

TEHNICI ORIENTATIVE DE LUCRU PENTRU PRELUCRARE SI COLORARE A PREPARATELOR CITOPATOLOGICE SI HISTOPATOLOGICE

PRINCIPII GENERALE DE TEHNICA HISTOPATOLOGICA

Principiul tehnicii histopatologice impune transformarea unui prelevat dintr-un organ sau țesut dintr-o masă tisulară opacă într-un preparat fin, translucid care permite vizualizarea microscopica a detaliilor structurale tisulare. Pentru a realiza aceasta prelevatul suferă transformări succesive:

1. Fixarea previne alterarea și autoliza țesutului
2. prelucrarea histopatologică (deshidratare, clarificare și impregnare cu parafină)
3. Includerea în bloc de parafină
4. Secționarea la microtom a prelevatului inclus în parafină
5. Etalarea secțiunilor pe lame (obținerea preparatului histopatologic necolorat)
6. Colorarea lamelor
7. Montarea lamelor - permite protecția și conservarea preparatului histopatologic colorat

Produs final - preparatul histopatologic permanent care permite interpretarea corectă în vederea stabilirii diagnosticului anatomo-patologic.

Protocoloalele de lucru histopatologic sunt orientative; pot fi folosiți reactivi diferiți, timpul de acțiune și concentrațiile menționate în rețete sunt orientative și se adaptează în funcție de condițiile locale (temperatură ambientală, duritatea și pH-ul apei de robinet etc). Tehnica folosită este considerată corectă dacă se obțin rezultatele preconizate prin colorația respectivă. La rețetele de colorații recomandate sunt admise variații, în funcție de structura care se dorește evidențiată; de asemenea, pot fi folosite alte colorații speciale pentru evidențierea aceleiași structuri (de exemplu colorație pentru collagen Roșu Sirius, colorație mixtă uzuală și pentru collagen - Hematoxină cozină safran, mucicarmin pentru mucopolizaharide acide, auramină pentru bacili acid alcoolorezistenți și altele asemenea) sau colorații speciale pentru substanțe care nu pot fi identificate prin procedeele recomandate (de exemplu colorație von Kossa pentru calciu, colorație Scharlach, Sudan III, negru Sudan sau roșu ulei O pentru lipide, colorație cu rodanină pentru depozite de cupru și altele asemenea).

Pentru tehnicile de imunohistochimie timpul de expunere la anticorpi primari și secundari poate fi modificat în funcție de diluția anticorpului; de asemenea metodele de pretratament pot fi modificate față de recomandarea producătorului (de exemplu fierbere în tampon citrat în loc de tratament enzimatic pentru pancitokeratina AE1-AE3) cu condiția obținerii de rezultate concordante cu structurile evidențiate pe lame martor.

PROTOCOL DE LUCRU

prelucrarea pieselor anatomo-patologice (piese chirurgicale, biopsii, fragmente tisulare recoltate la necropsii)

