



LE COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

Dott.ssa Roberta Meoli

Corso interno
L'ISTOLOGIA A SUPPORTO
DELL'INDAGINE NECROSCOPICA
4-12-2014



Significato della colorazione

I campioni biologici a fresco (non preventivamente colorati) non possono essere analizzati microscopicamente. Diviene quindi necessario ricorrere a delle colorazioni delle strutture biologiche per instaurarvi una certa disomogeneità di comportamento nei confronti della luce bianca e rendere possibile l'individuazione delle strutture. Il fine è quello di aumentare il contrasto dei componenti morfologici cellulari o tissutali affinché ne risulti una migliore analisi microscopica (EE), oppure quello di identificare e localizzare specifiche sostanze chimiche all'interno di una cellula (*citochimica*) o di un tessuto (*istochimica*)

La **colorazione con ematossilina eosina** (abbreviata **EE**) è la colorazione di base nello studio microscopico dei tessuti animali e negli esami istopatologici di routine (colorazione morfologica)

Cosa si intende per colorazione istochimica??



Le colorazioni istochimiche danno informazioni, più che sull'aspetto morfologico del preparato, sul contenuto e sulla natura delle sostanze chimiche contenute nei tessuti biologici esaminati. Si eseguono quindi una o più reazioni chimiche che mettono in evidenza un determinato gruppo funzionale o un particolare ione, presenti nei vari tessuti e nelle cellule che li compongono. I precipitati colorati così ottenuti saranno evidenti al microscopio ottico.

Dal punto di vista chimico le reazioni devono essere:

1) Specifiche

2) Sensibili

3) Sicure

Le reazioni istochimiche possono essere classificate anche come:

1) Dirette (la sostanza da identificare forma un prodotto con il reattivo dando una colorazione specifica)

2) Indirette (la sostanza viene prima modificata, per es. dal fissativo, e poi fatta reagire con il reattivo)

Le sostanze presenti nelle cellule e nei tessuti che possono essere svelate con metodiche istochimiche sono riconducibili a 5 gruppi:

- 1) acidi nucleici
- 2) proteine e peptidi
- 3) glucidi e mucopolisaccaridi
- 4) lipidi
- 5) ioni inorganici

Colorazioni istochimiche più
utilizzate nel nostro laboratorio
d'istologia

ZIEHL NEELSEN

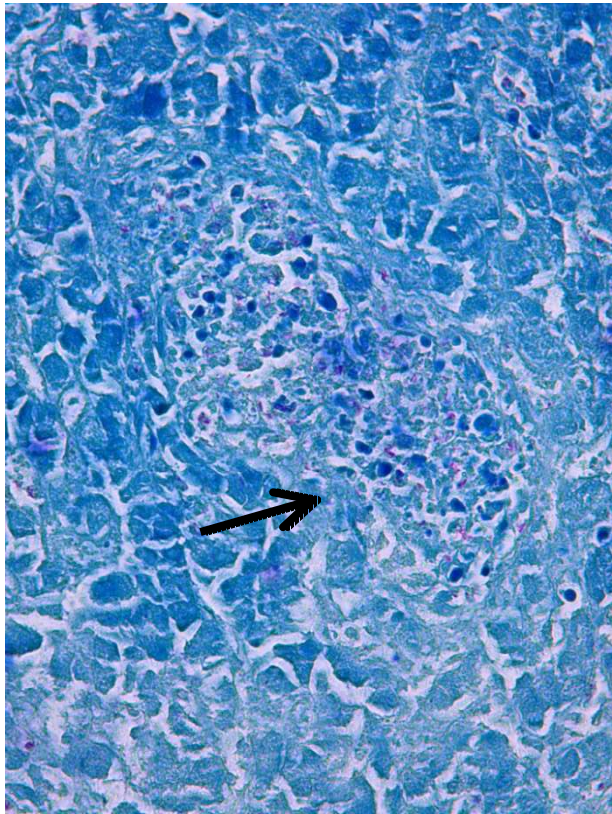
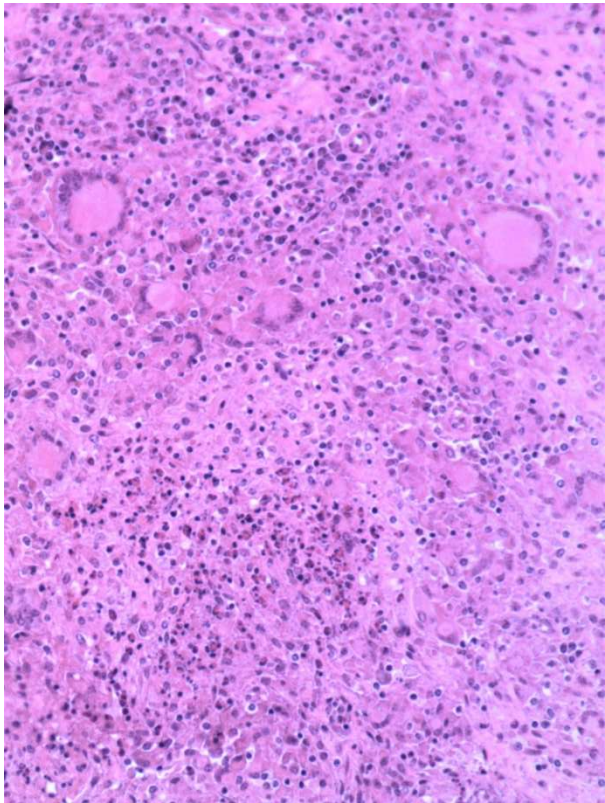
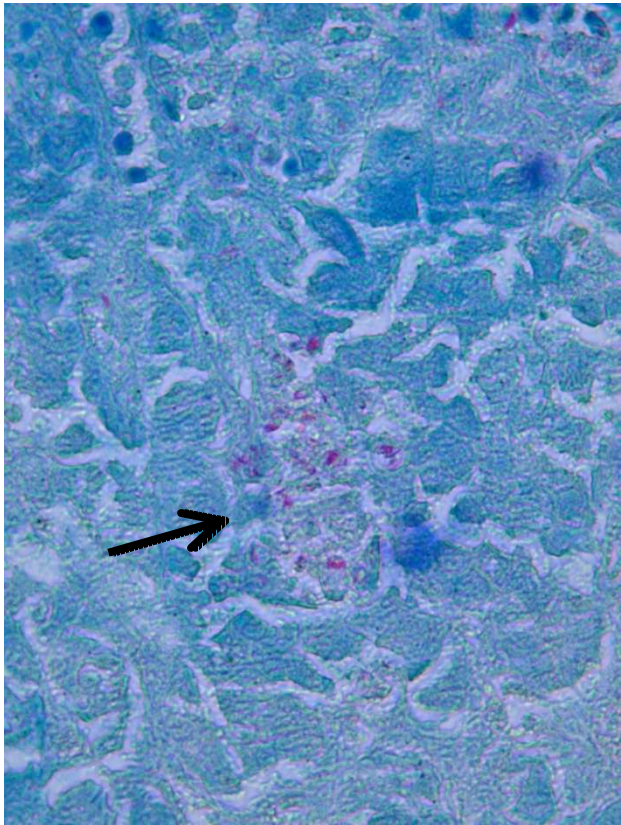
Consente di riconoscere la presenza dei micobatteri in un campione sfruttando la caratteristica alcool-acido resistenza di tali microrganismi. I micobatteri, per la particolare struttura e composizione della parete cellulare, hanno la capacità di trattenere la colorazione della fucsina basica di Ziehl anche quando trattati con decoloranti come l'alcool o gli acidi minerali.

