

I PREPARATI MICROSCOPICI

**APPUNTI AD USO DEI MICROSCOPISTI
PRINCIPIANTI**

Marco Brusadin

ROMA - 2007
– PRO MANUSCRIPTO –

AVVERTENZE SUL COPYRIGHT



Questi APPUNTI su I PREPARATI MICROSCOPICI sono rivolti ai Microscopisti dilettanti principianti.

Sono stati rilasciati - a titolo completamente gratuito - sotto la Licenza:

Creative Commons Attribuzione-Non commerciale-Non opere derivate 2.5 Italia.

Per leggere una copia della licenza visita il sito web <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/it/>.

L'OPERA È MESSA A DISPOSIZIONE SULLA BASE DEI TERMINI DELLA PRESENTE LICENZA "CREATIVE COMMONS PUBLIC LICENCE" ('CCPL' O 'LICENZA').

L'OPERA È PROTETTA DAL DIRITTO D'AUTORE E/O DALLE ALTRE LEGGI APPLICABILI.

OGNI UTILIZZAZIONE DELL'OPERA CHE NON SIA AUTORIZZATA AI SENSI DELLA PRESENTE LICENZA O DEL DIRITTO D'AUTORE È PROIBITA.

CON IL SEMPLICE ESERCIZIO SULL'OPERA DI UNO QUALUNQUE DEI DIRITTI QUI DI SEGUITO ELENCATI, TU ACCETTI E TI OBBLIGHI A RISPETTARE INTEGRALMENTE I TERMINI DELLA PRESENTE LICENZA AI SENSI DEL PUNTO 8.f.

IL LICENZIANTE CONCEDE A TE I DIRITTI QUI DI SEGUITO ELENCATI A CONDIZIONE CHE TU ACCETTI DI RISPETTARE I TERMINI E LE CONDIZIONI DI CUI ALLA PRESENTE LICENZA.



Creative Commons License Deed

Attribuzione - Non commerciale - Non opere derivate 2.5 Italia

Tu sei libero:

- di riprodurre, distribuire, comunicare al pubblico, esporre in pubblico, rappresentare, eseguire e recitare quest'opera



Alle seguenti condizioni:

Attribuzione. Devi attribuire la paternità dell'opera nei modi indicati dall'autore o da chi ti ha dato l'opera in licenza e in modo tale da non suggerire che essi avallino te o il modo in cui tu usi l'opera.

Non commerciale. Non puoi usare quest'opera per fini commerciali.

Non opere derivate. Non puoi alterare o trasformare quest'opera, né usarla per crearne un'altra.

- Ogni volta che usi o distribuisce quest'opera, devi farlo secondo i termini di questa licenza, che va comunicata con chiarezza.
- In ogni caso, puoi concordare col titolare dei diritti utilizzi di quest'opera non consentiti da questa licenza.
- Questa licenza lascia impregiudicati i diritti morali.

Le utilizzazioni consentite dalla legge sul diritto d'autore e gli altri diritti non sono in alcun modo limitati da quanto sopra.

Questo è un riassunto in linguaggio accessibile a tutti del [Codice Legale \(la licenza integrale\)](#).

PREFAZIONE

Ho voluto, con questi modesti APPUNTI, “farmi vicino” ai microscopisti dilettanti principianti, nel tentativo di offrire loro un piccolo, agevole ausilio nell’allestimento dei preparati da esaminare al microscopio ottico.

Non ho alcuna pretesa di esaustività: memore di tante pregresse difficoltà, ho semplicemente voluto presentare alcune tecniche tra le più note e usate.

Probabilmente il lettore più esperto troverà delle variazioni rispetto a quanto riportato da qualche “sacro testo”: le difformità sono state suggerite dalla variabilità dei coloranti che si trovano in commercio e che differiscono - spesso notevolmente - non solo da Produttore a Produttore, ma talvolta anche da Lotto a Lotto.

Preciso che mi sono limitato all’esposizione di tecniche che io stesso uso normalmente e che, pertanto, posso garantire collaudate “sul campo”.

