

Lab. di Ortopedia e Chirurgia Plastica -Protocolli sperimentali- Processazione di tessuti molli

Lo scopo finale della procedura è l'ottenimento di campioni istologici permanenti che devono essere osservati e studiati attraverso il microscopio ottico.

L'approccio deve quindi essere assolutamente di tipo conservativo. L'obiettivo deve essere raggiunto processando il tessuto attraverso una serie di numerosi passaggi che mirano a bloccare i normali processi biologici senza alterare l'organizzazione e la struttura del tessuto stesso (*fissazione*), a rimuovere la componente acquosa (*disidratazione*) che renderebbe difficoltosa l'osservazione al microscopio, alla sostituzione dell'alcol con un solvente intermedio che permetta l'infiltrazione del mezzo includente (*chiarificazione*) e alla sostituzione del solvente intermedio con il mezzo di inclusione (*infiltrazione ed inclusione*).

A questo punto il campione così processato viene sottoposto al *taglio* con il microtomo, all'*allestimento delle sezioni* su vetrino e successivamente alla *colorazione*, ora è pronto per essere osservato al microscopio.

Fissazione

La fissazione è un processo che permette di bloccare l'autolisi cellulare, preservando nel tempo la morfologia del tessuto in studio e viene effettuata immediatamente dopo l'espanto.

La fissazione chimica prevede l'utilizzo di sostanze stabilizzanti in grado di formare cross-link tra le proteine.

Sia il reparto di Ortopedia che di Chirurgia Plastica prediligono come fissativo una soluzione acquosa di formalina neutra tamponata al 10%, infatti la formalina è il fissativo più utilizzato in quanto non preclude nessun tipo di analisi istologica o colorazione successive ed esiste in soluzione già pronta all'uso.

Per avere una fissazione omogenea, il campione viene tagliato in piccoli frammenti spessi circa 1 cm, il tempo di permanenza nel fissativo varia dalle 24 alle 48 ore a seconda dello spessore del campione.

Disidratazione

Dopo la fissazione bisogna lavare il campione per togliere ogni traccia di fissativo, la mia esperienza suggerisce di lavare il campione sotto l'acqua corrente tappando l'apertura del vaso con una garza e facendovi scorrere sopra l'acqua per alcuni minuti.

Le cellule sono formate principalmente da acqua, risulta quindi necessaria la sua rimozione per permettere una buona osservazione al microscopio ottico e per poter infiltrare il tessuto con la paraffina.

Per la disidratazione si procede con bagni di soluzioni di acqua dist. ed etanolo a concentrazione crescente fino all'etanolo assoluto al 100% come di seguito:

lavaggio dei campioni con H₂O distillata (3 volte)

lavaggio dei campioni con soluzione di acqua ed etanolo al 50% (3 volte)

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo al 50 % per un'ora

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo al 70 % per un'ora

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo all'80 % per un'ora

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo al 95 % per un'ora

due passaggi in etanolo assoluto al 100 % per un'ora ciascuno

Chiarificazione

L'etanolo contenuto nel preparato non è miscibile con il mezzo di inclusione che dovrà infiltrarlo, cioè la paraffina.

Quindi occorre sostituire l'etanolo con un solvente intermedio che sia miscibile sia con l'etanolo che con la paraffina, questo processo prende il nome di chiarificazione.

La sostituzione si effettua immergendo i campioni in composti chiarificanti, io utilizzo il chiarificante BioClear della Biooptica.

Si procede quindi con due bagni nel BioClear di 20' ciascuno. Al termine di questa sostituzione il campione è completamente libero da acqua e alcool, permettendo la successiva inclusione in paraffina.

Infiltrazione ed inclusione

Il materiale così preparato è pronto per essere infiltrato con un mezzo di inclusione che, dopo la solidificazione, conferirà al tessuto la giusta consistenza per essere ridotto in sezioni sottili al microtomo.

Per la microscopia ottica il mezzo più utilizzato è la paraffina.

La paraffina si trova in commercio in piccoli granuli allo stato solido, affinché la paraffina penetri ed infilti i tessuti è necessario fonderla ossia portarla allo stato liquido.

Per fare ciò si distribuiscono i granuli di paraffina in tanti piccoli contenitori del volume di circa 20 ml. Per migliorare l'inclusione si utilizzano due tipi di paraffina con punti di fusione diversi, la prima infiltrazione avviene in paraffina che fonde a 52°C- 54°C, mentre la seconda, in paraffina che fonde a 56°C- 58°C.

Si preparano quindi tanti contenitori di paraffina a basso punto di fusione e tanti contenitori di paraffina ad alto punto di fusione, quanti sono i campioni da infiltrare.

I contenitori sono posti in un incubatoio tarato a 60°C affinché avvenga la fusione della paraffina, temperature superiori possono danneggiare i tessuti e compromettere le future indagini istologiche.

L'infiltrazione con la paraffina avviene come di seguito:

Immersione dei campioni nei contenitori contenenti paraffina liquida con punto di fusione a 52°- 54°C per una notte.

Passaggio dei campioni nei contenitori contenenti paraffina liquida con punto di fusione a 56°- 58°C per 3 ore.

A questo punto il campione è pronto per l'inclusione, è quindi trasferito in formelle metalliche dove viene fatta colare della paraffina liquida con alto punto di fusione.

La mia esperienza suggerisce di mettere per alcuni minuti le formelle metalliche nell'incubatoio prima di trasferirvi il campione, in modo da minimizzare lo shock termico dovuto al passaggio dai 60°C dell'incubatoio alla temperatura ambiente della formina metallica.

Mentre la paraffina è ancora allo stato liquido è possibile orientare con un ago il campione per esporre al meglio le porzioni di tessuto che dovranno essere successivamente sezionate, ancora mentre la paraffina è liquida, è necessario porre sopra la formella un supporto di plastica o di legno sul quale dovrà aderire il blocchetto di paraffina una volta solidificato ed estratto dalla formella metallica.

Come supporto io uso una "cassetta" dove viene messo il campione nelle inclusioni meccanizzate, in cui i passaggi nei vari reagenti sono effettuati meccanicamente da una apposita attrezzatura.

La cassetta è una piccola gabbietta in plastica con coperchietto fatta a parallelepipedo di 3,5 x 2,8 x 0,5 cm con un lato corto, obliquo alla base e liscio adatto a riportare il nome del paziente.

Tolgo il coperchietto della cassetta per me inutile, e dispongo il resto della gabbietta sopra la formella, lasciando ben evidente il lato obliquo dove scrivo il nome del paziente.

Le formelle metalliche contenenti il campione in paraffina ed i relativi supporti sono quindi lasciati riposare per una notte a temperatura ambiente, per lasciare il tempo alla paraffina di solidificare.

