modo preventivo oppure può essere richiesto senza preavviso. I campioni trattati in intra-operatoria sono campioni freschi che devono essere trasportati in contenitori chiusi per evitare la disidratazione all'aria e senza l'aggiunta di nessun solvente e ciò espone il tecnico e il patologo ad un maggiore rischio biologico. In intra-operatoria il vetrino viene tagliato al criostato (un microtomo all'interno di un congelatore), per cui non è necessaria la fase di idratazione e sparaffinatura della sezione. Per prima cosa al campione viene assegnato un codice identificativo e accettato, il patologo effettuerà un esame macroscopico e campionerà il pezzo; il frammento viene posto in un supporto metallico grazie ad un collante, una sostanza inerte che a basse temperature si indurisce (temperatura -25°C), con il criostato viene tagliato il frammento, la sezione si stende su una piastra di metallo e viene raccolta con un vetrino. Sul palmo della mano la temperatura corporea fa aderire la sezione al vetrino che verrà poi colorato con una speciale ematossilina-eosina rapida; i vetrini vengono osservati al microscopio dal patologo.

Una volta che il campione sarà stato refertato verrà scongelato e messo in un blocchettino in formalina.

Oltre alla preparazione della sezione al criostato, può venire eseguita la preparazione di un vetrino per **APPOSIZIONE**, come ad esempio per il linfonodo sentinella: il linfonodo viene tagliato a metà e appoggiato sul vetrino (come uno stampino), nel vetrino rimarrà la cellularità, il vetrino verrà poi messo in alcol a 95°, così da fissarlo, e verrà colorato. Una volta effettuato l'esame rapido il pezzo operatorio verrà inviato al laboratorio dove verrà seguito il normale iter.

La colorazione ematossilina-eosina in intraoperatoria non necessita di sparaffinatura e idratazione ed è quindi definita rapida. Durante l'intra-operatoria vengono date risposte riguardanti la natura benigna o maligna della lesione, studi di un margine di resezione (microscopica), presenza di una metastasi linfonodale con il Linfonodo sentinella.