Poiché “l’appetito vien mangiando”, il lettore che desiderasse maggiori informazioni o approfondimenti potrà avvalersi della Bibliografia (anch’essa assolutamente non esaustiva) e di Internet per le proprie ricerche.

Confido che questo modesto mio contributo possa contribuire ad alleviare le fatiche (soprattutto di ricerca delle metodiche in manuali ben più ponderosi) dei principianti e, perché no?, ad avvicinare altri all’affascinante mondo delle osservazioni microscopiche.

Ho trattato esclusivamente l’allestimento dei preparati microscopici istologici, citologici, ematologici e microbiologici; ho volutamente omesso tutto ciò che riguarda la micologia, i protozoi, i parassiti e le alghe (diatomee comprese) perché sono campi di indagine nei quali non opero e non sono particolarmente ferrato: rinvio ai bellissimi lavori di altri, anche tra i microscopisti dilettanti, e alle Mailing List e Forum specifici. Ringrazio in particolare l’amico *Giorgio Carboni*, titolare del sito www.funsci.com dedicato agli sperimentatori dilettanti, per avermi sollecitato (già dall’anno scorso, per la verità!) a stendere questi brevi APPUNTI e per la revisione dell’elaborato.

E ringrazio mia *moglie* e i miei *figli* per il sostegno morale e l’aiuto materiale offertomi nella realizzazione di questo modesto lavoro che, senza il loro prezioso ausilio, non avrebbe neppure visto la luce.

Roma, 5 settembre 2007

Marco Brusadin

AVVERTENZE

Ogni manipolazione, anche la più semplice, che comporti l'uso di **sostanze chimiche** è soggetta a **rischi e pericoli** per l'operatore e per gli altri: chi non fosse sufficientemente preparato - *sia a livello di nozioni sia a livello di manualità* - è vivamente pregato di **farsi aiutare da una persona esperta!**

In particolare, è bene evitare di agire in casa o in luoghi chiusi: si scelgano spazi e/o locali adeguati e, comunque, ben ventilati e sufficientemente illuminati.

Prima anche solo di stappare una bottiglia, è **indispensabile:**

- **accertarsi** - leggendo bene l'**etichetta** - del suo contenuto (che non va "annusato" per nessuna ragione!);
- **prendere visione** dei **simboli di pericolo** (inflammabilità, tossicità, ecc.) riportati sulla confezione;
- **informarsi**, se non si è più che sicuri, tramite Internet o consultando il proprio Farmacista sui **rischi** connessi.

Le "**schede di sicurezza**" delle sostanze (di tutte quelle citate in questo lavoro) sono disponibili su internet, alle rispettive voci; non fornisco i *link* relativi, perché indirizzano alle Case produttrici e non intendo fare pubblicità ad alcuno: ciascuno provveda da sé.

Inoltre, ricordo che i **prodotti chimici** non vanno assolutamente smaltiti tramite la **rete fognaria** o quella dei **rifiuti domestici**: occorre rivolgersi a **Ditte specializzate** o, se queste non fossero reperibili, al proprio Farmacista per avere lumi.

Ritengo non superfluo ricordare a tutti che è **assolutamente vietato** dalle normative vigenti (oltre che dal buon senso) **usare bottiglie non chiaramente etichettate** o che - addirittura - rechino l'etichetta di altri prodotti, soprattutto se commestibili!

Spero non ci sia bisogno di sensibilizzare tutti sulla necessità che i prodotti chimici, anche quelli apparentemente innocui, siano **tenuti assolutamente fuori della portata dei bambini e degli animali domestici**.

Inoltre, le persone che abitano con noi debbono essere informate sulla natura dei prodotti che deteniamo; anzi, sarebbe bene farne un **elenco** da tenere a disposizione **per ogni caso di emergenza o necessità**.

È bene essere informati sull'ubicazione e sulla reperibilità telefonica del più vicino **Centro Antiveneni**, a cui ci si dovrà rivolgere in ogni caso di intossicazione, anche lieve, indicando con la maggior precisione possibile la sostanza a cui si attribuiscono i sintomi.