Taglio

Il mattino seguente le formelle con i campioni inclusi in paraffina e relativi supporti vengono posti per alcuni minuti in frigorifero, questa operazione coarta leggermente la paraffina già solidificata e facilita il distacco dei preparati dalle formelle metalliche.

Se tutte le operazioni sono state eseguite correttamente, nel momento in cui tolgo le formelle dal frigorifero, basterà una leggera pressione per staccare la paraffina dalla formella metallica ed ottenere quindi un blocchetto di paraffina che contiene il campione, al quale è adeso un supporto in plastica

che servirà a bloccare il campione da affettare sul portacampioni del microtomo che è lo strumento utilizzato per sezionare il campione.

Prima di applicare il blocchetto al portacampioni del microtomo è necessario togliere la paraffina in eccesso sui bordi con un taglierino, quindi si inserisce il blocchetto nel portacampioni del microtomo e lo si fissa.

Io utilizzo un microtomo a slitta manuale con lame monouso.

Il preparato ideale per un'analisi morfologica consiste in una sezione dello spessore di 3-4 μm che allo stesso tempo mantenga la stessa struttura e organizzazione che aveva nell'organismo.

Si procede quindi ad una prima fase di sgrossatura del blocchetto, tale operazione permette di rimuovere lo strato superficiale di paraffina, evidenziando il materiale incluso.

A questo punto da ogni blocchetto ottengo varie sezioni di 3-4 μm di spessore che vengono distese sulla superficie di un bagno di acqua distillata riscaldata a 38/40°C.

Allestimento dei vetrini

Le sezioni meglio riuscite vengono raccolte sulla superficie di vetrini portaoggetto, in genere si dispongono due sezioni per ogni vetrino. I vetrini con le sezioni vengono poi asciugati per una notte in incubatore a 50°C.

In genere io prima di raccogliere le sezioni lavo i vetrini con un normale detersivo per piatti, li risciacquo in acqua corrente e poi in acqua distillata e quindi li immergo in un bagno di acetone, queste operazioni eliminano eventuali residui di lavorazione dei vetrini che potrebbero compromettere le indagini future.

Come vetrini portaoggetti io scelgo quelli molati con banda sabbiata dove scrivere il nome del paziente a cui si riferisce il campione.

Colorazione

Vengono definiti coloranti le sostanze chimiche che si legano a componenti cellulari/tissutali aumentandone il contrasto, l'effetto di risalto è dato dalle caratteristiche delle strutture che presentano affinità per il colorante usato.

Quasi tutti i coloranti sono idrosolubili è quindi necessario eliminare il mezzo di inclusione ossia la paraffina che interferirebbe con la colorazione.

È necessario pertanto immergere il vetrino nel composto chiarificante BioClear che permette la rimozione della paraffina.

L'eliminazione del BioClear si ottiene poi immergendo i vetrini con le sezioni in etanolo assoluto. Successivamente le sezioni vengono gradualmente idratate immergendo i vetrini in soluzioni di acqua distillata ed etanolo a concentrazioni decrescenti fino all'acqua distillata pura, come di seguito:

due passaggi in Bio Clear di 20' ciascuno

due passaggi in etanolo 100% per 15' ciascuno

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo al 95 % per 10'

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo al 80 % per 10'

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo al 70 % per 10'

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo al 50 % per 10'

un passaggio in acqua dist. per 10'

a questo punto le sezioni vengono trattate con le colorazioni scelte.

Colorazione con ematossilina-eosina

Le cellule sono per la maggior parte incolori, traslucide e trasparenti e ben poco si riesce a distinguere se non le si tratta con delle sostanze coloranti che rendono visibili le strutture biologiche.

La colorazione con ematossilina-eosina è una delle tecniche di colorazione più utilizzata in campo istologico perché è semplice da realizzare e permette una buona visione di tutte le componenti tissutali (figura 1).

Tale colorazione prevede l'utilizzo di soluzioni di ematossilina, colorante basico che colora i nuclei delle cellule in violetto e l'eosina, colorante acido che colora il citoplasma in rosa.

Tra le varie soluzioni di ematossilina in commercio io ho scelto l'ematossilina di Harris in quanto soluzione già pronta per l'uso che fornisce colorazioni altamente affidabili.

Per quanto riguarda la colorazione con l'eosina, dopo varie esperienze, ho scelto di preparare una soluzione alcoolica di eosina a partire dalla polvere in commercio, come segue:

preparato per una soluzione di 100 ml di eosina alcoolica:

pesare 0,5 g di polvere di Eosina G del commercio

sciogliere la polvere in 20 ml di acqua distillata

aggiungere 80 ml di etanolo puro

acidificare aggiungendo alla soluzione ottenuta 0,625ml di acido acetico.

La soluzione di eosina così ottenuta si mantiene stabile per molti mesi e dà una bella colorazione brillante di tutte le componenti basiche del tessuto.

A questo punto i campioni raccolti sui vetrini sono pronti per essere colorati con l'ematossilina-eosina come segue:

passaggio in ematossilina di Harris per 10',

lavaggio in acqua corrente per un'ora, il lavaggio in acqua corrente, che è leggermente alcalina, elimina il colorante in eccesso e provoca l'ossidazione dell'ematossilina in ematina che complessandosi con i sali di alluminio della soluzione colorante colora i nuclei in violetto.

Il lavaggio avviene facendo colare delicatamente l'acqua corrente sopra il vetrino con il campione.

un passaggio in acqua dist. per 10'

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo al 50 % per 10'

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo al 70 % per 10'

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo al 80 % per 10'

passaggio nella soluzione alcoolica di eosina per un'ora

lavaggio veloce dei vetrini in alcool 95%

due passaggi in etanolo assoluto per 10' ciascuno

due passaggi in BioClear per 20' ciascuno per chiarificare il campione

applicazione del montante Eukitt sopra il campione

montaggio del vetrino coprioggetto.

Il montante serve a far aderire il vetrino coprioggetto al vetrino portaoggetto sigillando il campione contenuto tra i due vetrini e migliorando la sua visione al microscopio.

Se tutti i passaggi sono stati effettuati con cura i campioni così allestiti sono destinati a durare per molti anni.

Osservazione al microscopio.

Prima di passare all'osservazione al microscopio è bene lasciar asciugare i preparati per una notte, affinché il montante aderisca perfettamente ai due vetrini.

I tessuti molli che preparo ed allestisco su vetrini sono per la maggior parte di derivazione periprotetica quindi potrebbero contenere fra le loro maglie alcuni residui di materiale protesico che potrebbero aver provocato un'inflammazione del tessuto e la successiva mobilitazione della protesi.

