

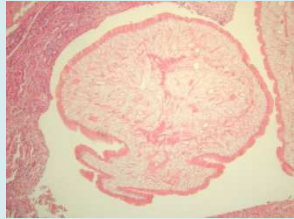
L'esame istopatologico: dal prelievo del campione alla diagnosi

Claudia Eleni

Laboratorio di Anatomo-istopatologia

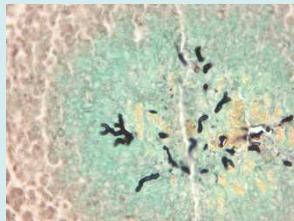
L'ISTOLOGIA A SUPPORTO DELL'INDAGINE NECROSCOPICA

Roma, 4 dicembre 2014



L'ISTOLOGIA E' LO STUDIO DEI TESSUTI E DELLE LORO ALTERAZIONI (ISTOPATOLOGIA)

Perché fare un esame istologico:



- per confermare una diagnosi macroscopica
- per escludere una lesione/malattia
- per ottenere informazioni su lesioni "incerte" o aspecifiche

FASI DI PREPARAZIONE DI UN VETRINO ISTOLOGICO (preparato istologico)

- 1) PRELIEVO DEL CAMPIONE
- 2) FISSAZIONE
- 3) PROCESSAZIONE
- 4) INCLUSIONE IN PARAFFINA
- 5) SEZIONAMENTO
- 6) COLORAZIONE



PRELIEVO DEL CAMPIONE

I campioni possono essere prelevati da animali morti (necropsia, macellazione) o da animali vivi (biopsie, prelievi chirurgici)

Necropsia: il materiale deve essere prelevato il prima possibile dopo la morte dell'animale (**24-48 ore**), per l'instaurarsi dei fenomeni putrefattivi

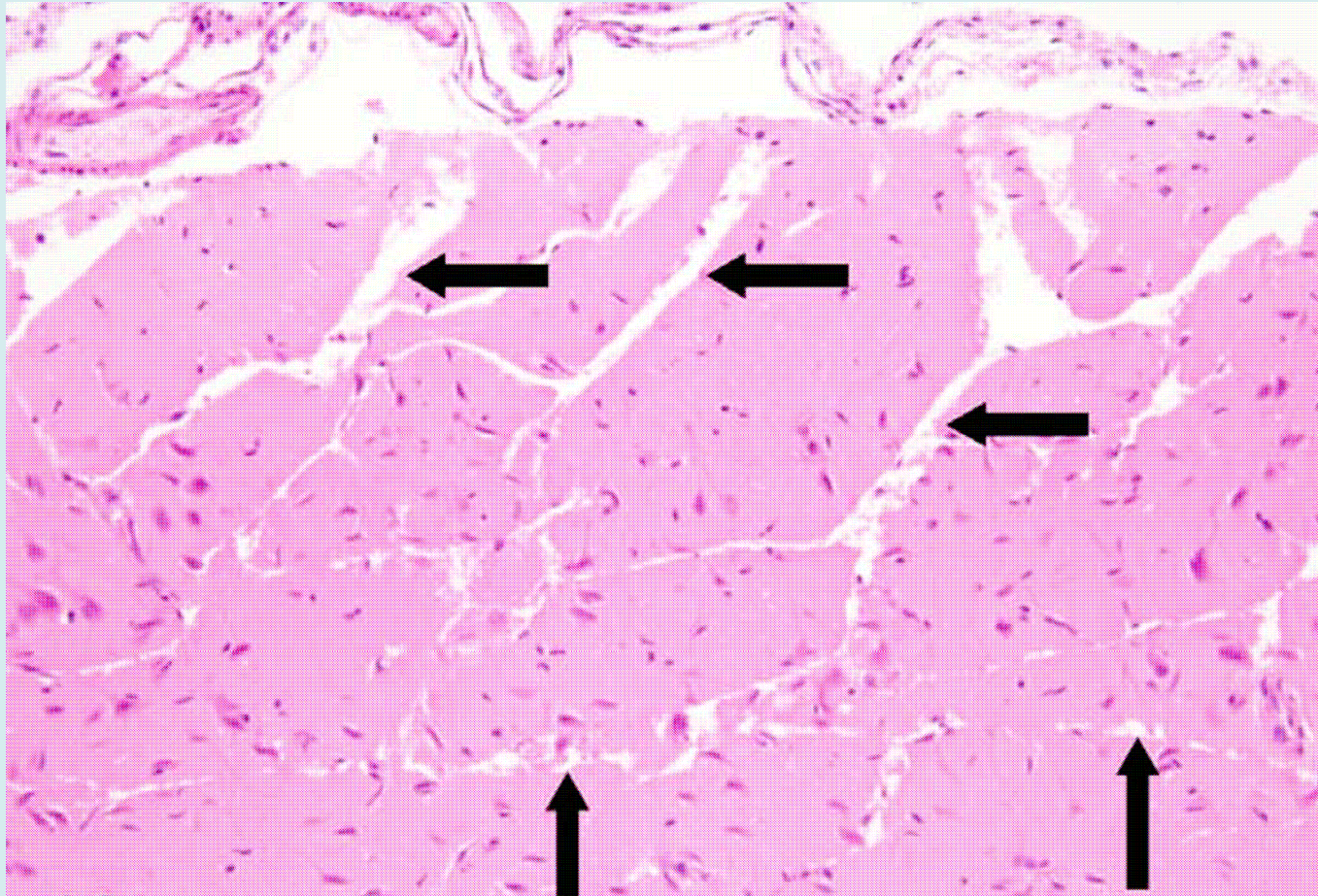


Tempo varia anche: dalle condizioni di mantenimento della carcassa (t° di conservazione, stagione); dal tipo di organo (es. pancreas, fegato e intestino si deteriorano prima)

Sotterrare il cadavere in terra fredda per rallentare l'autolisi. Una settimana di "sotterramento" di un gatto lo mantiene come se fosse morto da due ore e tenuto al fresco (King et al., 1989).

Se non strettamente necessario, non prelevare da carcasse o organi precedentemente congelati

ENCEFALO - ARTEFATTI DA CONGELAMENTO

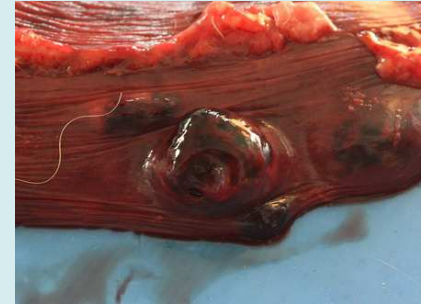


PRELIEVO DEL CAMPIONE

- **Lesioni piccole:** prelevare un campione che comprenda le lesioni
 - **Lesioni grandi:** prelevare un campione che comprenda il punto di transizione (margine) tra tessuto normale e tessuto patologico
- Evitare di prelevare solo la parte centrale delle lesioni (necrosi - neoplasie)

PRELIEVO DEL CAMPIONE

Lo **spessore** dei campioni non deve superare 1-2 cm per consentire al fissativo di penetrare nei tessuti; nel caso di lesioni di grosse dimensioni (es. neoformazioni) effettuare una o più incisioni