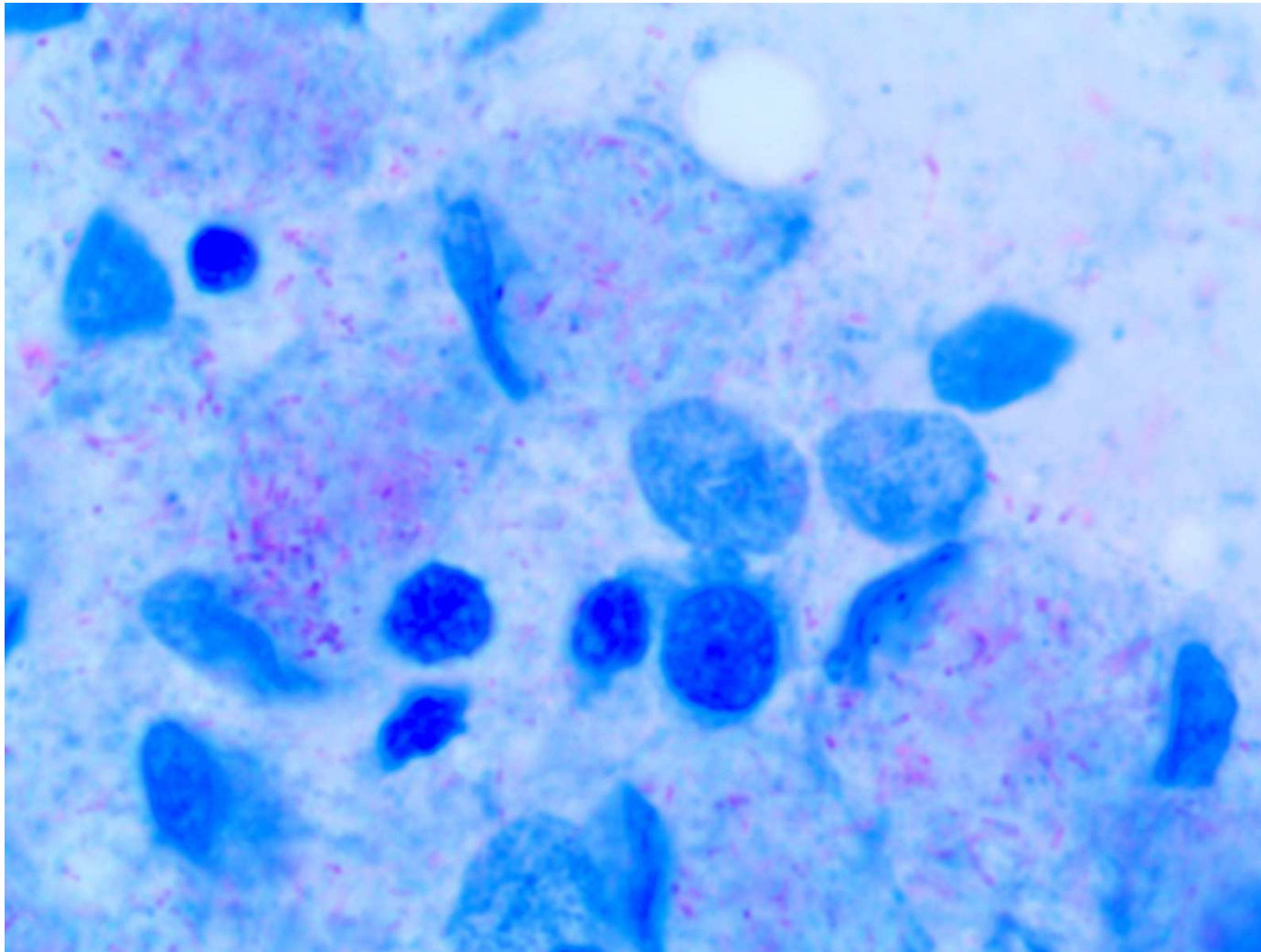
I micobatteri, essendo alcool-acido resistenti, trattengono la fucsina e appaiono colorati in rosso su di uno sfondo blu pallido.

La presenza eventuale di altri batteri, non resistenti alla decolorazione, è evidenziata dall'assunzione del blu di metilene e dalla colorazione blu scura.