Infine, consiglio di tenere sempre a portata di mano un **estintore a polvere** (almeno del tipo per autovetture), stracci per asciugare eventuali liquidi (in realtà esistono vari prodotti *ad hoc*, come il **Chemizorb**® granulare) e acqua corrente.

Il **piano di lavoro** deve essere impermeabile e ininfiammabile: meglio il buon vecchio marmo (che peraltro si corrode e si macchia facilmente) piuttosto che il legno o i laminati plastici. L'ideale sarebbe fabbricarsene uno con maioliche bianche opportunamente cementate.

Indispensabili, poi, sono il **kit-lavaocchi**, gli **occhiali protettivi** (meglio la **maschera trasparente** tipo giardinaggio), la **maschera antipolveri** (quelle di carta), i **guanti di lattice** (meglio quelli di **vinile per solventi**, per la loro maggiore resistenza alle sostanze chimiche), il **camice da laboratorio**.

Spero sia superfluo ricordare il **divieto assoluto di fumare e di tenere fiamme libere accese** (a meno di aver adottato le **indispensabili precauzioni**).

Attenzione anche allo stato "di salute" dell'**impianto elettrico** il quale deve essere munito di presa a terra e di **salvavita**: può bastare una scintilla in un ambiente in cui siano presenti vapori di alcol, di etere, di xilene o di altri infiammabili per far scoppiare un incendio.

E, infine... tanto **buon senso**: in fondo stiamo parlando di un *hobby*, non di un lavoro!

Questi APPUNTI sono rivolti a **dilettanti seri e coscienziosi**, capaci di serenità di **giudizio** e di **quell'umiltà** che permette di chiedere lumi e - se occorre - anche **aiuto**.

Una raccolta dei **principali segnali di pericolo** relativi ai prodotti chimici (e altri) può essere reperita sul sito: <http://chimica.unical.it/sicurezza/signaletica.html>

RIBADISCO l'INDEROGABILE NECESSITÀ di consultare le schede di sicurezza (reperibili anche on-line in Internet) di ogni sostanza PRIMA di acquistarla e di seguire **SCRUPOLOSAMENTE** le indicazioni e le precauzioni che vi sono indicate.

In ogni caso, NON MI ASSUMO ALCUNA RESPONSABILITÀ' per le conseguenze derivate da manipolazioni che chiunque intendesse compiere a seguito della lettura di questi APPUNTI, soprattutto se effettuate in deroga alle norme di legge e di prudenza "da buon padre di famiglia".

Buone Osservazioni!

Marco Brusadin

INDICE

CAPITOLO I - L'ALLESTIMENTO DEI PREPARATI ISTOLOGICI

Introduzione	pag. 10
Fissazione	11
Taglio delle sezioni	
Operazioni preliminari	12
Indurimento	12
Disidratazione	13
Inclusione in paraffina	14
Preparazione del blocchetto di paraffina per il taglio	16
Realizzazione delle sezioni (tecnica delle "fette")	17
Sparaffinatura	18
Reidratazione	19
Colorazione	19
Montaggio del preparato	
Disidratazione e diafanizzazione	19
Montaggio in Balsamo	19
Le "insidie" del coprioggetti	20
Misurazione e scelta dello spessore del coprioggetti	21
Operazioni conclusive e conservazione del preparato	22
Fissativi	
Liquido di Bouin	22
Formalina salata di Policard	22
Incollante (Albumina glicerinata di Mayer)	22
Coloranti	
Ematossilina	23
Eosina	23
Disidratanti	
Tabella di diluizione degli alcoli	24
Protocollo di colorazione	25