CAMPIONAMENTO DELL'ENCEFALO



FISSAZIONE DEL CAMPIONE

Serve a bloccare i fenomeni autolitici senza alterare la morfologia dei tessuti

Il fissativo più utilizzato è la **formalina al 10%** (= sol. di formaldeide al 4%) tamponata a pH 7-7,2

Vantaggi: semplice da preparare, poco costosa, penetra con facilità nei tessuti

Svantaggi: irritante e cancerogena

FISSAZIONE DEL CAMPIONE

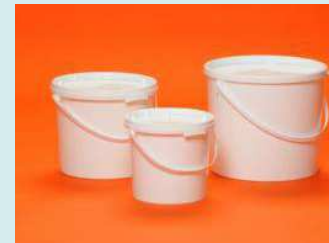
La formalina determina la formazione di legami a ponte tra le proteine (tra i residui di lisina), senza modificare in maniera determinante la struttura proteica e mantenendo l'antigenicità (ok per immunoistochimica)

FISSAZIONE DEL CAMPIONE

- Deve avvenire il prima possibile dopo il prelievo del campione
- Il campione deve essere immerso nel fissativo, rispettando un rapporto tra tessuto e formalina di almeno 1:10 e mantenuto a temperatura ambiente



- Il contenitore deve essere idoneo: infrangibile, a bocca larga, a chiusura ermetica

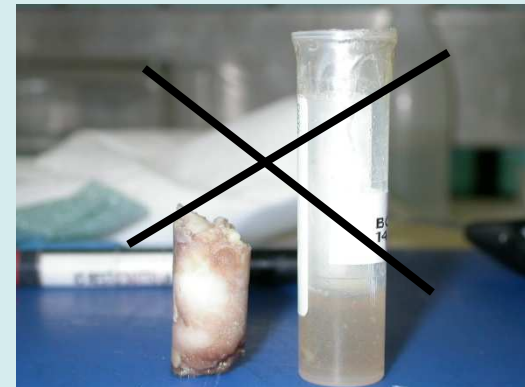


CONTENITORI



Dopo l'aggiunta del fissativo, agitare leggermente il contenitore per favorire la distribuzione del fissativo e l'immersione completa del campione

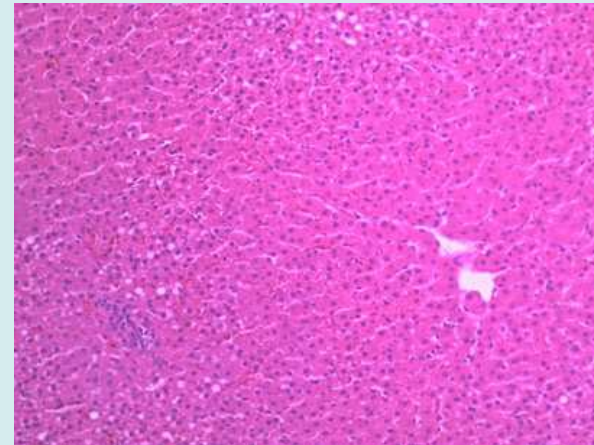
Evitare che parte del campione aderisca al fondo o alle pareti del contenitore



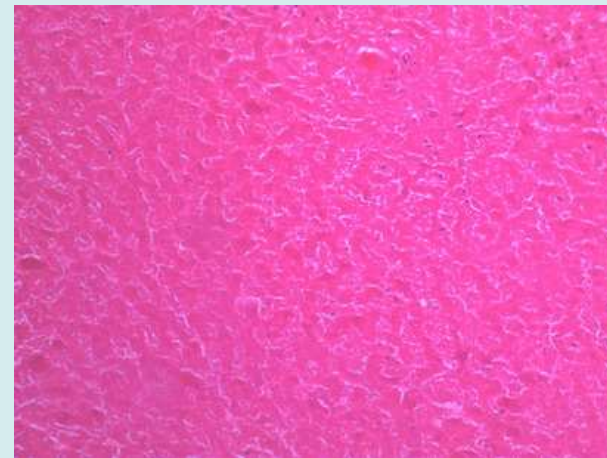
ESEMPI DI FISSAZIONE NON IDONEA



**Fissazione
idonea**



**Fissazione
non idonea**



FISSAZIONE DEL CAMPIONE

Il tempo necessario per la fissazione di un campione varia in relazione alle dimensioni e alle caratteristiche del campione, in genere **24 ore**

Tempi più lunghi per:

- campioni di grosse dimensioni (comparsa di fenomeni autolitici)
- campioni ricchi di sangue (es. milza, fegato)
- tessuti ricchi di lipidi (encefalo)
- campioni in formalina conservati a basse temperature



INVIO DEL CAMPIONE

I contenitori con i campioni devono essere inviati all'interno di sacchetti di plastica, in cui è presente materiale assorbente per tamponare eventuali fuoriuscite di formalina

La richiesta, corredata di **dati anamnestici**, deve essere posizionata all'esterno del sacchetto di plastica

Inviare a temperatura ambiente

DATI ANAMNESTICI

- **Segnalamento** (età, razza, ecc.)
- Sintomatologia/sospetto clinico
- **Quadro anatomopatologico**
- **Sospetto diagnostico**/esclusione di lesione o patologia

PROCESSAZIONE DEL CAMPIONE

Prima della processazione il campione viene sottoposto a "trimming", cioè ridotto di dimensioni e di spessore (max 5 mm), inserito all'interno di una biocassetta e lavato accuratamente in acqua corrente per eliminare l'eccesso di fissativo



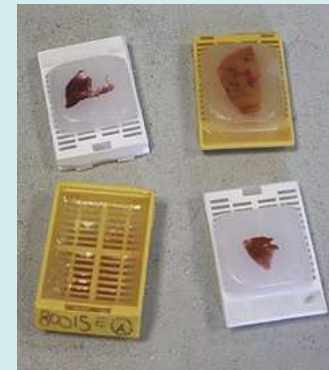
PROCESSAZIONE DEL CAMPIONE

La processazione avviene all'interno di uno strumento chiamato processatore, dove il campione subisce una progressiva disidratazione (da alcool 70° ad alcool assoluto) e successivamente una fase di infiltrazione di paraffina



INCLUSIONE DEL CAMPIONE

Consiste nell'intrappolare il campione in un materiale abbastanza duro e omogeneo (PARAFFINA), in modo da ottenere un blocchetto da cui si possono tagliare sezioni sottili ($<10\text{ }\mu\text{m}$)



SEZIONAMENTO DEL BLOCCHETTO

Consiste nel taglio al microtomo di fettine molto sottili (in genere 4- 5 μm), allo scopo di avere sezioni penetrabili dalla luce e quindi osservabili al microscopio. Le sezioni vengono adagiate su vetrini portaoggetti, asciugate e successivamente colorate



COLORAZIONE DELLA SEZIONE ISTOLOGICA



Prevede la sparaffinatura della sezione, seguita da una progressiva idratazione, una fase di colorazione, una successiva disidratazione, la chiarificazione e il montaggio del coprioggetto