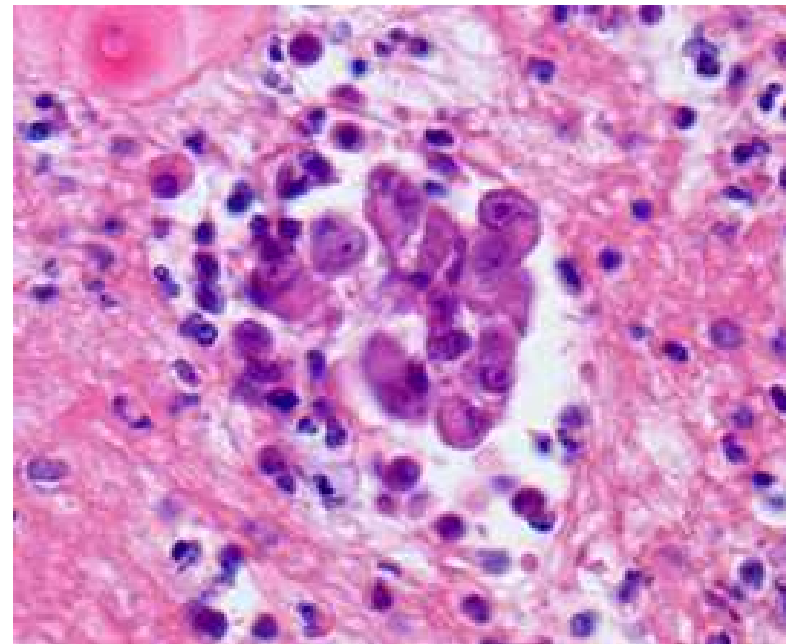
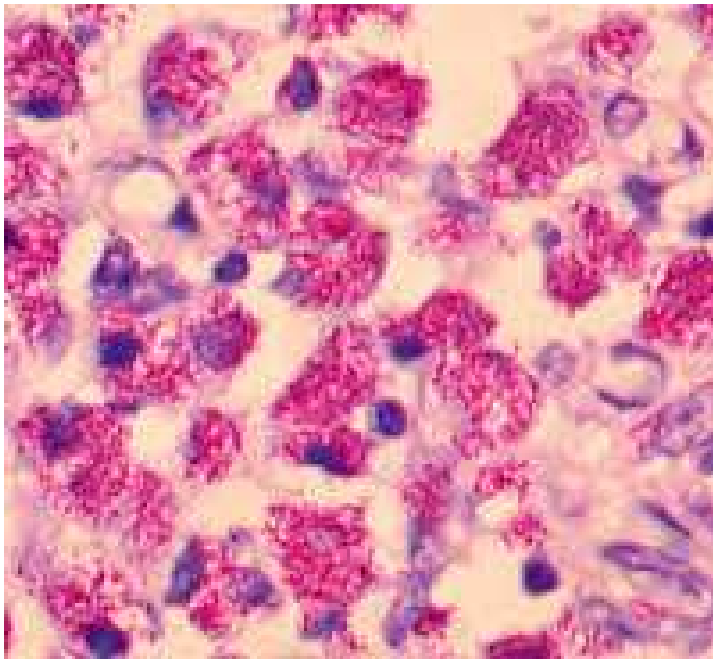
Quando la utilizziamo:

- Tubercolosi
- Paratubercolosi





Tubercolosi in un cane – linfonodo mediastinico



Paratuberculosis

PAS

(dell'acido periodico di Schiff)

Mette in evidenza la presenza di glucidi

Il metodo si fonda sul seguente principio: i polisaccaridi (semplici e mucopolisaccaridi), quando ossidati a mezzo dell'acido periodico (H₅IO₆), danno origine ad aldeidi. I gruppi aldeidici vengono quindi rivelati istologicamente a mezzo del reattivo di Schiff. Quindi, in definitiva, questa reazione permette alle strutture contenenti polisaccaridi di assumere una colorazione rossa.

Risultati

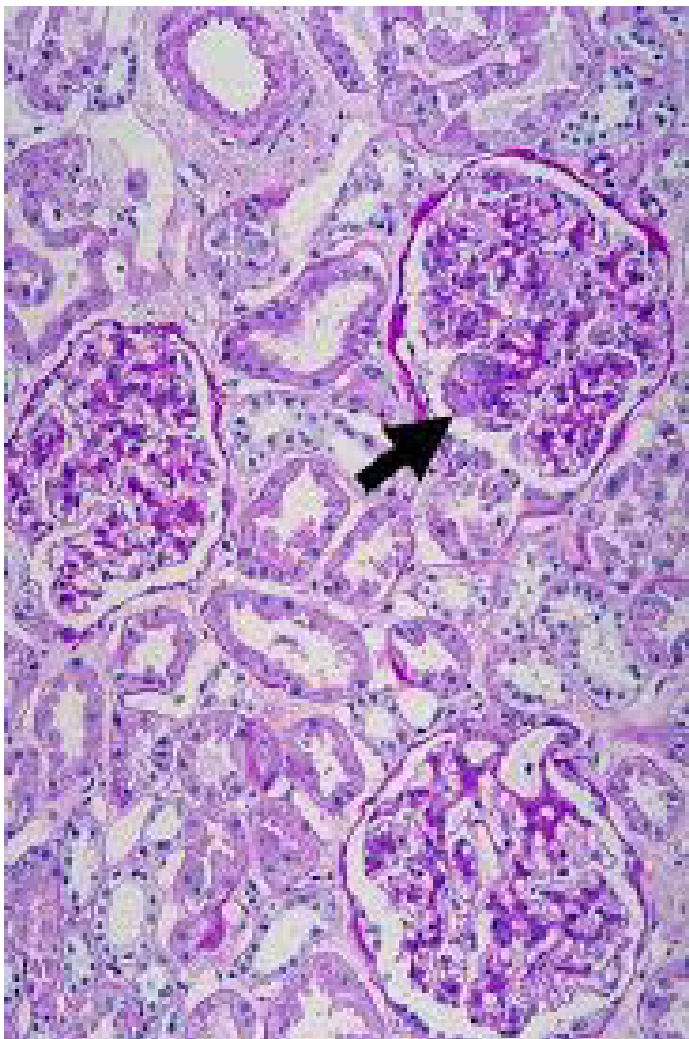
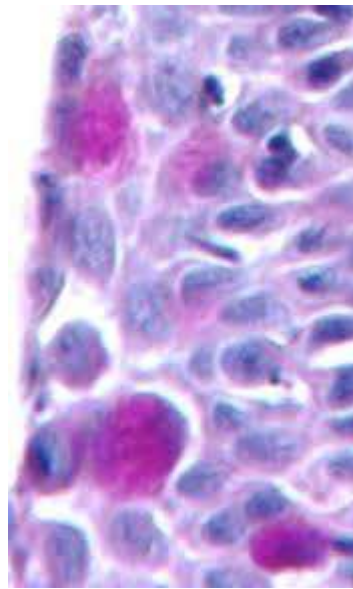
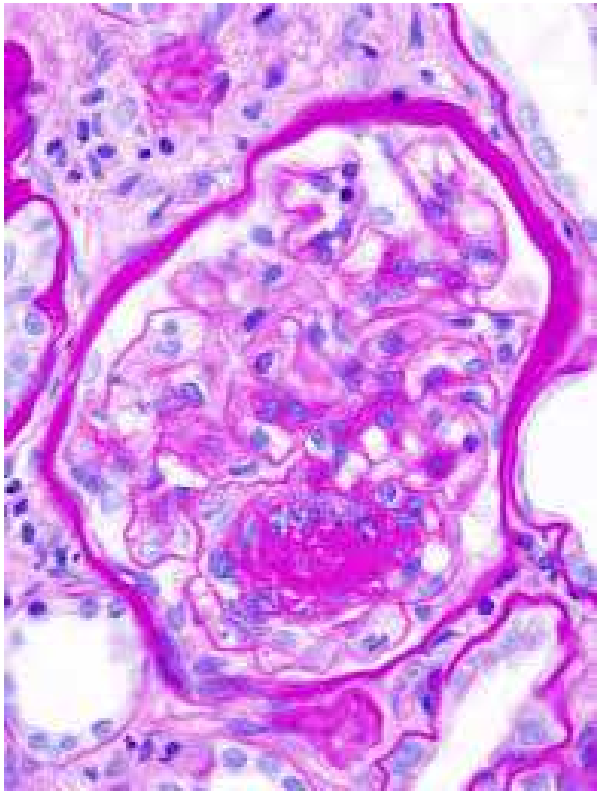
Sostanze PAS-positive: rosso magenta