1. Verificarea documentelor de însoțire a materialului bioptic; se va verifica dacă pe fișa de însoțire sunt trecute corect numele și prenumele pacientului, vârsta, numărul foi de observație, secția care solicită examenul histopatologic, diagnosticul clinic prezumptiv, denumirea materialului bioptic trimis, data recoltării, fixatorul utilizat, semnatura și parafa medicului care solicită diagnosticul histopatologic, numele și semnatura celui care a adus materialul bioptic/citologic
2. Verificarea materialului bioptic. Se va verifica dacă materialul bioptic/citologic este în recipient. Se va verifica dacă materialul bioptic este adus fixat (în formol sau altă substanță fixatoare) sau este proaspăt. Se va verifica dacă din punct de vedere calitativ materialul bioptic/citologic nu este corespunzător (dimensiuni foarte mici și/sau cu arii întinse de necroză). Se va verifica concordanța ei documentelor de însoțire a materialului bioptic – recipient material bioptic
3. Înregistrare - acordarea de număr/caz; unui caz se poate acorda unul sau mai multe numere; dacă unui caz i se acordă un singur număr și în cursul orientării macroscopice se recoltează mai multe fragmente, acestea vor fi etichetate individual cu numere sau litere suplimentare (de exemplu număr caz 1000 din care se prelevează 3 fragmente cu numărul 1000/1, 1000/2 și 1000/3 sau 1000/A, 1000/B și 1000/C); înregistrarea cazului se poate face înainte sau în cursul orientării macroscopice
4. Orientare macroscopică / fasonare - descrierea pieselor, secționarea lor și recoltarea de fragmente pentru prelucrare histopatologică în concordanță cu particularitățile fiecărui caz; orientarea macroscopică se poate face fie pe piese proaspete (nefixate), fie după o fixare prealabilă de 24-72 ore
5. Fixare în formol 10% tamponat, minimum 24h; timpul de fixare poate fi redus în funcție de timpul de fixare prealabilă (anterioară orientării macroscopice) a fragmentelor tisulare
6. Decalcifiere – dacă se recoltează fragmente osoase sau calcificate
7. Prelucrare histopatologică pe baterie manuală sau procesare automată (histochinetă, histoprosesor, autotehnicon); etapele prelucrării histopatologice diferă în funcție de tipul de țesut prelucrat, reactivii preferați și de aparatura existentă, cel mai frecvent se folosesc agenți de deshidratare (alcool etilic, eventual acetona, alte substanțe asemenea), agenți de clarificare (alcool izopropilic, alcool amilic, benzen, toluen, xilen sau alte substanțe asemenea), impregnare cu parafină; perioada de procesare variază între 17 ore (procesare automată) și 5 zile lucrătoare (procesare manuală)
8. Incluziune în parafină; dacă se formează blocuri de parafină, acestea vor fi fasonate și etichetate; dacă se include pe casete, casetele vor fi fasonate și se va verifica etichetarea acestora
9. Secționarea blocurilor de parafină la microtom.
10. Etalarea secțiunilor pe lame

11. Deparafinarea și rehidratarea lamelor; se va efectua prin treceri prin băi succesive de agent de deparafinare (benzen, toluen, xilen sau alte substanțe asemenea), alcool etilic și apă de robinet; numărul băilor și timpul de expunere variază în funcție de desfășurarea manuală sau automată a procesului (minimum 25 de minute – automat, 1 oră – manual)
16. Colorare după rețeta colorației respective
17. Deshidratare (eventual uscare), clarificare (benzen, toluen, xilen sau alte substanțe asemenea),
18. Montare (cu mediu de montare)
19. Etichetare.

PROTOCOL DE LUCRU / CITOLOGII

- Material primit: broșaj, puncție mamara, puncție tiroidiana, lichid ascitic, lichid pleural, lichid sinovial, urina, frotiuri cervicovaginale.

Frotiu gata intins :1. Uscare

2. Fixare-alcool etilic 96 sau alcool metilic

3. Uscare

4. Colorare Giemsa, H-E, Papanicolaou

Recipient cu produs patologic:1. Centrifugare

2. Intindere frotiuri

3. Uscare

4. Fixare-alcool etilic 96 sau alcool metilic

5. Uscare

6. Colorare Giemsa, HE

COLORAȚII: se pot folosi reactivi preparați din pulberi sau kit-uri gata preparate. Timpii și concentrațiile menționate în rețete sunt orientative și se adaptează în funcție de condițiile locale (temperatură ambientală, duritatea și pH-ul apei de robinet etc). Colorația este considerată corectă dacă se obțin rezultatele preconizate

1. COLORAȚII UZUALE

1.1. Colorația hematoxilina-eozina

I. **Deparafinare**

II. **Hematoxilină Mayer – 2-5 minute**

III. **Spălare**

IV. **Diferențiere rapidă în alcool-acid clorhidric**

V. **Spălare**

VI. **Eozină 10-15 secunde**

VII. **Deshidratare trei bai de alcool etilic (70°, 96°, absolut)**

VIII. **Clarificare 3-5 bai toluen**

IX. **Montare.**

Reactivi:

Hematoxilina Mayer: hematoxilina 1.5 g+alaun de potasiu 75g+iodat de sodiu 0.3g+apa distilata 1 litru.