L'osservazione al microscopio deve essere quindi mirata al rilevamento di particolari stati infiammatori del tessuto ed alla ricerca di residui di materiale derivati dall'usura delle protesi come granuli di metallo o scaglie di polietilene (figure 2, 3, 4, 5 e 6).

In particolare le scaglie di polietilene sono ben visibili solo attraverso la visione con luce polarizzata, essendo il polietilene un materiale birifrangente.

Tutti i campioni sono fotografati e le relative immagini vengono accompagnate da una breve descrizione.

Immagini e descrizioni sono spediti per mail o trascritti su CD ed inviati ai medici richiedenti.

Tutte le immagini e le relative descrizioni sono archiviate nel PC del Laboratorio di Ortopedia e Chirurgia Plastica

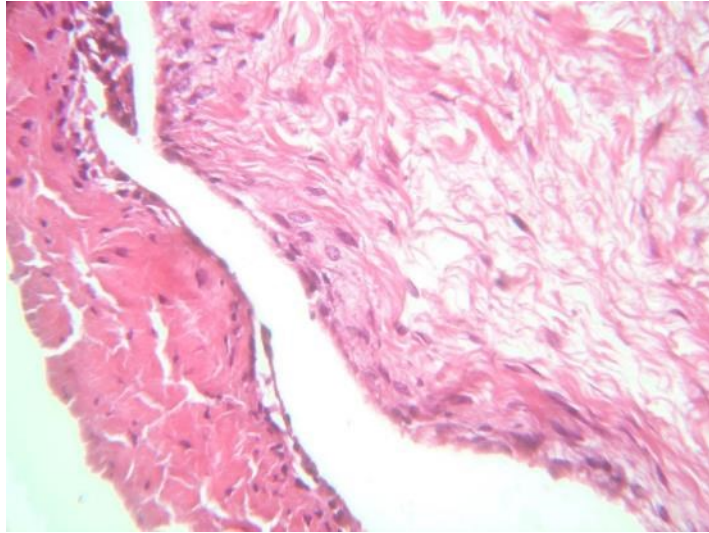


Figura 1 Ematossilina-Eosina, 40X

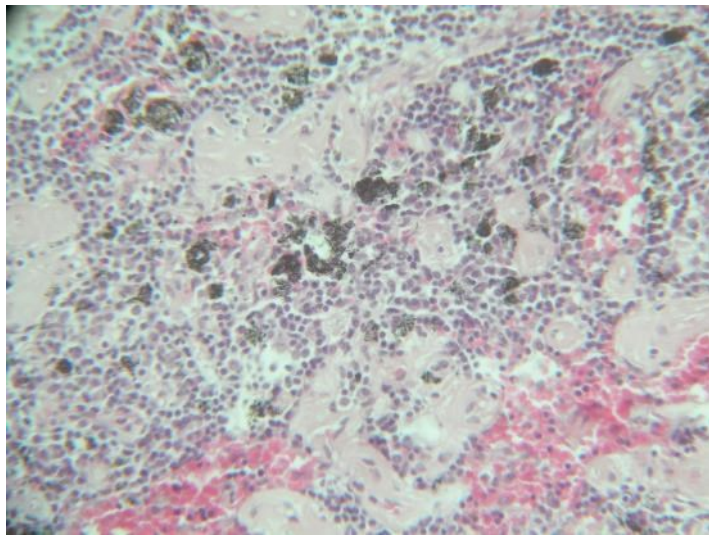


Figura 2 Metallosi, ematossilina-eosina 40X

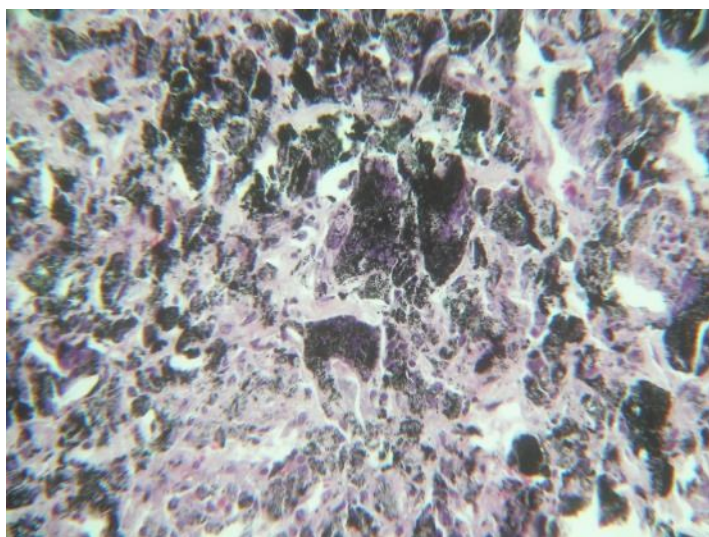


Figura 3 Metallosi, ematossilina-eosina 40X

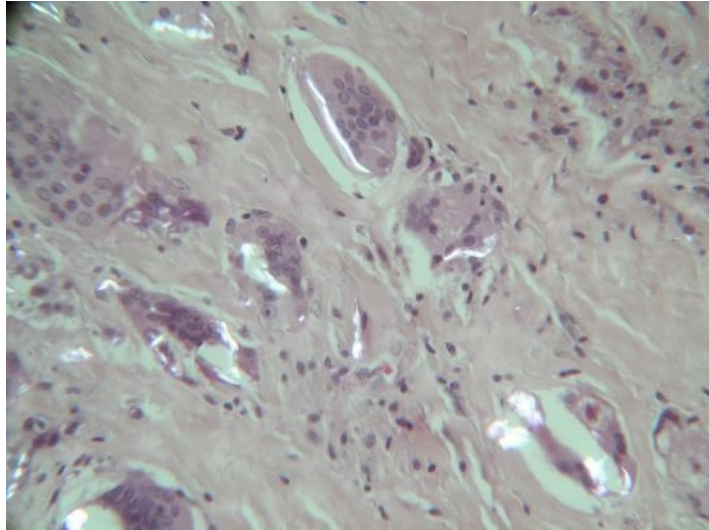


Figura 4 Scaglie di polietilene, ematossilina-eosina, 40X, luce polarizzata

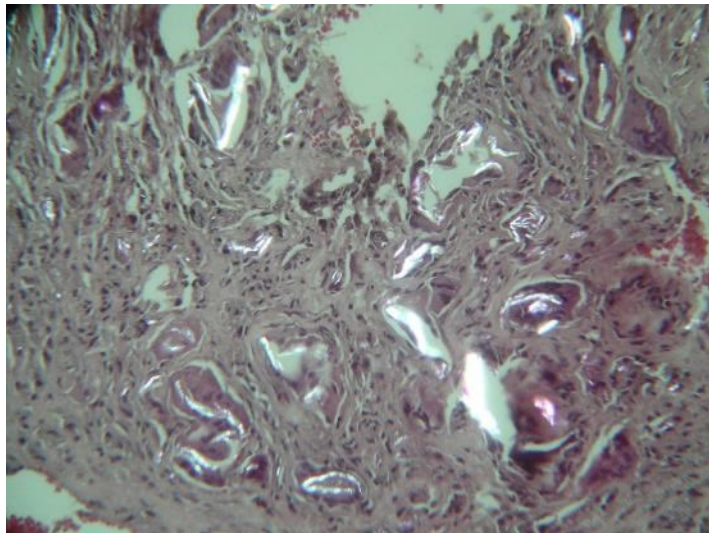


Figura 5 Scaglie di polietilene, ematossilina-eosina, 25X, luce polarizzata

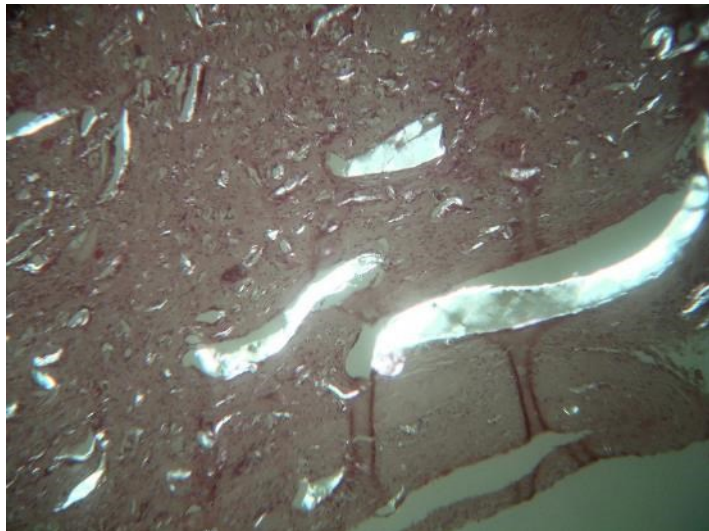


Figura 6 Scaglie di polietilene, ematossilina-eosina, 10X, luce polarizzata

Colorazione di Von Kossa

La colorazione di Von Kossa è usata per rilevare la deposizione di sali di calcio nelle sezioni di tessuti molli. Alla base di questo metodo c'è una reazione di sostituzione: il tessuto è trattato con una soluzione di nitrato d'argento, l'argento cationico si sostituisce al calcio del sale originario formando un sale d'argento che viene evidenziato riducendo l'argento ione ad argento metallico, mediante esposizione a luce ultravioletta.

Anche in questo caso è necessario ripetere tutte le operazioni per eliminare prima il mezzo di inclusione e quindi la componente alcolica fino ad arrivare all'acqua distillata, come per la colorazione con ematossilina-eosina.