Nuclei: viola-blu

Fisiologicamente sono PAS-positive la mucina delle cellule calciformi del sistema gastrointestinale e di quello respiratorio, le membrane basali, la cartilagine e il glicogeno.

Quando la utilizziamo?

- Glomerulonefriti membranose o membrano/proliferative: mette in evidenza l'ispessimento delle membrane dei capillari glomerulari e della capsula
- Identificare le plasmacellule
- Miceti

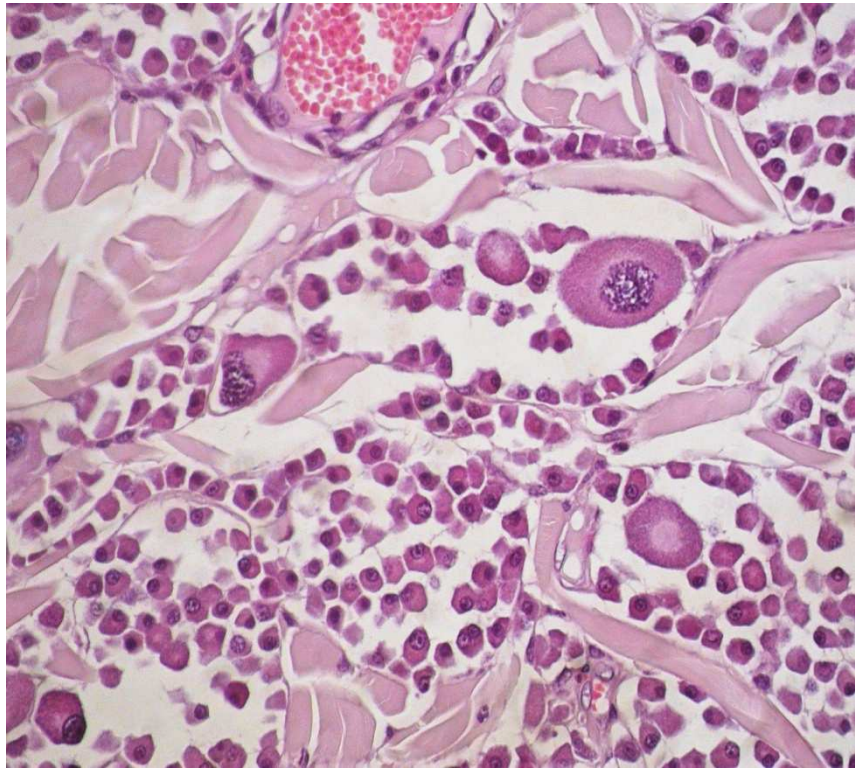


GIEMSA

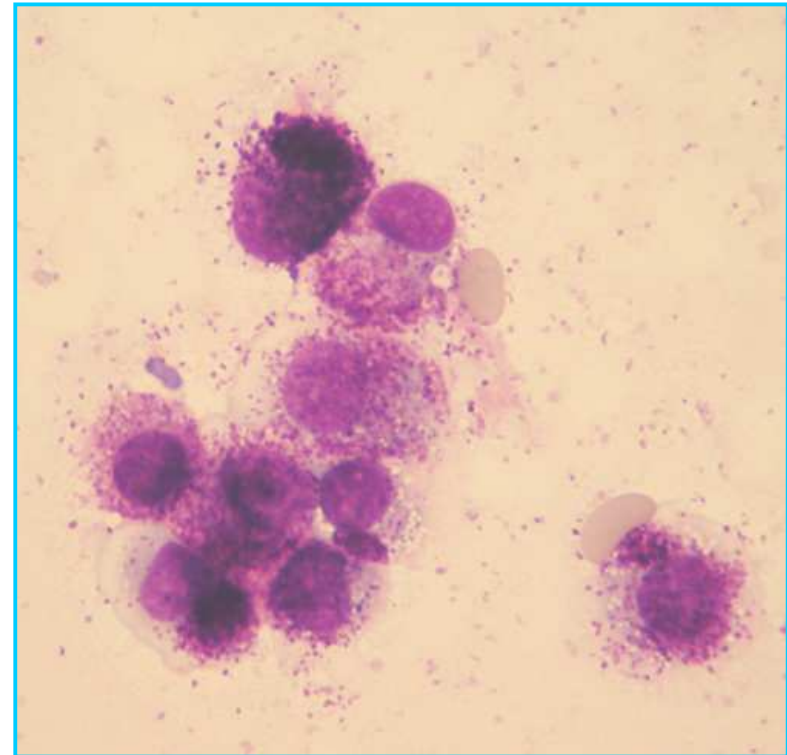
La **colorazione di Giemsa** si basa sulla differenziazione dei costituenti cellulari che hanno reazione basica, i quali fissano l'eosina (acida) colorandosi in rosso-arancio. Gli altri componenti cellulari aventi reazione acida si colorano in blu, con i prodotti di ossidazione del blu di metilene azzurri (basici).