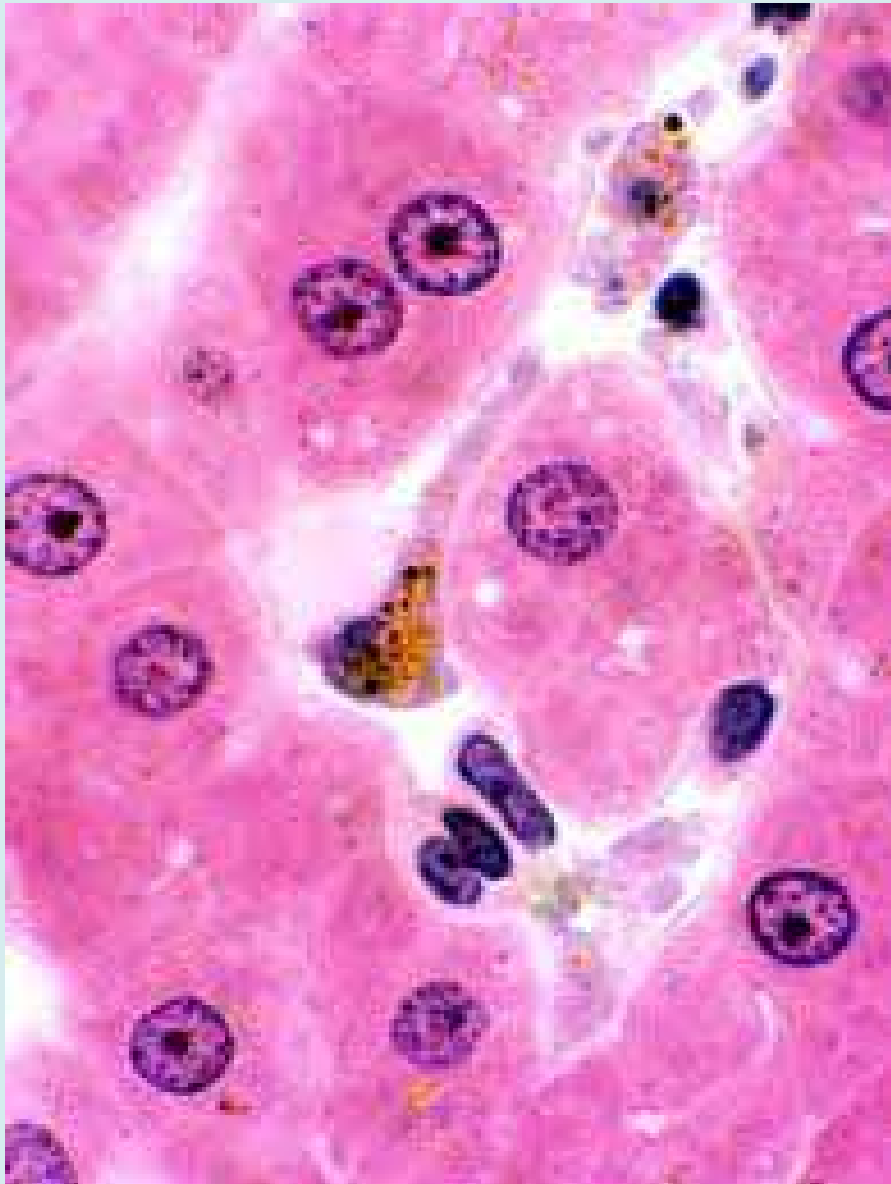


COLORAZIONE DELLE SEZIONI

La colorazione di routine è l'Ematossilina-Eosina (EE), che permette di contrastare le diverse strutture cellulari

L'**Ematossilina** è un colorante basico che mette in evidenza le componenti cariche negativamente (basofile, es. acidi nucleici): **NUCLEO BLU**

L'**Eosina** è un colorante acido che mette in evidenza le componenti cariche positivamente (eosinofile, es. proteine cellulari e mitocondriali): **CITOPLASMA ROSA-ROSSO**



COLORAZIONI ISTOCHIMICHE E IMMUNOISTOCHIMICHE

Vengono utilizzate per meglio definire alcune caratteristiche strutturali (es. Tricromica di Masson per il collagene maturo), sostanze minerali (es. colorazione di Perls per il ferro), per individuare popolazioni cellulari (es. immunoistochimica per citocheratina) e agenti infettivi (es. colorazione di Ziehl-Neelsen per i micobatteri, immunoistochimica per coronavirus)

REFERTO ISTOLOGICO

Vengono descritte le alterazioni presenti, indicando la tipologia (es. infiammazione o degenerazione), la distribuzione (es. diffusa o multifocale), la gravità (es. lieve o marcata) e la durata (es. acuta o cronica).

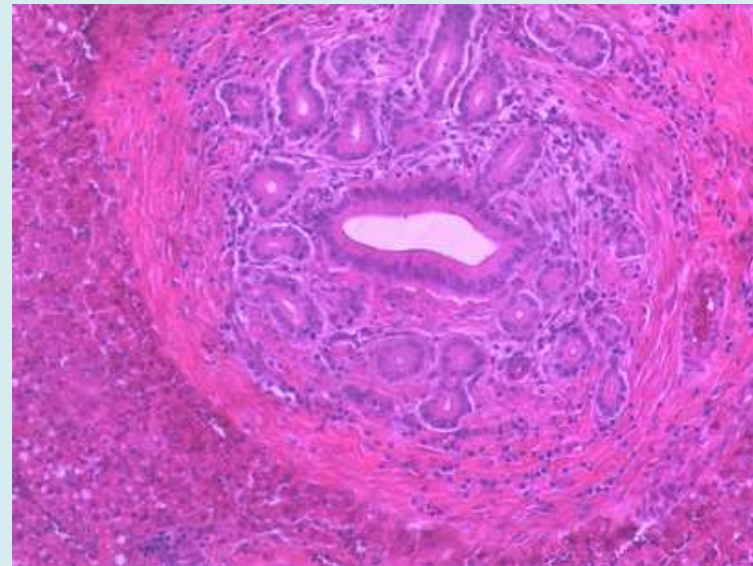
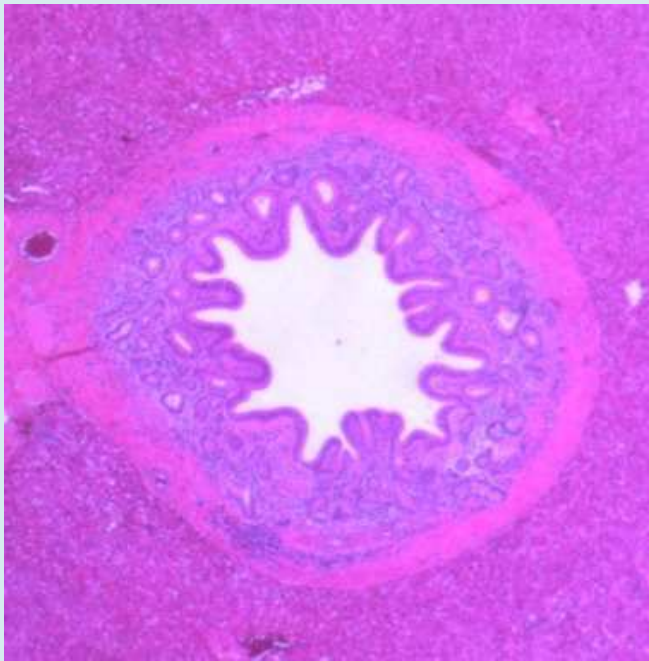
Spesso il quadro non è specifico o non consente di formulare con certezza una diagnosi eziologica (anamnesi)