Eozina: eozina galbena 6g+eozina albastra 6g+orange G 0.4g+alcool etilic 70° 700 ml+solutia carbonat de litiu 80 ml+acid acetic glacial 3 ml.

Alcool-acid clorhidric: 99 ml alcool etilic 70°+1 ml acid clorhidric 1N

Rezultate: nucleii-albastru, citoplasma-rosu.

2. COLORATII SPECIALE

2.1 Coloratia Van Gieson

- I. **Deparafinare**
- II. **Hidratare**
- III. **Spalare**
- IV. **Colorare** cu hematoxină Weigert (2 părți hematoxină + 1 parte mordant) - 5 minute
- V. **Spalare**
- VI. **Diferentiere rapida** in alcool-acid clorhidric.
- VII. **Spalare**
- VIII. **Contrastare** în solutie saturata de Li_2CO_3
- IX. **Spalare**
- X. **Colorare** cu picrofucsina - 2-5 minute
- XI. **Spalare**
- XII. **Deshidratare**
- XIII. **Clarificare**
- XIV. **Montare**

Reactivi:

Hematoxină Weigert: 99ml alcool 96°C+ 1g hematoxină la termostat timp de 24 ore

Mordant: 4 ml solutie hexaclorohidrat de fier trivalent 29%+1 ml acid clorhidric 1N+95 ml apa distilata

Picrofucsina: 100 ml acid picric solutie suprasaturata+10 ml fucsina acidă 1%

rezultat : nucleii-negri, citoplasma-galbén, collagen-rosu

2.2. Coloratia Periodic Acid Schiff (PAS)

- I. **Deparafinare**
- II. **Hidratare**
- III. **Apă distilată**
- IV. **Oxidare** cu acid periodic 0,5-1% - 5 -10minute
- V. **Apă distilată**
- VI. **Reactiv Schiff** - 5-15 minute
- VII. **Apă robinet** – 10 minute
- XI. **Hematoxină Mayer** – 2-5 minute
- XII. **Apă robinet**
- XIII. **Contrastare** în solutie saturata de Li_2CO_3
- XIV. **Apă robinet**
- XV. **Deshidratare**
- XVI. **Clarificare**

XVII. Montare

Reactivi:

Reactiv Schiff- se aduc 100ml apă distilată la fierbere. Se dizolvă 0,5g fuxină bazică mojarată (diamant fuxină). Se răcește la 50°C și se adaugă 10ml acid clorhidric 1N. Se răcește la 25°C și se adaugă 0,5g metabisulfid de sodiu sau potasiu. Se etanșează vasul, se învelește în hârtie neagră și se păstrează 24h la întuneric (la temperatura camerei sau la frigider la 4°C). A doua zi se adaugă 0,5-1 g cărbune activ, se agită și se lasă 2 minute în repaus. Se filtrează. Se păstrează în sticle brune la frigider. Culoarea reactivului trebuie să fie de la galben pâi la incolor.

* Vasele trebuie să fie clătite cu apă distilată și perfect uscate; nu se lucrează în atmosferă de formol.

Rezultate: nucleii-albastru, polizaharide sau complex de polizaharide – magenta, membrane bazale - roșu

2.3 Coloratia Giemsa

- I. **Deparafinare**
- II. **Hidratare**
- III. **Apă distilată**
- IV. **Giemsa** (1 parte Giemsa - KIT/ 4 părți apă) -20-30 minute
- V. **Spălare** în apă distilată în care se pun 7-8 picături de acid acetic glacial la 100 ml apă distilată
- VI. **Diferențiere** cu alcool 96% (până preparatul devine roz)
- VII. **Deshidratare și clarificare** în alcool izopropilic
- IX. **Clarificare** în toluen
- X. **Montare**