È molto rapida e poco costosa ed inoltre è indicato per colorazione degli strisci di sangue, di midollo osseo e di campioni clinici citologici.

Utilizzata soprattutto per mettere in evidenza i granuli intracitoplasmatici dei mastociti, in quanto con l'EE non si colorano, mentre la colorazione di giemsa mette in evidenza la loro metacromasia



Ematossilina-eosina



Giemsa

TRICROMICA

Le colorazioni del tipo “tricromatico” sono impiegate essenzialmente per distinguere il collagene dal tessuto muscolare.

Tricromica di gomori

Mette in evidenza le proteine delle fibre collagene

È particolarmente indicata per riconoscere i vari tipi di cellule del connettivo. In generale sono costituite da tre coloranti (nucleare, collagenico e citoplasmatico)

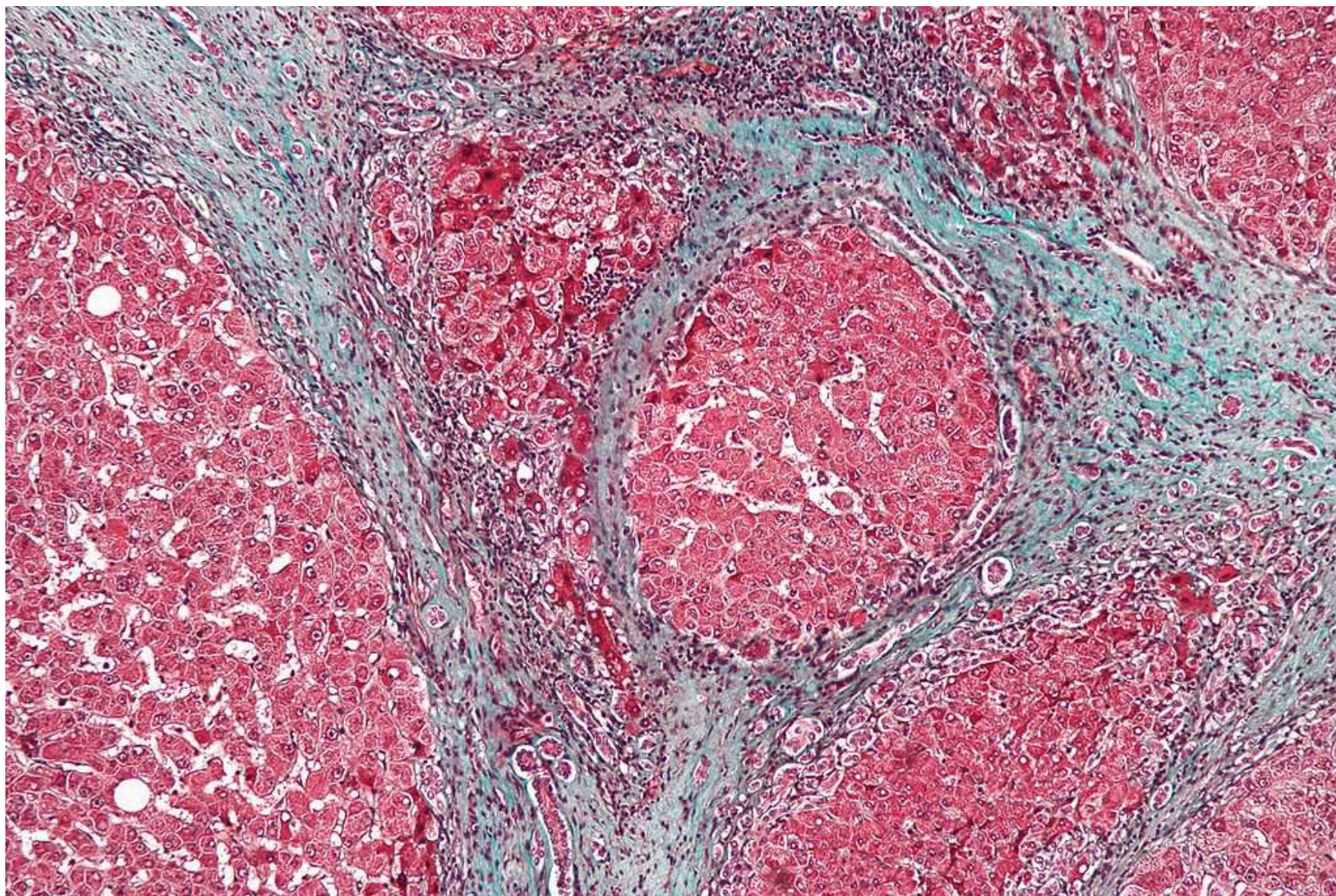
Risultati :