Dove possibile, indicazione di **lesioni compatibili con ...**

o **lesioni riferibili a**

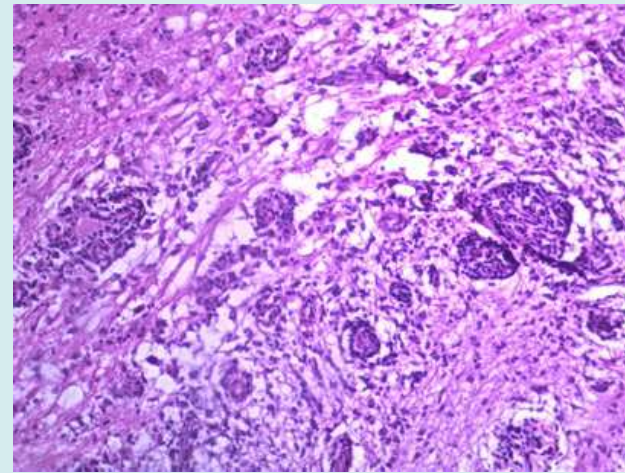
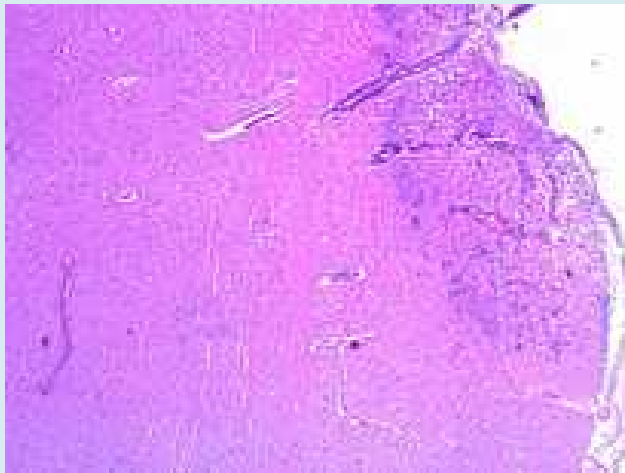
ESEMPI DI LESIONI COMPATIBILI CON

EPATITE PARASSITARIA (DICROCELIOSI)



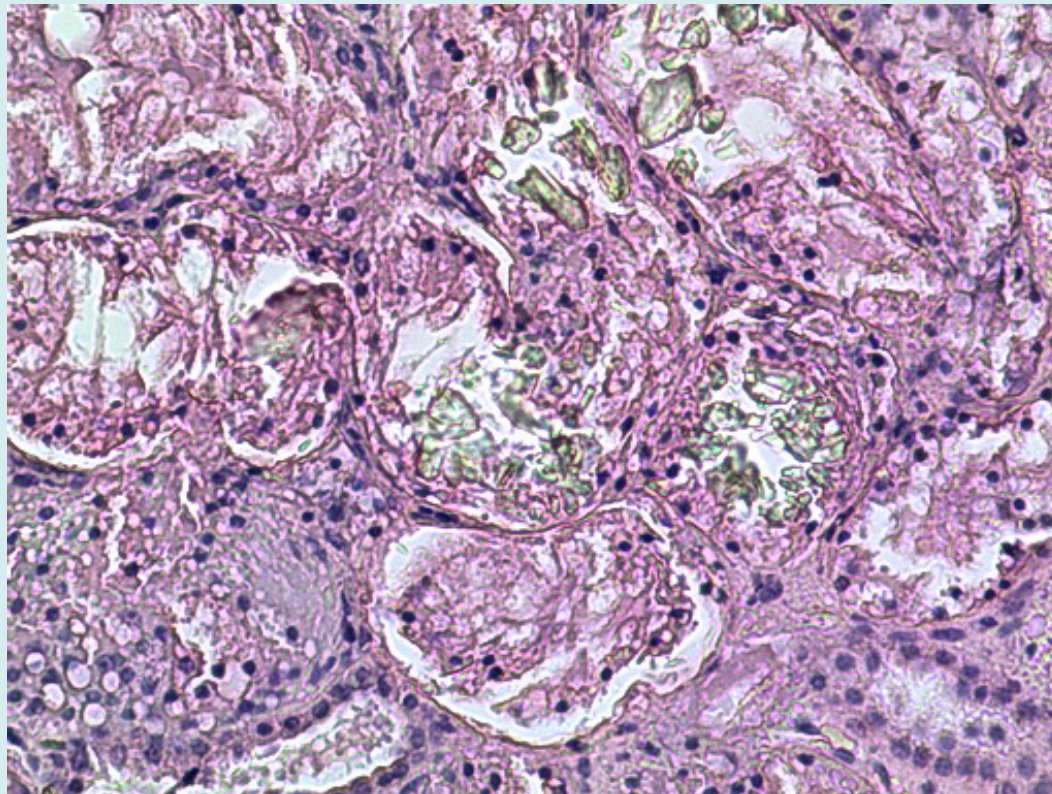
ESEMPI DI LESIONI COMPATIBILI CON

VISNA - OVINI



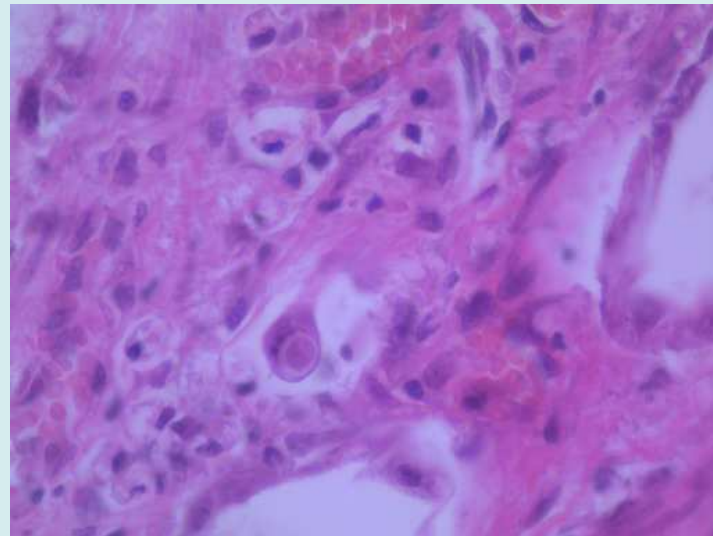
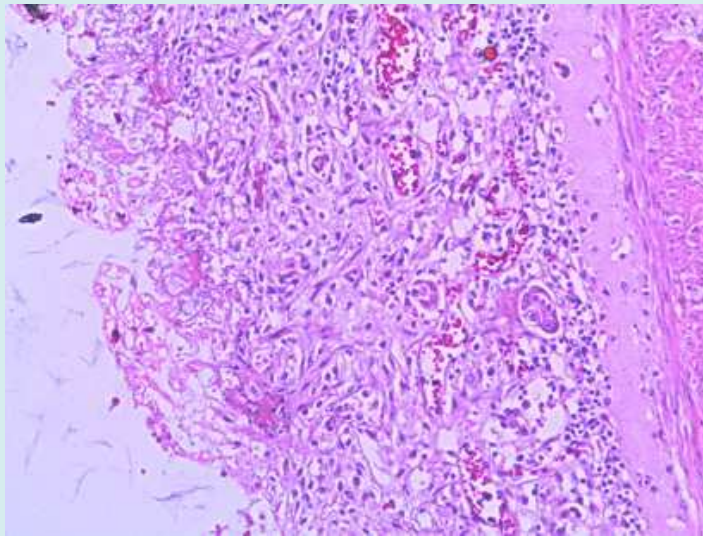
ESEMPI DI LESIONI COMPATIBILI CON