Rezultate: nucleii - violet, citoplasma bazofilă - albastru, citoplasma acidofila - roșu, mastocite – violet, Helicobacter pilori – albastru închis

2.4 Coloratia Perls

- I. **Deparafinare**
- II. **Hidratare**
- III. **Apă distilată**
- IV. **Imersie în soluție:** - sol. ferrocianură de potasiu 2%
- sol. acid clorhidric 2%
(raport sol. = 1/1 incubare timp de 30 minute, 56-60 grade C)
- V. **Apă distilată** 10 minute
- VI. **Supracolorare** cu Kernechtrot - 3 minute sau
fuxină acidă 1% - 1 minut sau
roșu neutru 1% - 5 minute
- VII. **Spălare**
- VIII. **Deshidratare**
- IX. **Clarificare**
- X. **Montare**

Reactivi

Se prepară extemporaneu 1,5g ferocianură de potasiu în 75 ml apă distilată și 48ml acid clorhidric 1N cu 27ml apă distilată.

Rezultate: depozite de fier – albastru, nuclei - roșu

2.5. Coloratia Ziehl-Nielsen

I. Deparafinare /Imersia frotiului în apă distilată

- I. **Carbolfucsină** - 10-20 minute (incalzire la intervale de timp egale pana la emisia de vapori)
- II. **Spălare**
- III. **Tratare** cu decolorant acid-alcool 3 minute
- IV. **Spălare**
- V. **Contracolorare** cu solutie albastru de metilen 1% sau verde lumină 30-60 secunde
- VI. **Spalare**
- VII. **Deshidratare**
- VIII. **Clarificare**
- IX. **Montare.**

Rezultate: bacilii alcool-rezistenti-roșii, fond – albastru sau verde

2.6 Coloratia Masson

- I. **Deparafinare**
- II. **Apă distilată**
- III. **Hematoxilină Weigert** – 7-10 minute
- IV. **Spălare** - în apă , Li_2CO_3 – 5 secunde
- V. **Ponceau fucsină** – 4 minute
(2 părți Ponceau 1%, 1 parte fuxină acidă 1%, 1 parte acid acetic glacial)
- VI. **Spălare** (în apă distilată).
- VI. **Acoperire cu acid fosfomolibdenic 1%-** 10 minute
- VII. **Anilină orange sau verde lumină** - 5 minute (lama nu se spală înainte)
- VIII. **Spălare** (în apă distilată)
- IX. **Deshidratare** - rapidă (în alcool absolut 1%)
- X. **Clarificare**
- XI. **Montare**

Reactivi:

Ponceau 1%: Roșu Ponceau 1 g în 99 ml apă distilată

Fucsină acidă 1%: 1 g fucsină acidă în 99 ml apă distilată

Acid fosfomolibdenic 1%: 1 g acid fosfomolibdenic în 99 ml apă distilată

Anilin orange: 0,5g anilină blue, 2g orange G, 2,5 ml acid acetic glacial, 95 ml apă distilată

verde lumina: 0,1g.verde lumina in 100ml.acid acetic 1%.

Rezultate . nucleii – albaştri (negri), collagen, mucus – albastru /verde, citoplasma – roșu-cărămiziu, eritrocite – roșu-portocaliu

2.7. Coloratia Gömori

I. Deparafinare

- II. Hidratare
- III. Apă
- IV. Oxidare – cu permanganat de potasiu 1% (se filtrează)
- V. Spălare
- VI. Decolorare rapida – cu metabisulfit de natriu sau potasiu 2%
- VII. Spălare
- VIII. Mordansare – cu alaun feriamoniacal 2%- 2 minute
- IX. Spălare
- X. Impregnare – cu soluție argento- amoniacală (Tollens)
- XI. Apă distilată - 2 băi rapide
- XII. Reducere - formol neutru 10%
- XIII. Apă
- XIV. Reducere - cu metabisulfit de natriu/potasiu 2%- 1 minut - facultativ
- XV. Apă
- XVI. Fixare - tiosulfat de natriu 1%- 1 minut
- XVII. Spălare
- XVIII. Deshidratare
- XIX. Clarificare
- XX. Montare

Reactivi:

Soluția extemporaneu argento-amoniacală (Tollens): se cântăresc 500mg AgNO_3 + 5ml apă distilată+ 1 ml hidroxid de natriu 10%+ sol. amoniac (picătură cu picătură) până la dizolvarea completă a precipitatului. Se dublează volumul soluției cu apă distilată.