- Nuclei – Da blu a nero
- Collagene – Verde
- Citoplasma, muscoli – Rosso

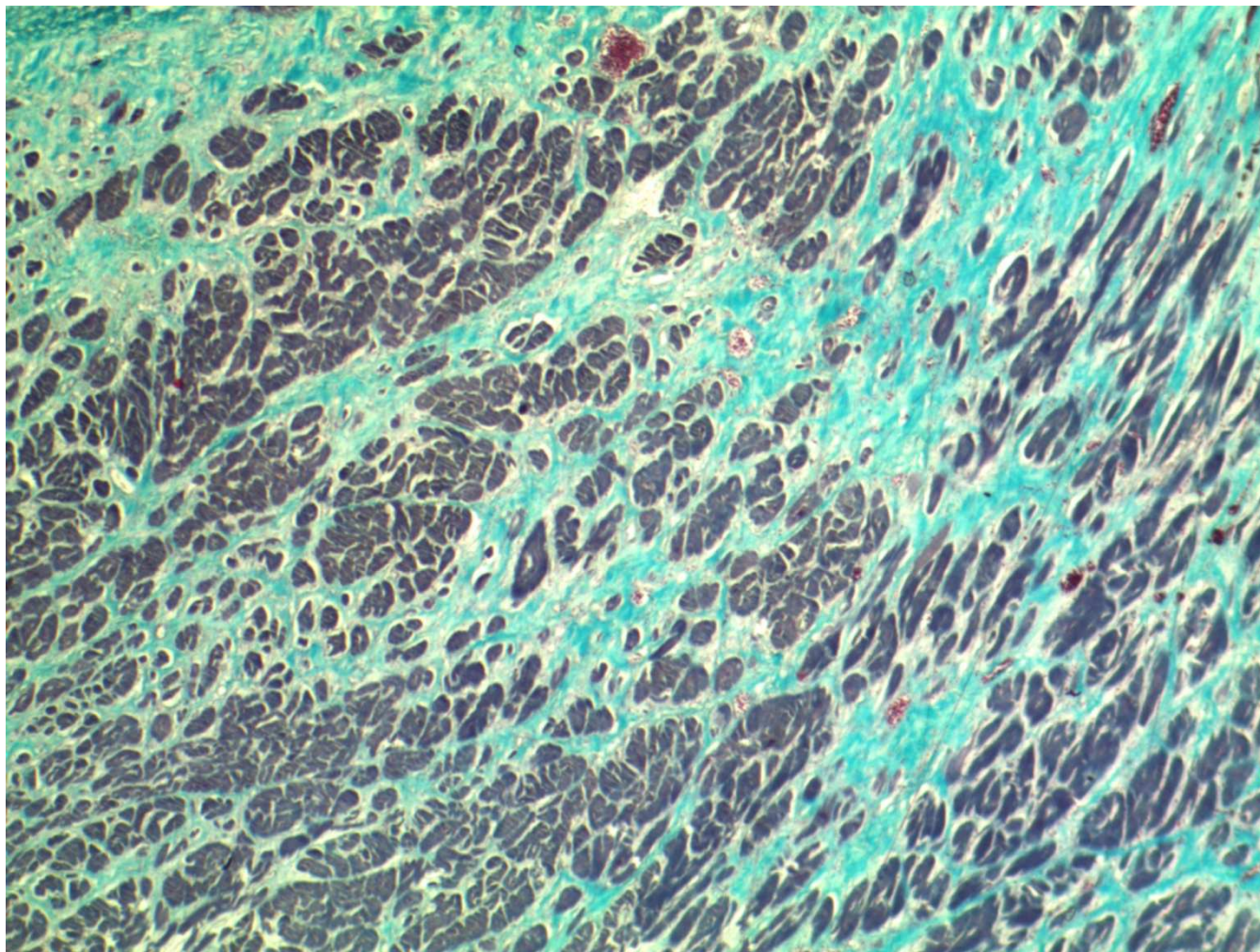
Quando le utilizziamo?