Per la colorazione di Von Kossa mi sono sempre affidata al Kit predisposto dalla Bio-Optica per la ricerca di ioni calcio, la colorazione avviene come segue:

portare le sezioni all'acqua distillata

porre sui campioni alcune gocce di una soluzione satura di litio carbonato (flacone A) e lasciare agire per 10'

lavaggio in acqua dist.

porre sui campioni alcune gocce di una soluzione di argento nitrato (flacone B) e lasciare agire per un'ora all'oscurità

lavaggio in acqua dist.

porre sui campioni alcune gocce di una soluzione riducente (flacone C) e lasciare agire per 5'

lavaggio in acqua dist.

porre sui campioni alcune gocce di una soluzione di sodio iposolfito (flacone D) e lasciare agire per 5'

lavaggio in acqua dist.

Controcolorare i nuclei per meglio evidenziare le cellule, al posto del carmallume Mayer del kit (che tende a dare dei depositi), io uso una soluzione di ematossilina di Harris al 30% in acqua distillata.

Breve lavaggio delicato in acqua corrente per ossidare l'ematossilina in ematina.

lavaggio in acqua dist. per 10'

Ora si ripetano i passaggi (già descritti nella precedente colorazione con ematossilina-eosina) nella serie ascendente degli alcoli fino all'etanolo assoluto.

due passaggi in BioClear per 20' ciascuno per chiarificare il campione

applicazione del montante Eukitt sopra il campione

montaggio del vetrino coprioggetto.

Osservazione al microscopio.

Quando il montante ha perfettamente aderito ai due vetrini, osservo i preparati al microscopio.

Nei tessuti dove erano presenti dei sali di calcio si potrà osservare una colorazione nero-bruna, mentre i nuclei delle cellule appariranno violetti (figure 7 e 8).

Tutti i campioni sono fotografati e le relative immagini vengono accompagnate da una breve descrizione.

Immagini e descrizioni sono spediti per mail o trascritti su CD ed inviati ai medici richiedenti.

Tutte le immagini e le relative descrizioni sono archiviate nel PC del Laboratorio di Ortopedia e Chirurgia Plastica.