**AVVELENAMENTO DA GLICOLE ETILENICO
GATTO - RENE**



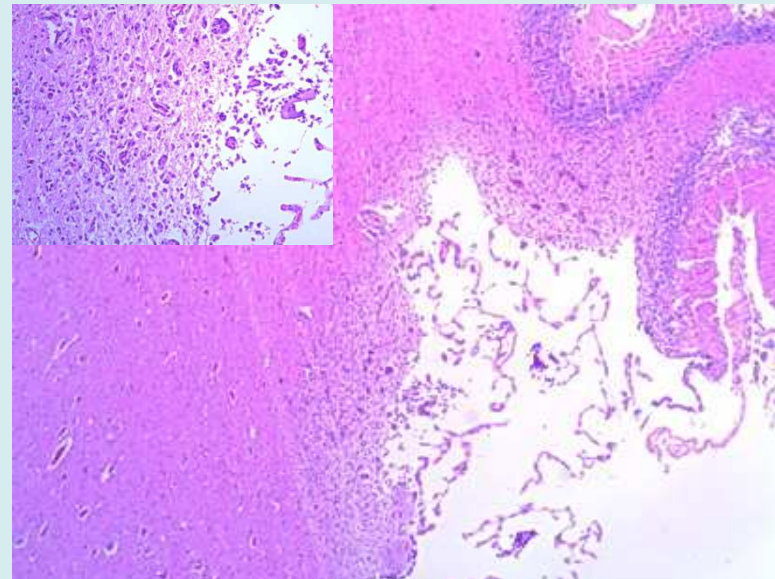
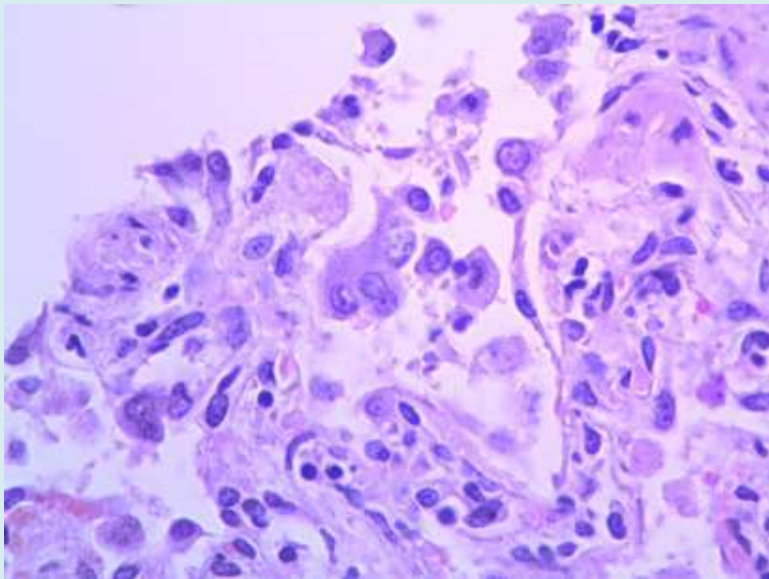
ESEMPI DI LESIONI RIFERIBILI A

PARVOVIROSI CANE E GATTO - INTESTINO



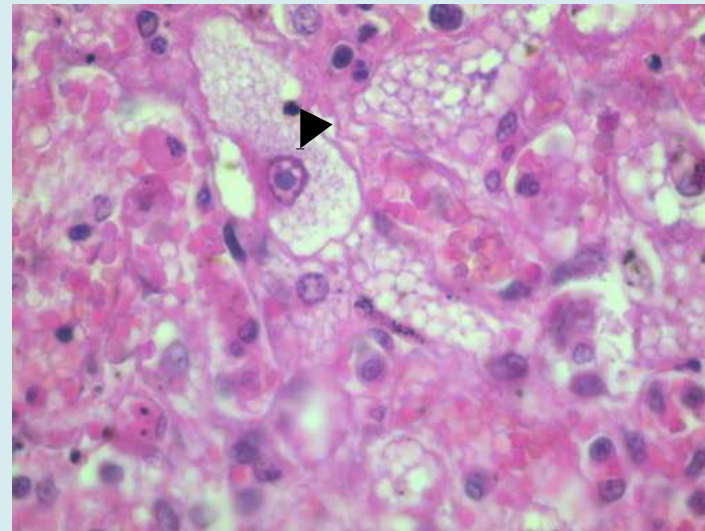
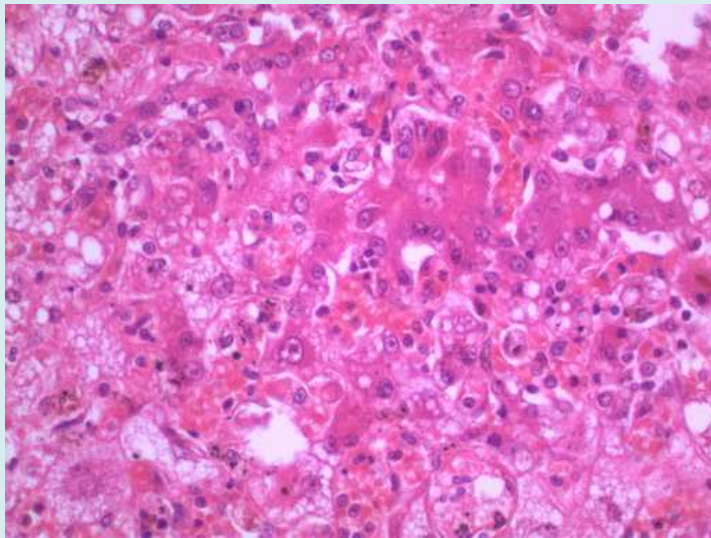
ESEMPI DI LESIONI RIFERIBILI A