Sospetto miodistrofie

Valutare l'estensione della fibrosi renale



Fegato con cirrosi

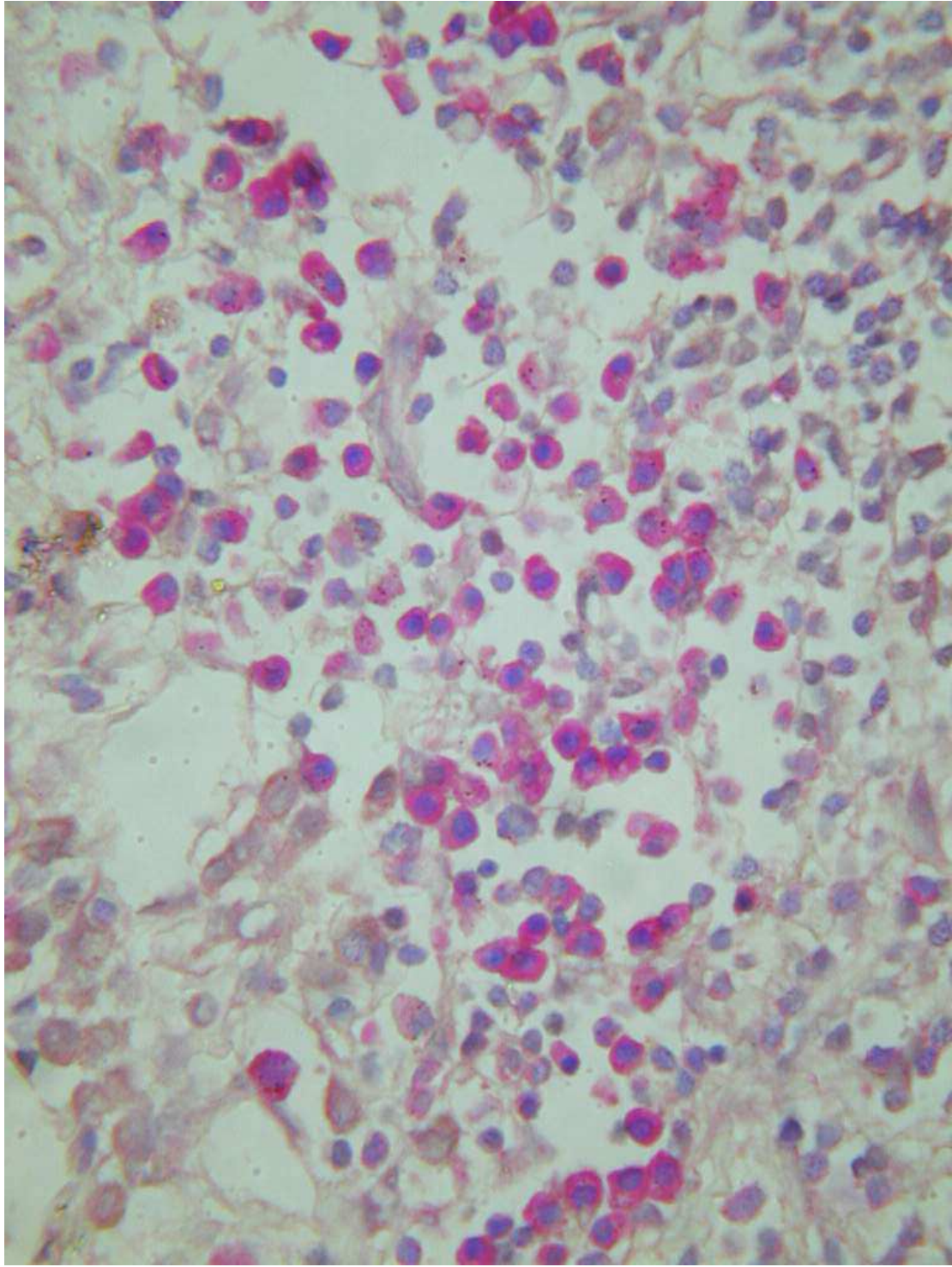


Miocardio di scimpanzè con marcata fibrosi

Verde di metil-Pironina

Mette in evidenza gli acidi nucleici; per mostrare contemporaneamente DNA e RNA, la cromatina (contenente DNA) si colora di verde (dal *verde di metile*), mentre il nucleolo e le zone basofile del citoplasma (contenenti RNA) si colorano di rosso (dalla *pironina*).

La utilizziamo soprattutto per mettere in evidenza le plasmacellule neoplastiche



Perls

Mette in evidenza gli Ioni di Ferro

Questa tecnica serve per rivelare il ferro che si localizza nelle cellule sotto forma di granuli di emosiderina.

La reazione di Perls si basa sulla liberazione degli ioni Fe associati alle proteine mediante l'azione dell'acido cloridrico; questi ioni una volta liberati reagiscono con il ferrocianuro di potassio formando un precipitato blu detto ferrocianuro ferrico o blu di Prussia.

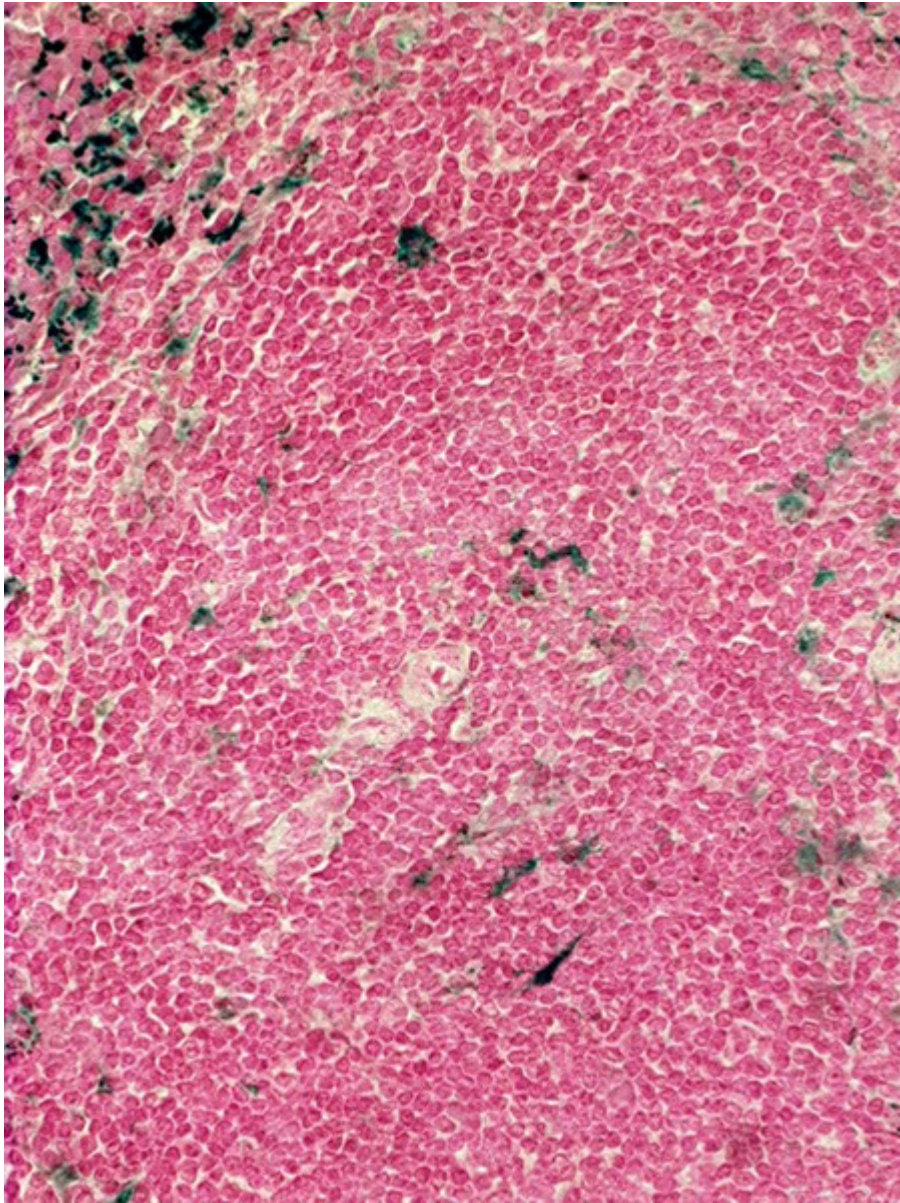
Risultati:

Precipitati dove si trova il ferro : blu

Quando la utilizziamo?