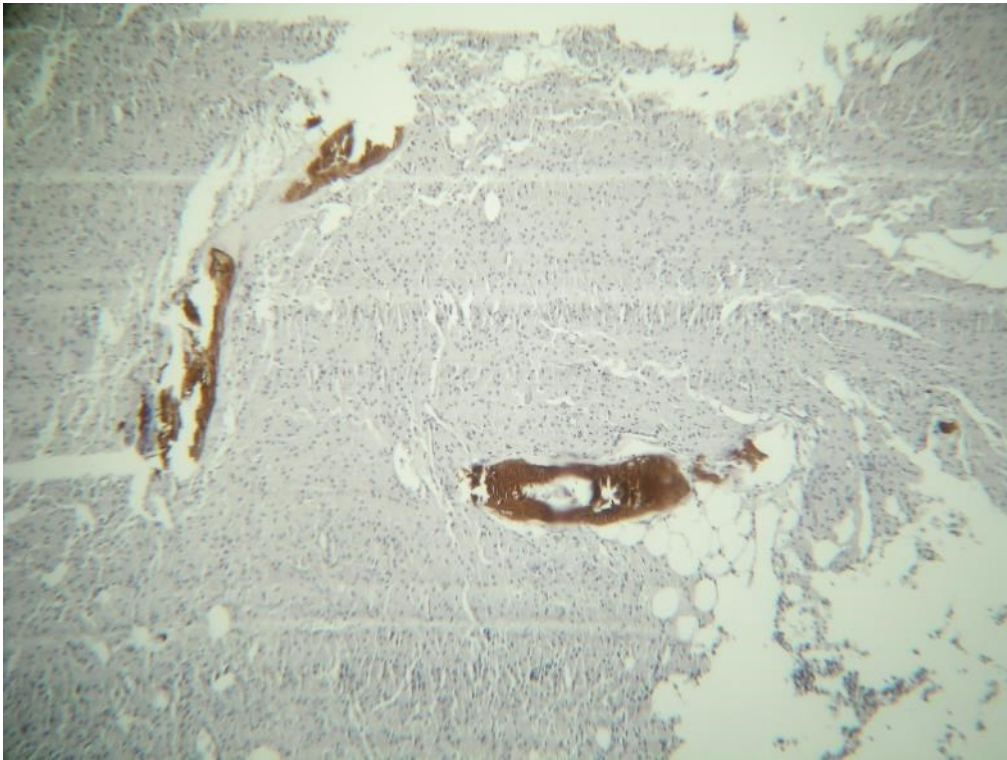


Figura 7 Depositi di sali di calcio, Von Kossa, 10X

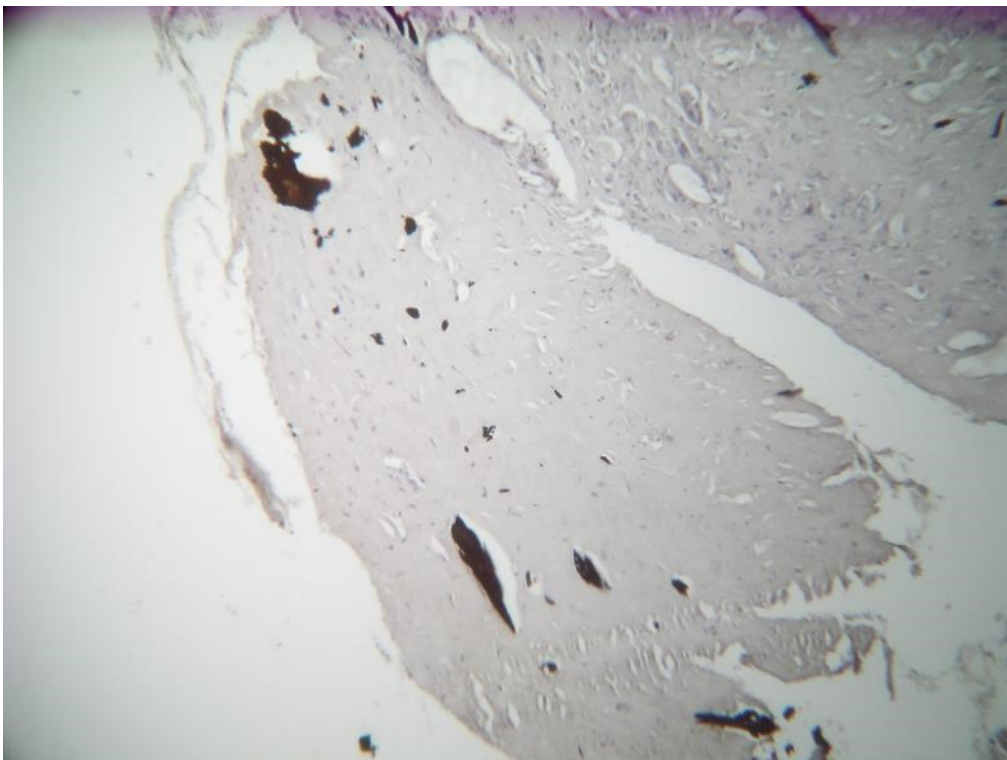


Figura 8 Depositi di sali di calcio, Von Kossa, 10X

Processazione di tessuti duri

Anche nel caso in cui il campione da processare sia un tessuto duro come un lembo di tessuto osseo, una testa di femore o del tessuto osseo neformato su componenti protesiche rimosse, lo scopo finale della procedura è l'ottenimento di campioni istologici permanenti che devono essere osservati e studiati attraverso il microscopio ottico.

Fissazione

I campioni vengono fissati in formalina neutra tamponata al 10%.

La permanenza nella soluzione fissativa deve protrarsi per alcuni giorni, essendo lo spessore e la consistenza di questi campioni maggiore rispetto ai tessuti molli.

Preparazione delle sezioni da includere e primo taglio

I campioni di osso o di componenti protesiche rimosse vengono tolti dal fissativo ed abbondantemente lavati sotto acqua corrente.

Quindi dispongo i campioni su un telo chirurgico e scatto alcune foto per evidenziare l'eventuale usura di componenti protesiche, la presenza di tessuto neformato sulle superfici protesiche o l'aspetto macroscopico di lembi ossei o teste di femore con processi necrotici (figure 14 e 15)

Dopo un esame macroscopico si sceglie l'area del campione di maggior interesse e la si sottopone a due tagli paralleli tra loro e distanti 0,5 cm (tale è la profondità della formella di inclusione) al fine di ottenere una sezione di 5 mm di spessore (figure 16 e 17)

Il taglio del campione è effettuato mediante Unità di taglio Exakt 300 CP dotata di lama a nastro diamantata.

Un circuito ad acqua corrente bagna continuamente la lama ed il campione, ciò per evitare surriscaldamenti e lo sviluppo di polveri nocive per la salute.

Disidratazione della sezione

La sezione ottenuta è sottoposta ad un lento processo di disidratazione perché la consistenza del campione implica tempi più lunghi di permanenza nelle soluzioni alcoliche rispetto ai tessuti molli, il processo di disidratazione avviene come segue:

la sezione è lavata in acqua distillata

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo al 50 % per 24 h

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo al 70 % per 24 h

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo al 80 % per 24 h

un passaggio in soluzione di acqua dist. ed etanolo al 95 % per 24 h

un passaggio in etanolo assoluto per 24 h

Infiltrazione

Si prepara una soluzione composta da 50% di alcol assoluto e 50% di resina fotopolimerizzabile a base di metacrilato (Technovit 7200).

Passaggio della sezione nella soluzione approntata di alcol assoluto e resina (50:50) in contenitori di vetro scuri per 24 h a 4°C.

I contenitori devono essere scuri per evitare che la resina polimerizzi per effetto della luce.

Passaggio in resina pura a base di metacrilato (Technovit 7200) in contenitori di vetro scuri per 24 h a 4°C.

Inclusione

La sezione infiltrata dalla resina (Technovit 7200) è adagiata in una formella di plastica di forma ovale profonda circa 0,5 cm, lunga 8,5 cm e larga circa 5 cm.

Le misure della formella sono tali da poter contenere una intera sezione centrale di cotile o una sezione centrale di testa di femore.