Rezultate: fibrele de reticulina – negru-brun

2.8. Coloratia Rosu de Congo

- I. Deparafinare
- II. Hidratare
- III. Spălare
- IV. Colorare cu soluție Roșu de Congo 0,5% - 10-30 minute
- V. Spălare în apă distilată
- VI. Diferențiere în soluție KOH/ NaOH 0,2%
- VII. Spălare apă distilată
- VIII. Hematoxină – 2-5 minute
- IX. Spălare
- X. Contrastare în soluție suprasaturată de Li_2CO_3
- XI. Spălare
- XII. Deshidratare
- XIII. Clarificare
- XIV. Montare

Reactivi:

Soluție Roșu de Congo 0,5%: 0,5g Roșu de Congo în 100 ml alcool etilic 50%

Rezultate: nucleii – albaștri, amiloid - roșu cărămiziu (birefrință verde în lumină polarizată)

2.9. Coloratia Van Gieson elastic

- I. **Deparafinare**
- II. **Hidratare**
- III. **Imersie rapida** in alcool etilic 96°
- IV. **Imersie** – sol rezorcină- fucsină (30 minute - 1h)
- V. **Spălare apă distilată**
- VI. **Diferențiere** (alcool 96°)
- VII. **Colorația Van Gieson**

Rezultate: fibre elastice – negru, nucleii – negru, colagen – roșu, muschi – galben

2.10 Coloratia Albastru Alcian

- I. **Deparafinare**
- II. **Hidratare**
- III. **Solutie Albastru alcian** – 20 minute
- IV. **Spalare**
- V. **Contracolorare** cu Hematoxilina Mayer 2 5 minute
- VI. **Spalare**
- VII. **Diferentiere rapida** cu alcool-acid clorhidric
- VIII. **Spalare**
- IX. **Deshidratare**
- X. **Clarificare**
- XI. **Montare**

Reactivi:

Solutie Albastru alcian pH 1: Albastru alcian 8GX 1g+99 ml apa distilata+acid clorhidric 1N pana la pH 1.

Solutie Albastru alcian pH 2,5: Albastru alcian 8GX 1g+50 ml alcool etilic absolut+50 ml apa distilata+ acid acetic glacial pana la pH 2,5

Rezultate: nucleii – albastru, polizaharide acide – albastru

2.11. Coloratia Papanicolaou

- I. **Hidratare**
- II. **Spalare**
- III. **Hematoxilina Harris** – 1-5 minute
- IV. **Spalare**
- V. **Diferentiere** – acid clorhidric 0,25% (10-20 secunde)
- VI. **Spalare**
- VII. **Orange G** – 30 secunde – 4 minute
- VIII. **Alcool etilic 96°** – 2 minute
- IX. **EA50 sau EA51**– 1-15 minute
- X. **Alcool 96°** – doua bai de 3, respective 2 minute
- XI. **Alcool etilic absolut** 2 minute
- XII. **Clarificare**
- XIII. **Montare**

2.12. Coloratia Masson-Fontana

I. Deparafinare

II. Hidratare.

III. Spalare

IV. Imersie timp de 8-24 h la intuneric in solutie argento-amoniaca

V. Spalare

VI. Fixare cu tiosulfat de sodiu 0,5-1% 50-60 secunde

VII. Spalare.

VIII. Contracolorare cu solutie fucsina acida 0,1% 30-60 secunde

IX. Uscare

X. Clarificare

XI. Montare

Reactivi: solutie argento-amoniaca: 5 ml solutie azotat de argint 10%+hidroxid de amoniu 25% pana la disparitia precipitatului de oxid de argint+azotat de argint 10% pana la opalescenta. Se aduce la 50 ml cu apa distilata.