CAPITOLO II - L'ALLESTIMENTO DEI PREPARATI EMATOLOGICI

Introduzione	27
--------------	----

Un po' di Storia	pag. 28
Esecuzione dello Striscio	29
Tecnica di esecuzione	30
Essiccamento dello Striscio	31
Allestimento dei preparati permanenti	
Fissazione	32
Colorazione di May-Grünwald - Giemsa	32
Montaggio in Balsamo (o no?)	33
Osservazione dei preparati	
Effetti dopo la colorazione di May-Grünwald - Giemsa	34
Artefatti	35
Allestimento dei preparati per l'osservazione <i>in vivo</i>	
Contrasto di Fase	37
Contrasto d'Interferenza	38
Nota sull'uso dell'acqua distillata nelle colorazioni	39
Reagenti	
Tampone Fosfati	40
Coloranti	
May-Grünwald	41
Giemsa	41

CAPITOLO III - L'ALLESTIMENTO DEI PREPARATI MICROBIOLOGICI

Introduzione	42
Materiali	43
Reagenti	44
Coloranti	
Violetto di Genziana Fenicato di Nicolle	45
Liquido di Lugol	45
Fucsina Fenicata di Ziehl	45
Blu di Metilene di Löffler	45
Blu di Metilene	45
Colorante di Albert	46
Preparazione del materiale da esaminare	46
Colorazioni	
Metodo di Gram	47
Metodo di Ziehl - Neelsen	48

Metodo di Albert	pag. 49
Metodo di Schaeffer - Fulton	50
Metodo all'Inchiostro di China	52

**CAPITOLO IV - L'ALLESTIMENTO DEI PREPARATI MICROSCOPICI
NELLA CITOLOGIA ESFOIATIVA**

Introduzione	54
Un po' di Storia	55
Materiali	56
Reagenti	57
Coloranti	
Ematossilina di Harris	57
Orange G (OG6)	58
Miscele Policrome EA	58
EA-36 (50)	59
EA-65	59
Metodi di allestimento	60
Fissazione	61
Colorazione	
Metodo di Papanicolau	61
Metodo "alternativo"	62
Metodo rapido di Giemsa	63
Metodo di Shorr	63

BIBLIOGRAFIA

Capitolo I	65
Capitolo II	67
Capitolo III	68
Capitolo IV	69
Approfondimenti	71
Avvertenza	75

APPENDICE	76
------------------	----

CAPITOLO I

L'ALLESTIMENTO DEI PREPARATI ISTOLOGICI

INTRODUZIONE

I preparati da esaminare al microscopio possono essere suddivisi in due grandi famiglie: quelli **temporanei** e quelli **permanenti**.

In queste modesti APPUNTI – *ad uso dei principianti* – mi occuperò dei **preparati permanenti**, cioè di quelli che, una volta allestiti, possono essere conservati praticamente “indefinitamente”.

Ho *virgolettato* il termine “indefinitamente”, perché in realtà anche questi preparati vanno incontro – nel corso degli anni – ad alterazioni dovute principalmente a modificazioni del **pH** del mezzo di inclusione, specialmente il vecchio **Balsamo del Canada** che tende ad ingiallire e ad acidificare decolorando parzialmente il preparato medesimo.

Anche i mezzi di inclusione più moderni, tuttavia, subiscono modificazioni e gli stessi coloranti tendono a sbiadire, specialmente se sottoposti per lunghe ore a forti illuminazioni, come accade quando si rimane ad osservare per molto tempo lo stesso campo microscopico con la lampada dell'illuminatore alla massima intensità luminosa (e, magari, con il diaframma di campo troppo aperto).

In un eventuale prossimo lavoro riferirò la tecnica per il **ripristino delle vecchie colorazioni istologiche sbiadite**.

Ma veniamo alla pratica.

FISSAZIONE

Innanzitutto, occorre ricordare che qualsiasi modifica dell'*habitat* di un tessuto o di una cellula induce delle alterazioni: a maggior ragione questo accade quando il tessuto (o la cellula) viene rimosso dal suo ambiente vitale e, dunque, va incontro alla morte (a meno che non venga "coltivato" in appositi "sistemi" artificiali... ma di questo ci occuperemo, eventualmente, in un prossimo lavoro).

Occorre, dunque, minimizzare le alterazioni del tessuto e questo si fa con la *fissazione*. Questa consiste nel bloccare selettivamente alcuni meccanismi degenerativi tipici della morte e della necrosi cellulare.