Sulla sezione viene versata resina pura (Technovit 7200) fino a riempire tutta la formella ed a coprire interamente la sezione.

Questa operazione va effettuata con molta attenzione per evitare che bolle d'aria o impurità finiscano nel preparato e vi rimangano imbrigliate.

Polimerizzazione

La polimerizzazione avviene nel Polimerizzatore Exakt che è dotato di due tipi di luce: una luce gialla a bassa intensità ed una luce blu ad alta intensità.

La polimerizzazione avviene come segue:

esposizione del campione alla luce a bassa intensità per evitare l'innalzamento della temperatura e la formazione di crepe per 2 h.

esposizione del campione alla luce ad alta intensità che permette di completare la polimerizzazione per 8 h.

Applicazione del vetrino di supporto

Dopo essermi accertata che la resina contenente la sezione si sia ben solidificata in tutte le sue parti, stacco delicatamente l'inclusione dalla formella.

A questo punto preparo la miscela adesiva che mi permette di fissare l'inclusione al vetrino che fungerà da supporto.

La miscela adesiva (Technovit 4000) è composta da tre reagenti: due parti di sciroppo a base di metacrilato e stirene, una parte di sciroppo a base di metacrilato e due parti di polvere a base di perossido di dibenzoile.

Mesco la miscela finché assume un aspetto omogeneo e la spalmo su una delle facce dell'inclusione, quindi applico alla faccia spalmata un vetrino ed aspetto che l'adesivo faccia presa.

I vetrini usati per questo tipo di procedura sono dei vetrini in plexiglas di 10 cm x 5 cm e spessi 1 mm.

Il fissaggio del vetrino all'inclusione può essere facilitata dall'uso di una piccola pressa che tiene ben adesi e fermi i due oggetti.

Prima abrasione ed applicazione del secondo vetrino

Quando la miscela adesiva si è solidificata devo abradere e rendere perfettamente liscia la superficie dell'inclusione non adesa al vetrino.

Per fare ciò utilizzo l'unità di abrasione Exakt grinding system, questa apparecchiatura è fornita di un disco che gira ad alta velocità sul quale vengono disposti fogli di carta abrasiva a grana via via più piccola, il vetrino con il campione è fissato, sul lato libero, con una pompa a vuoto ad un supporto, in modo che il lato del vetrino su cui è incollata la sezione si trovi sopra il disco rotante.

Vengono quindi messi dei pesi sul supporto del campione in modo che questo si adagi sulla superficie del disco su cui vengono disposti i fogli di carta abrasiva e venga via via abraso.

Un circuito ad acqua corrente bagna continuamente il disco con la carta abrasiva ed il campione, ciò per evitare surriscaldamenti e lo sviluppo di polveri contenenti metacrilato che risultano nocive per la salute.

La tipologia delle grane di carta abrasiva impiegata ed il tempo di abrasione dipendono dalle caratteristiche del campione, se la sezione da abradere contiene solo tessuto osseo si consiglia di usare grane non molto grossolane (da P 800 a P 2500) per alcune ore.

Se la sezione contiene materiali metallici protesici allora bisogna usare all'inizio grane molto grossolane (da P 100 a P 500) ed arrivare gradualmente alle grane più fini (da P 800 a P 2500), il tutto può occupare anche alcuni giorni.

Quando la superficie dell'inclusione non adesa al vetrino si presenta perfettamente liscia (vetrificazione) applico su questa un secondo vetrino. L'adesione di questo vetrino avviene tramite

una colla di precisione a base di metacrilato, fotosensibile e perfettamente trasparente (Technovit 7210) per non ostacolare le future colorazioni della sezione.

L'indurimento di questa colla avviene tramite una pressa di precisione dotata di luce blu ad alta intensità.

Al termine di questa operazione otterrò una specie di sandwich formato dai due vetrini esternamente con in mezzo l'inclusione.

Secondo taglio

Si sottopone l'inclusione ad un secondo taglio con l'Unità di taglio Exakt 300 CP, in questo caso il taglio avviene a circa 300-400 µm dal secondo vetrino.

Ciò che ottengo alla fine è un vetrino su cui è adesa una sottile sezione di campione incluso in resina, la colla, essendo trasparente, non comprometterà le future colorazioni di questa parte di sezione.

La rimanente porzione di inclusione adesa al vetrino di supporto rimarrà agli archivi nel caso si vogliano preparare altri campioni per l'analisi al microscopio.

Seconda abrasione

La sezione sottile di campione incluso in resina è sottoposta sulla sua superficie libera ad una seconda abrasione con Exakt grinding system per ottenere una sezione spessa circa 100 µm che abbia una superficie perfettamente liscia (vetrificazione).

Le carte abrasive usate per questa operazione prevedono grane sottili da P 1200 a P 2500.

Ora la sezione è pronta per essere colorata.

Colorazione

Fra i metodi di colorazione più utilizzati per questo tipo di preparati c'è la colorazione con ematossilina-eosina che mette bene in evidenza le caratteristiche del connettivo e del tessuto osseo neoformato.

La colorazione avviene come segue:

Passaggio in ematossilina di Harris per 30'

Risciacquare in acqua distillata con 1% di acido acetico per 1'

Lavaggio in acqua corrente per 30'

Passaggio in soluzione di eosina in acqua al 3% per 10', non si usa l'eosina in soluzione alcolica perché l'alcol tende a sciogliere la resina di inclusione.

Breve lavaggio in acqua corrente per togliere l'eosina in eccesso.

Asciugare all'aria (figura 18).

Osservazione al microscopio.

Per migliorare la visione si può appoggiare sul preparato un vetrino coprioggetto che stabilizza l'immagine e la rende più facilmente fotografabile.

L'osso neoformato ed i reticoli di fibre collagene risultano di un brillante colore rosso, mentre i nuclei delle cellule e la cartilagine appaiono violetti (figure 19 e 20).

Tutti i campioni sono fotografati e le relative immagini vengono accompagnate da una breve descrizione.

Immagini e descrizioni sono spediti per mail o trascritti su CD ed inviati ai medici richiedenti.

Tutte le immagini e le relative descrizioni sono archiviate nel PC del Laboratorio di Ortopedia e Chirurgia Plastica.