CIMURRO CANE - POLMONE ed ENCEFALO



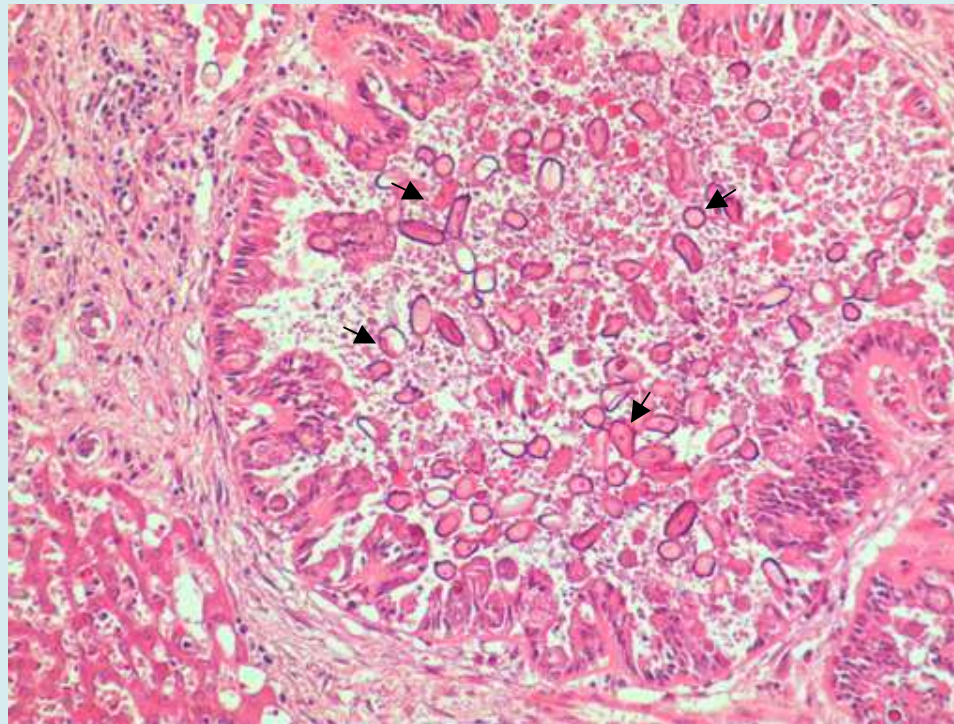
ESEMPI DI LESIONI RIFERIBILI A

EPATITE INFETTIVA CANE - FEGATO



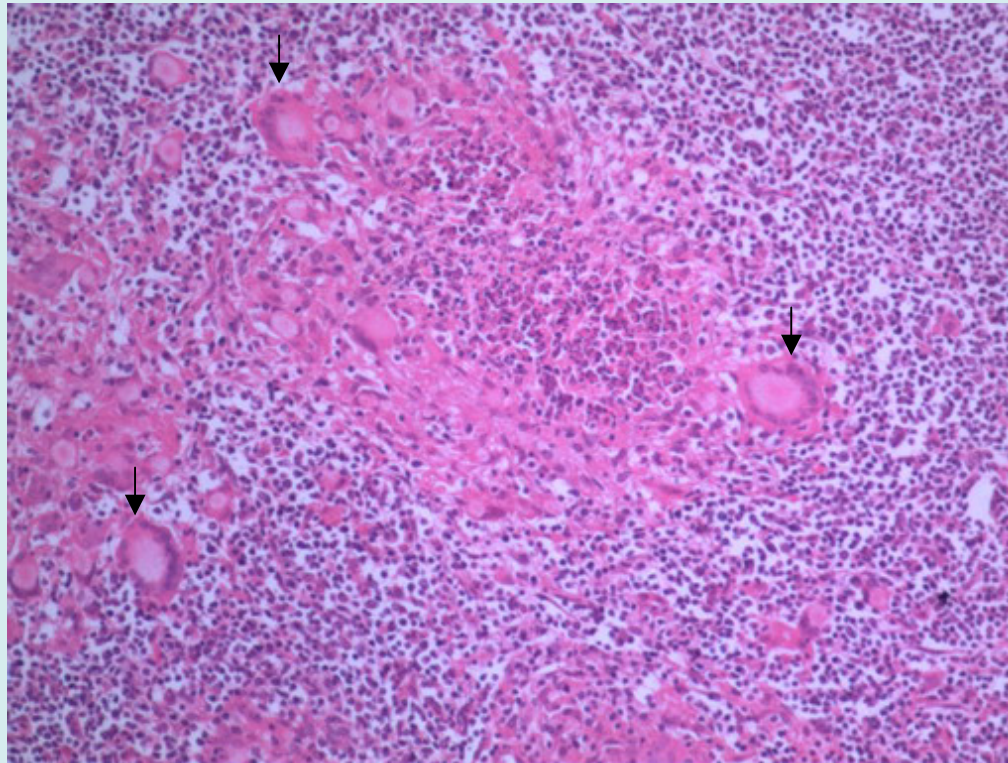
ESEMPI DI LESIONI RIFERIBILI A

COCCIDIOSI CONIGLIO - FEGATO



ESEMPI DI LESIONI RIFERIBILI A

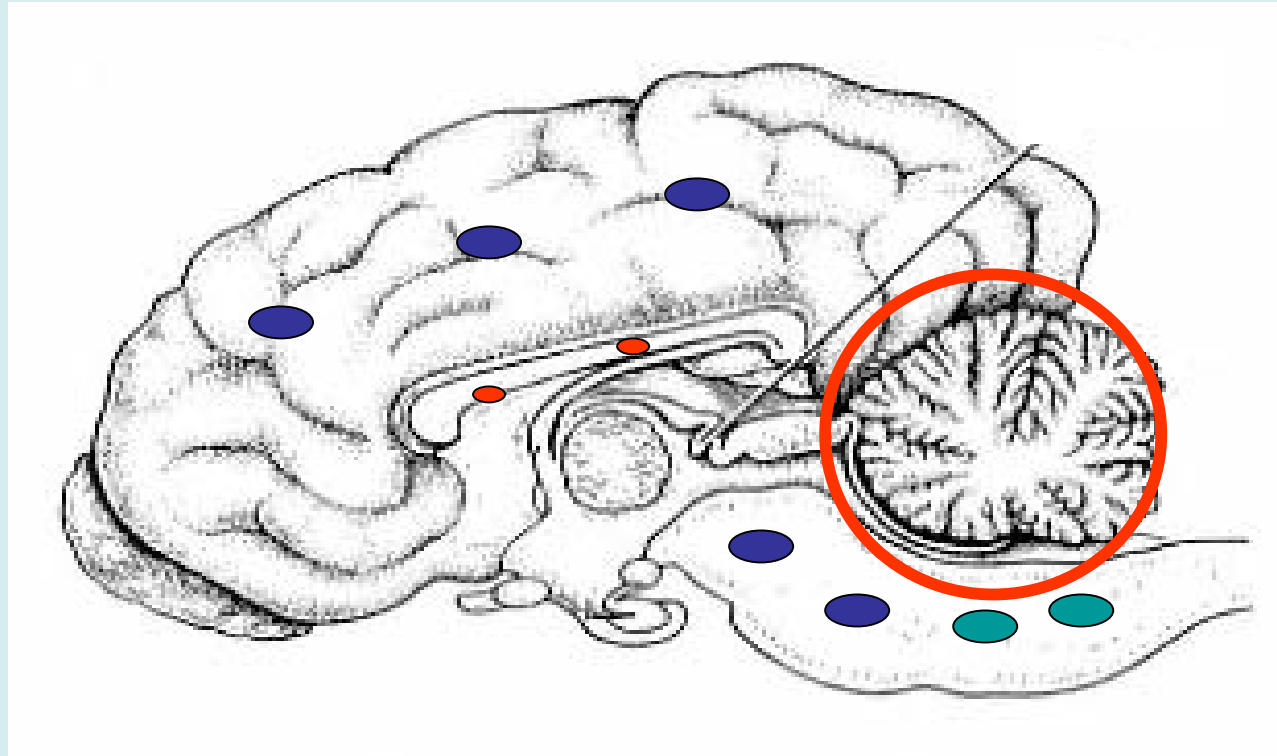
TUBERCOLOSI BOVINA - LINFONODO TORACICO




Cosa devo prelevare se sospetto.....


In alcuni casi, per confermare il sospetto di una patologia specifica o per escluderla, è importante effettuare il campionamento degli organi target o di specifiche aree dell'organo target (SNC)