Esistono varie sostanze chimiche in grado di far questo, tra le quali l'**alcole etilico**, l'**etere etilico**, il **tetrossido di osmio** (impropriamente chiamato "acido osmico"), l'**aldeide formica** (che commercialmente viene chiamata "formalina"), la **glutaraldeide**, l'**acido acetico**, nonché fenomeni fisici come il **calore**, il **freddo**, ecc.

Il fissativo più comunemente usato in istologia è a base di **aldeide formica**, mentre per la citologia esfoliativa e per l'ematologia si usa una miscela **alcole etilico-etere etilico** o preparati a base alcolica-glicolica.

Il **tetrossido di osmio** è usato generalmente come post-fissativo per i preparati, fissati preventivamente in **glutaraldeide**, destinati al microscopio elettronico.

Il **calore** viene usato principalmente in microbiologia.

Il **freddo** viene usato quasi esclusivamente nel cosiddetto "criostato" (o microtomo congelatore) apparecchio che congela il pezzo a -50 °C e lo affetta direttamente senza bisogno di inclusione in paraffina o in celloidina (altra sostanza usata per includere, ma di uso più complesso e non adatta – a mio avviso – per i principianti).

In riferimento principalmente all'istologia animale, il primo passo da compiere, dunque, una volta prelevato il campione, è di fissarlo in modo da minimizzare e arrestare le alterazioni *post-mortem*.

Il fissativo più comunemente usato è il *Liquido di BOUIN*, la cui composizione verrà descritta più avanti in questo capitolo.

La durata della fissazione varia in base alla grandezza del pezzo e, soprattutto, al suo spessore: per reperti delle dimensioni di 0,5-1 centimetri cubi e di spessore 3-4 mm, bastano solitamente dalle 12 alle 24 ore a temperatura ambiente. Non è il caso di prolungare eccessivamente la fissazione, perché tutti i fissativi tendono a indurire il pezzo e a coartare i vasi (sanguigni e linfatici) eventualmente presenti.

Occorre tenere presente che, se da un lato il fissativo evita le alterazioni *post-mortem*, dall'altro esso introduce alterazioni specifiche (sotto forma di precipitati lipidici e proteici e di riduzione dei volumi sia dei tessuti sia delle cellule che li costituiscono). Si possono creare, in tal modo, artefatti vari che, uniti a quelli tipici delle operazioni

susseguenti (disidratazione, inclusione in paraffina, affettatura, sparaffinatura, reidratazione, colorazione, disidratazione, diafanizzazione ed inclusione in montante permanente), debbono essere ben conosciuti e tenuti presenti dall'osservatore per evitare madornali errori di riconoscimento dei più piccoli componenti cellulari e, talvolta, dei tessuti stessi.

TAGLIO DELLE SEZIONI (MICROTOMIA)

Operazioni preliminari

L'operazione seguente alla fissazione consiste nel taglio del reperto in sezioni sottili (10-20 micrometri, unità di misura del Sistema Internazionale – lo ricordo – del valore di 1/1000 di mm, chiamata anche *micron* e indicata con la lettera greca μ [*mu*] o, nel SI, con μm) in modo da rendere le medesime sufficientemente permeabili ai raggi luminosi ed essere in tal modo osservabili – per trasparenza – al microscopio.

Indurimento

Per poter effettuare il taglio di sezioni sufficientemente sottili, occorre non solo disporre di un apposito strumento (**microtomo**), ma anche indurire adeguatamente il reperto in modo da poterlo agevolmente affettare.

In *Istologia vegetale* possono essere tollerate sezioni di spessore maggiore (fino ai 30-50 micrometri) a causa della specifica struttura trabecolare dei tessuti: si può pertanto omettere il passaggio di indurimento e racchiudere il reperto tra due blocchetti di midollo di sambuco e procedere direttamente all'affettatura (anche con una lametta da barba o un rasoio).