Rezultate: pigment melanic, hemosiderină - negru

2.13. Coloratia Gram

I. Deparafinare

II. Hidratare.

III. Violet de gentiana 1% - 1 minut.

IV. Spalare

V. Solutie Lugol – 2 minute

VI. Decolorare cu alcool-acetona.

VII. Contracolorare cu solutie fucsina bazica 0,1% - 1 minut

VIII. Uscare

IX. Clarificare

X. Montare

Reactivi: Kit de colorare.

Preparare: Violet de gentiana 1g.+100ml.apa distilata

Solutie Lugol:iodura de potasiu 1g+iod 1g.+300ml.apa distilata

solutie fucsina bazica: carbofucsina 1ml.+alcool absolut 10ml.+apa distilata 50ml.

Rezultate: bacterii gram negative – rosu, bacterii gram pozitive - albastru

PROTOCOL DE LUCRU EXAMENUL EXTEMPORANEU

1. Se verifică documentele de insotire a fragmentului tisular și fragmentul tisular similar protocolului de lucru pentru prelucrare histopatologică. În plus se verifica daca fragmentul tisular este de dimensiuni suficiente examenului extemporneu
2. se înregistrează cazul
3. se orientează macroscopic piesa; se dimensioneaza si se descrie fragmentul tisular; se preleveaza fragmente tisulare pentru examenul extemporneu

4. se congelează fragmentului tisular - se monteaza fragmentul tisular pe suportul metalic și se îngheață în criostat la temperatură sub minus 40°C până devine perfect opac
5. se secționează la criomicrotom - se niveleaza blocul tisular înghețat, efectuandu-se secțiuni la 2-10μ
6. Secțiunile obtinute se etalează pe lame de sticla cu ajutorul unui port-ac sau direct cu ajutorul plăței anti-rol
7. Lamele cu material histopatologic sectionat la gheata se coloreaza cu hematoxină-eozină sau soluție de albastru de toluidina (coloratii uzuale) sau Scharlach (coloratie speciala pentru lipide).
8. Se monteaza în apă, glicerină sau medii de montare solubile în solvenți organici

PROTOCOL DE LUCRU IMUNOHISTOCHIMIE (METODA TRISTADIALĂ INDIRECTĂ, EVIDENȚIERE CU DAB)

1. deparafinare
2. spălare cu tampon TBS sau PBS, pH 7.4, 10-20 min (2-3 băi)
3. pretratamente - în funcție de specificațiile fiecărui anticorp primar.
4. spălare cu tampon TBS sau PBS, pH 7.4, 10-20 min (2-3 băi)
5. inhibarea peroxidazei endogene (Hydrogen Peroxide 3%), timp de 15 min
6. spălare cu tampon TBS sau PBS, pH 7.4, 10-20 min (2-3 băi)
7. blocarea antigenicității nespecifice cu protein block după recomandările producătorului
8. spălare cu tampon TBS sau PBS, pH 7.4, 10-20 min (2-3 băi)
9. anticorp primar în cameră umedă la temperatură camerei - în funcție de specificațiile fiecărui anticorp primar.
10. spălare cu tampon TBS sau PBS, pH 7.4, 10-20 min (2-3 băi)
11. anticorp secundar biotinitat antispecie după recomandările producătorului
12. spălare cu tampon TBS sau PBS, pH 7.4, 10-20 min (2-3 băi)
13. streptavidin complex (streptavidin peroxidase), după recomandările producătorului
14. spălare cu tampon TBS sau PBS, pH 7.4, 10-20 min (2-3 băi)
15. dezvoltare cu diaminobenzidină DAB 5-15 minute în funcție de virarea culorii
16. spălare apă de robinet
17. contracolorare cu hemalaun Meyer, urmată de deshidratare și uscare
18. montare.