Per valutare un'emorragia

Medicina forense (es. valutare la durata di un'emorragia)



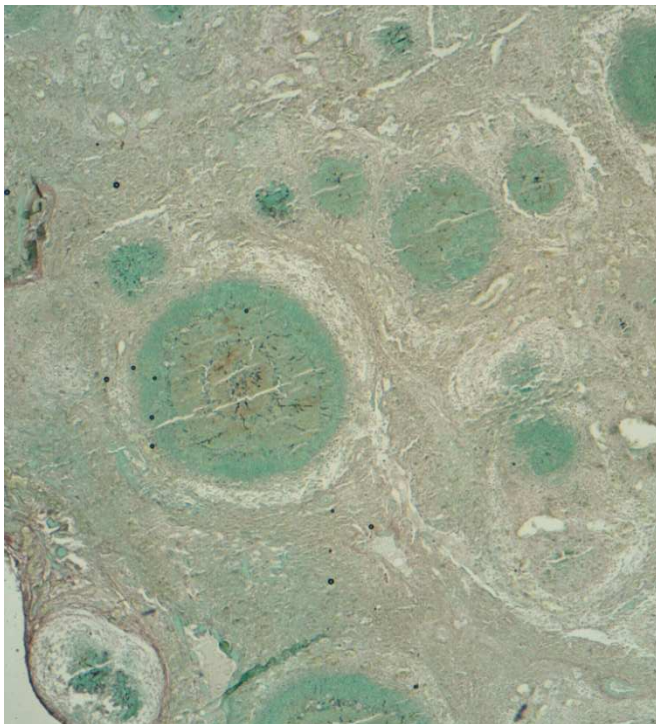
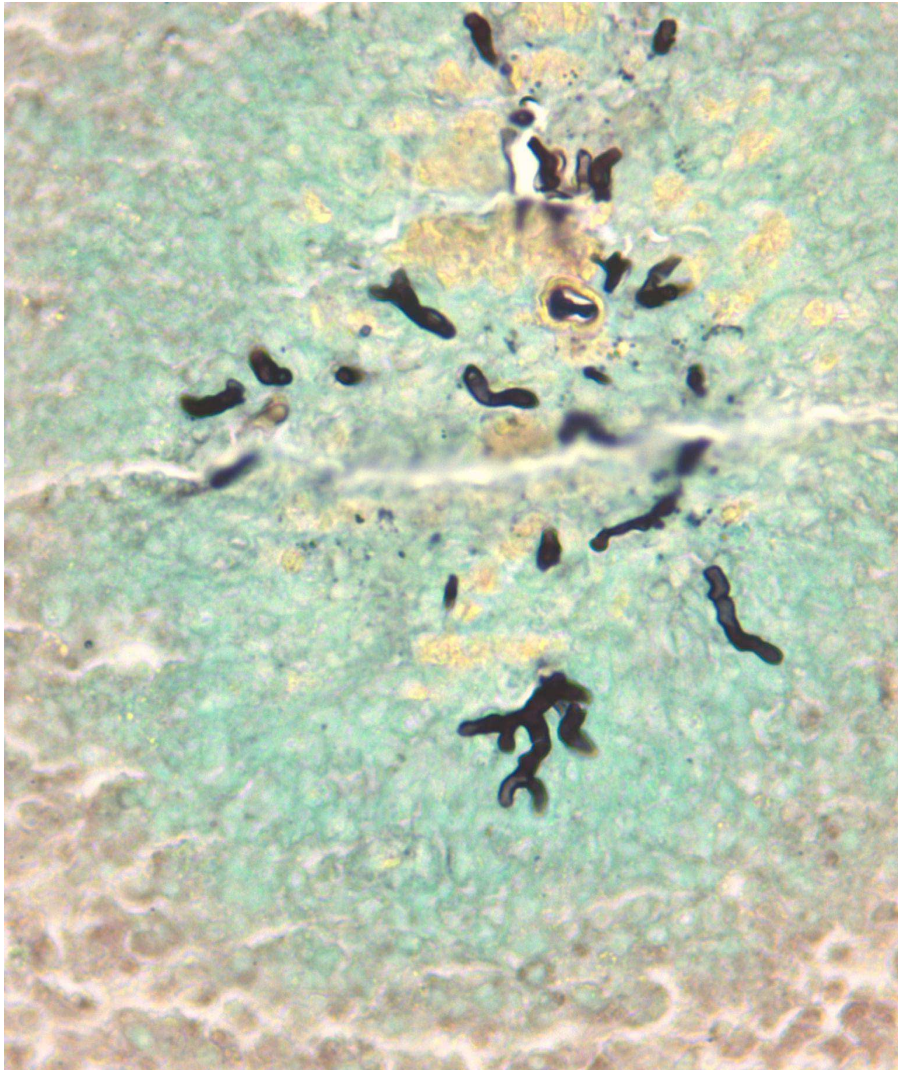
Colorazione di Grocott

Per la ricerca di funghi

Nella maggior parte dei miceti la parete cellulare è costituita da chitina, polimero della N-acetilglucosamina, cui possono essere associati polimeri del D-glucosio, del D-mannoso, proteine e lipidi. L'acido cromico agisce sui gruppi glicolici e glicoaminici presenti nella catena polisaccaridica ossidandoli a gruppi aldeidici con conseguente rottura della catena. L'argento cloruro, facente parte del complesso argento-metenamina è quindi ridotto ad argento metallico da questi nuovi gruppi aldeidici diventando così visibile.

Risultati

Funghi	→	nettamente delineati in nero
Mucine	→	grigio scuro
Fondo	→	verde



Esistono altre colorazioni istochimiche

- Colorazione di Gram → per la ricerca dei batteri gram +
- Metodo di Dahl all' Alizarin red S → per il calcio
- Metodo di von Kossa → per il calcio
- Fontana-Masson → per la melanina:
- Metodo dell'oil red O → per i lipidi
- Sudan IV → per i lipidi
- Sudan nero B → per i lipidi
- Rosso congo → per l'amiloide

Ecc.....



Grazie per l'attenzione