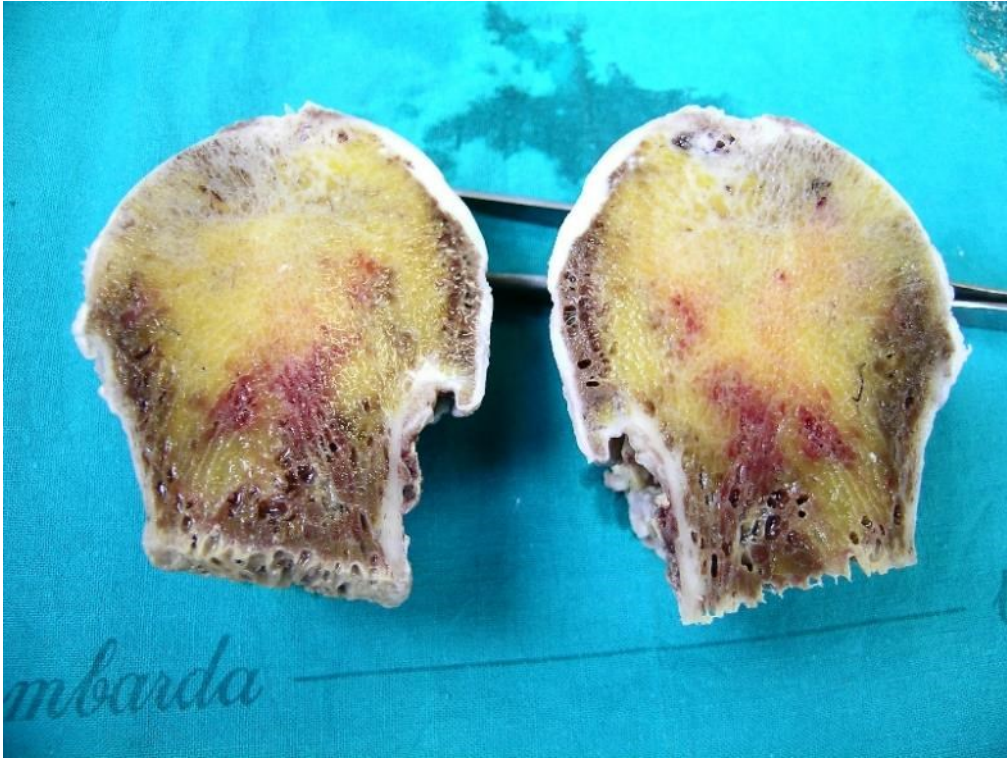


Figura 14 Testa di femore con aree di necrosi



Figura 15 Cotile rimosso



Figura 16 Cotile sezionato



Figura 17 Sezione di cotile



Figura 18 Sezione di cotile in resina

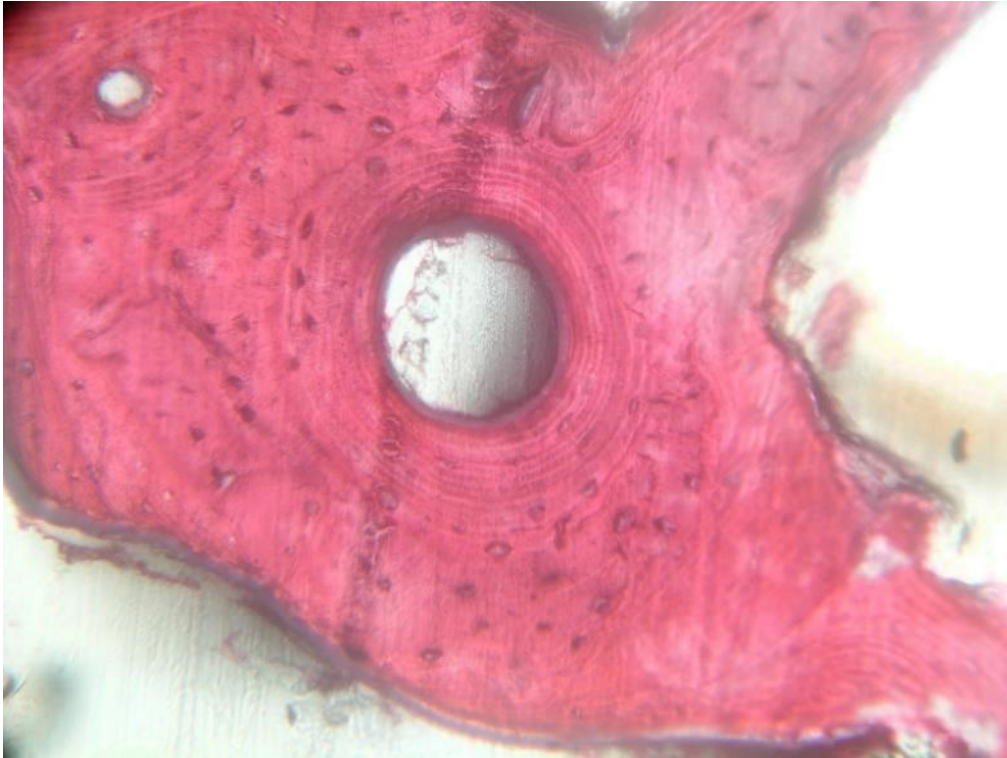


Figura 19 Preparato in resina, ematossilina-eosina, 10X

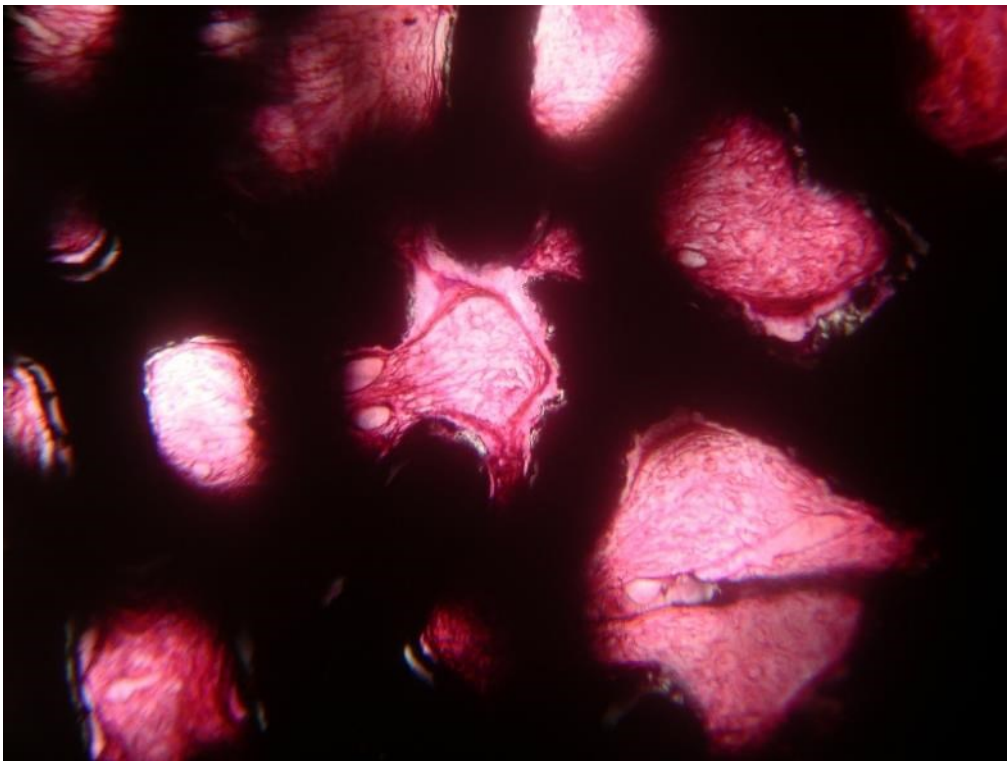


Figura 20 Preparato in resina, reticoli di fibre collagene nella superficie porosa del cotile, ematossilina-eosina, 10X