ENCEFALO CANE

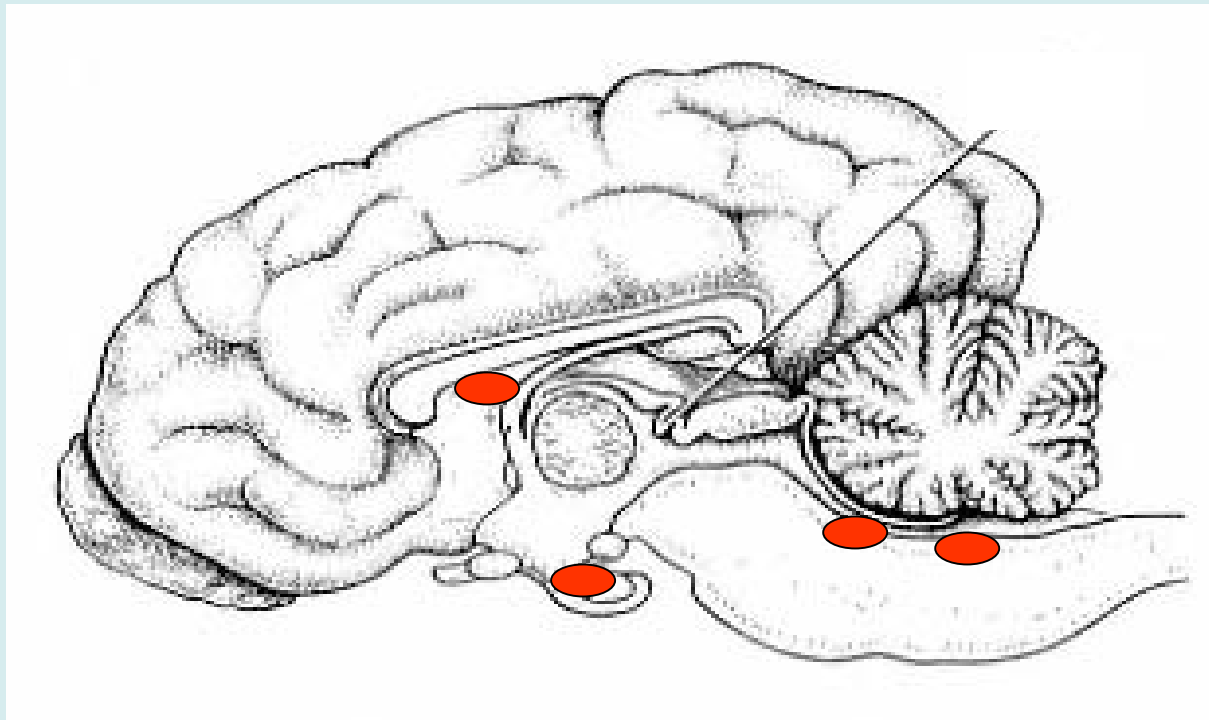


 Cimurro

 Encefalite
del cane
vecchio

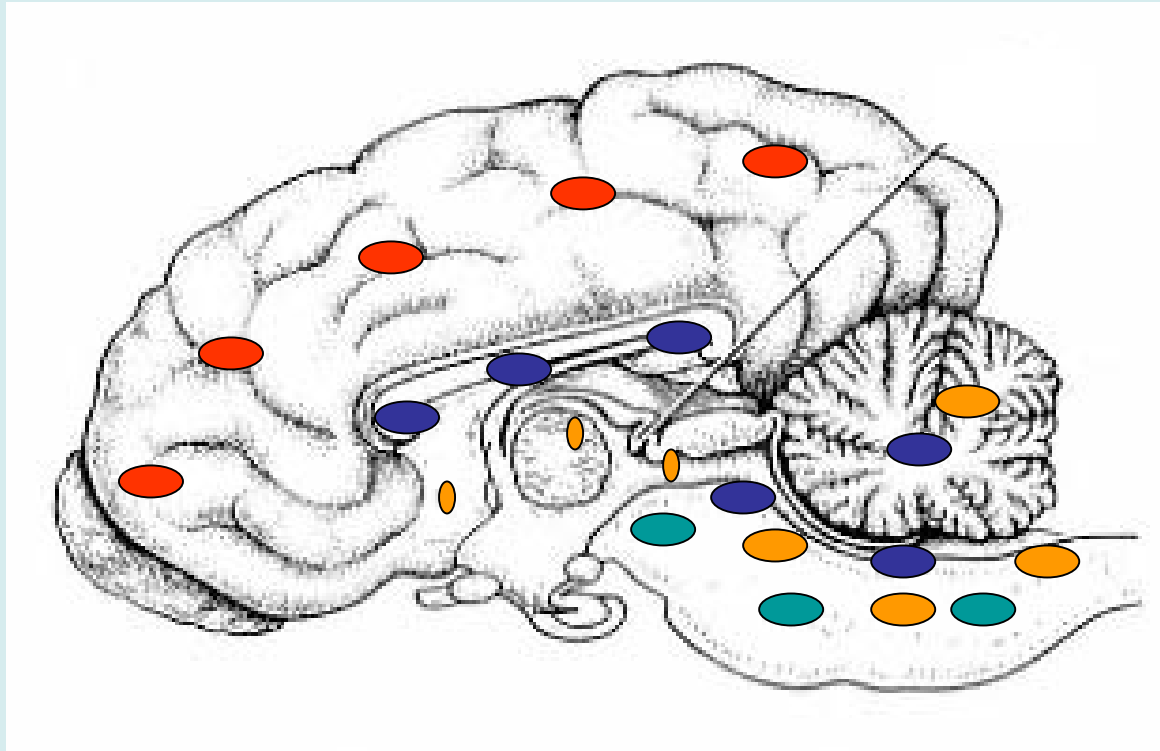
 Pseudorabbia

ENCEFALO GATTO



 FIP nervosa

ENCEFALO OVINO



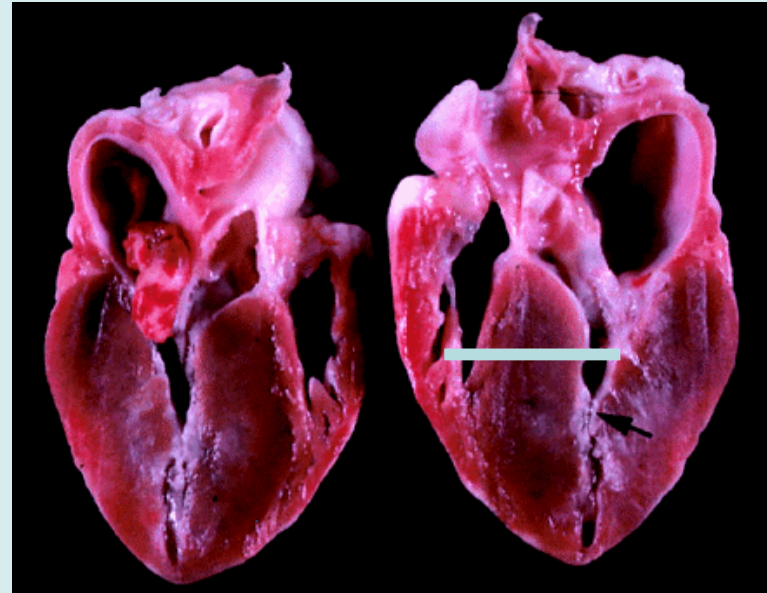
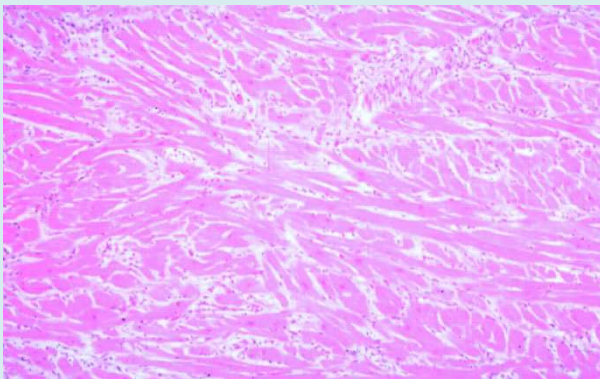
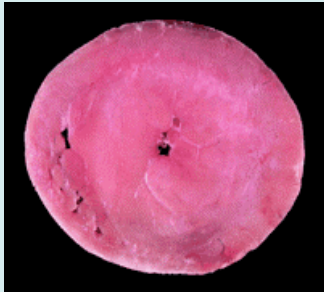
Polioencefalomalacia

Visna

Listeriosi

Scrapie

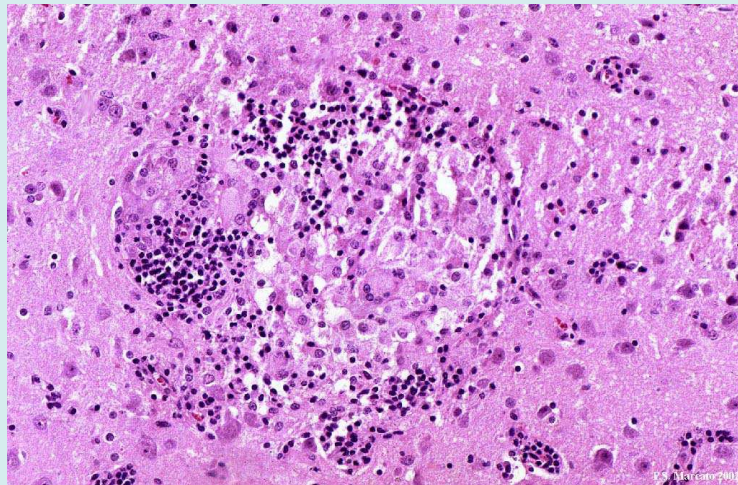
Cardiomiopatia ipertrofica felina