Fissativi particolari per la microscopia elettronica

Pur non svolgendo preparazioni ed analisi di campioni destinati alla microscopia elettronica, sono addetta alla preparazione di fissativi e tamponi per la conservazione di campioni destinati a questo tipo di analisi.

In particolare sono addetta alla preparazione del fissativo Karnowsky, come segue:

Preparato per 100 ml di fissativo Karnowsky:

Frantumare due pastiglie da un grammo ciascuna di paraformaldeide da sciogliere in 25 ml di acqua distillata.

Agitare, aggiungere alla soluzione ottenuta alcune gocce di NaOH 1 M per chiarificare ed agitare fino a chiarificazione.

Aggiungere 20 ml di soluzione di cacodilato 0,4 M in acqua distillata (il cacodilato contiene arsenico quindi maneggiare con precauzioni).

Aggiungere 10 ml di soluzione di glutaraldeide al 25% in acqua distillata, io uso una soluzione già pronta della Fluka BioChemika in flaconi, in quanto la glutaraldeide è altamente tossica per inalazione e contatto.

Aggiungere 6 ml di CaCl₂ al 5% in acqua distillata.

Portare la soluzione fissativa finale a 100 ml con acqua distillata.

La soluzione fissativa deve avere un pH di 7,35

Eventualmente aggiungere qualche goccia di HCl 1 M per portare al pH desiderato.

Dopo che il campione è stato fissato in Karnowsky per alcune ore, si trasferisce nella soluzione tampone cacodilato-saccarosio preparata come segue:

Preparato per 100 ml di soluzione tampone cacodilato- saccarosio:

Misurare 25 ml di soluzione di cacodilato 0,4 M in acqua distillata

Aggiungere 6 ml di CaCl₂ al 5% in acqua distillata

Aggiungere 2,5 g di saccarosio

Portare la soluzione tampone finale a 100 ml con acqua distillata.

Questa soluzione tampone si conserva per lungo tempo non venendo contaminata da microrganismi in quanto contiene arsenico.

A questo punto il campione è pronto per subire gli ulteriori processi che lo renderanno adatto all'osservazione con la microscopia elettronica.

Le due soluzioni vengono conservate dal personale infermieristico in frigoriferi adiacenti alle sale operatorie in modo che i campioni di tessuto prelevati dal paziente siano prontamente trasferiti nel fissativo.

Pur essendo le due soluzioni altamente conservabili in quanto contenenti arsenico, io provvedo alla loro sostituzione ogni quattro mesi in caso di non utilizzo, per garantire la freschezza del prodotto ed evitare episodi di deposito o flocculazione di alcuni reagenti

Strumentazione presente presso il Laboratorio di Ortopedia e Chirurgia plastica del DBSV dell'Università degli Studi dell'Insubria

- 1) Bilancia digitale di precisione "Kern pcb" per pesare sali ed altri reagenti per la preparazione di tamponi, fissativi, soluzioni e resine.
- 2) Incubatore termoregolatore digitale "Falc" per la fusione della paraffina e l'asciugatura di vetrini.
- 3) Micropipetta Kartell da 0,5 a 10 µl per il dosaggio di anticorpi.
- 4) Micropipetta Kartell da 100 a 1000 µl per il dosaggio di anticorpi.
- 5) Misuratore di Ph da banco "Hanna instruments" per misurare il pH di tamponi, fissativi e soluzioni per la conservazione ed l'incubazione di tessuti.

- 6) Cappa chimica aspirante da banco “Bio-Optica” utilizzata durante l'idratazione, la disidratazione e la colorazione dei campioni di tessuti molli, tessuti duri e sezioni di componenti protesiche allestiti su vetrini.
- 7) N. 12 vaschette, poste sotto cappa, contenenti la serie ascendente degli alcoli per l'idratazione, la disidratazione e la colorazione dei campioni di tessuti molli, tessuti duri e sezioni di componenti protesiche allestiti su vetrini.
- 8) Microtomo universale a slitta Leitz (ora Leica) per il taglio di campioni di tessuti molli inclusi in paraffina.
- 9) Piastra riscaldante “Heidolph” per il riscaldamento dell'H₂O sulla quale vengono stese le fettine di paraffina contenenti i campioni di tessuti molli prima di essere montate sui vetrini, la piastra è anche dotata di agitatore per la miscelazione di tamponi, fissativi e soluzioni.
- 10) Unità di taglio Exakt con sega a nastro diamantata per il taglio di campioni di tessuti duri e di componenti protesiche, l'unità di taglio è stata corredata da una slitta a movimento parallelo sulla quale viene fissato il campione per velocizzare l'operazione di taglio.
- 11) Unità di polimerizzazione Exakt per la polimerizzazione (indurimento) di resine includenti campioni di tessuti duri e sezioni di componenti protesiche.
- 12) Unità di abrasione Exakt per la riduzione dello spessore dei campioni di tessuti duri o componenti protesiche inclusi in resina fino a 100 µm di spessore per l'osservazione successiva al microscopio ottico.
- 13) Sistema di pompe a vuoto per il fissaggio dei vetrini agli apparecchi di taglio e di abrasione.
- 14) Microscopio ottico Aristoplan Leitz (ora Leica) completo di luce polarizzata e fluorescenza.
- 15) Fotocamera digitale Nikon Coolpix 5400 completa di adattatore ottico passo C ed adattatore per collegamento a microscopio Leitz Aristoplan.
- 16) PC Asus VC 60

Tutta la strumentazione a me assegnata del Laboratorio di Ortopedia e Chirurgia Plastica dell'Università degli Studi dell'Insubria è perfettamente funzionante ed efficiente ed ho sempre provveduto alla corretta gestione.

Varese, 12/07/2017

Dott.ssa Monica Campagnolo