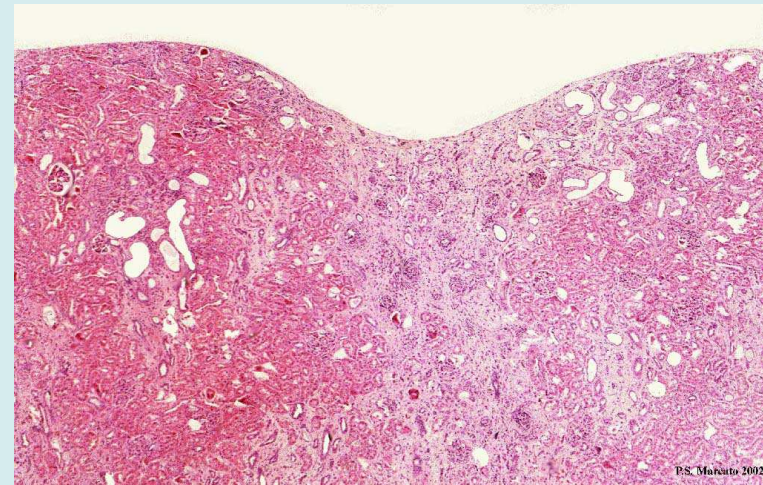
Prelevare il Setto
interventricolare

Encefalitozoonosi coniglio

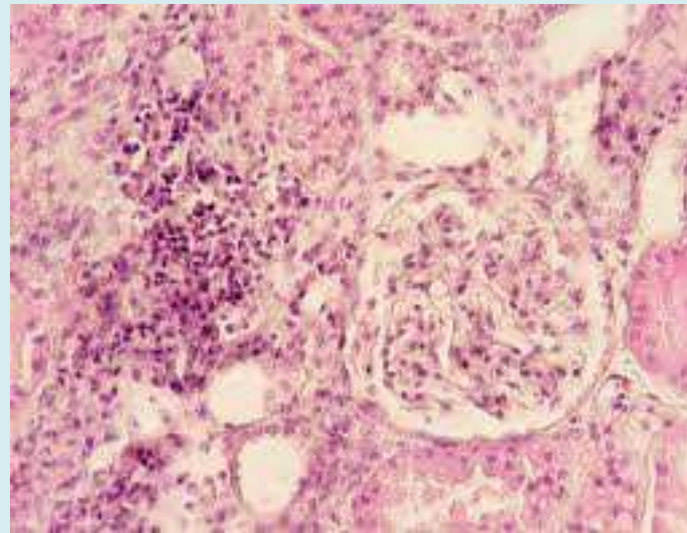
Encefalo - corteccia
cerebrale



Rene



Peritonite Infettiva Felina



Nelle forme essudative:
prelevare sempre il RENE

Assenza di lesioni specifiche (es. congestione generalizzata)

Prelevare una porzione degli organi principali, compreso l'encefalo

Molto importante l'anamnesi!

Grazie per l'attenzione!

Histoart