In *Istologia animale*, invece, il reperto viene ordinariamente incluso in una particolare miscela di cere, la *paraffina*; in microscopia elettronica si usano resine epossidiche specifiche (tipo la miscela *Epon-Araldite*), molto più dure della paraffina, che consentono di effettuare sezioni dello spessore di 0,5-2 micrometri.

Il reperto, estratto dal liquido fissativo, dovrebbe essere incluso in paraffina... peccato che questa non sia solubile in acqua e che il fissativo, invece, sia ordinariamente in soluzione acquosa! Occorre, dunque, sostituire l'acqua del fissativo (e dei tessuti) con una sostanza in cui sia solubile la paraffina. Nell'istologia classica, questa sostanza è lo **xilene** (erroneamente chiamato **xilolo**: dico erroneamente perché il suffisso *-olo* in chimica organica è riservato agli alcoli e lo xilene non appartiene a tale categoria di sostanze, bensì agli idrocarburi che hanno appunto il suffisso *-ene*).

Purtroppo, *lo xilene è cancerogeno* (come il **benzene**, il **toluene** e molte altre sostanze con cui veniamo in contatto quotidianamente...) e attualmente è stato sostituito da altri preparati a base di **limonene**.

Comunque, non avendo esperienza diretta con queste altre sostanze, mi limito a descrivere il *procedimento "classico" con xilene*.

Disidratazione

Siamo rimasti all'esigenza di sostituire l'acqua con lo xilene... Per fare questo, danneggiando il meno possibile le cellule e i tessuti, occorre effettuare la sostituzione *gradualmente*: si usa, a tal fine, l'**alcole etilico** (**etanolo**, secondo la terminologia IUPAC - INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - adottata in chimica) a concentrazioni crescenti, in modo da disidratare il reperto. L'alcole, infatti, ha la proprietà di essere solubile sia in acqua sia in xilene.

Abbiamo, allora, quella che tecnicamente viene chiamata "serie ascendente degli alcoli":

50° - 70° - 80° - 95° - 100° (per la tempistica, vedasi il Protocollo a p. 25).

In alcuni testi si trova indicato l'alcole a 96° in luogo di quello a 95°: dipende dal prodotto che si trova in commercio in quel momento... e dalle Case che lo producono, ma l'uno o l'altro sono praticamente equivalenti per i nostri fini.

Debbo anche precisare che, in luogo dell'alcole etilico, si può usare l'acetone a pari diluizioni: però è più difficile reperire una tabella di diluizione dell'acetone, oltre al fatto che in commercio si trova l'acetone puro, non quello a 95°.

Ovviamente, l'alcole etilico "puro" o "assoluto" (cioè a 100°) subisce un trattamento diverso dall'alcole a 95° (che, dunque, non differisce solo perché contiene una certa quantità di acqua...ma anche per la purezza chimica) e – ovviamente – è diverso... anche nel prezzo! Poiché mi rivolgo a dilettanti, mi premuro di precisare che, per i nostri fini, non occorre acquistare alcole etilico a 95° per analisi... basta quello per liquori, molto più economico e reperibile nei supermercati. Certamente, se qualcuno poi si fa prendere la mano e vuole fare dell'istochimica ad alto livello... beh!... Allora è proprio necessario usare quello "per analisi"!

Se, poi, qualcuno volesse usare il **metanolo** (**alcole metilico**), sappia che in Italia questo non è di libera vendita, ma occorre una particolare licenza dell'UTIF (UFFICIO TECNICO IMPOSTE DI FABBRICAZIONE).

L'**alcole etilico assoluto** (**etanolo assoluto**), invece, deve essere proprio quello "da laboratorio"! Convieni acquistare quello "per analisi" che è più economico di quello "per cromatografia" o per altre applicazioni nelle quali è richiesto un ancora maggiore grado di "purezza" da residui vari.

Poiché gli alcoli ad alta gradazione sono molto *igroscopici* (cioè avidi di acqua) e dunque suscettibili di “perdere il titolo”, cioè di diluirsi, e poiché quando si trasporta il reperto da un alcole a gradazione inferiore a uno a gradazione superiore inevitabilmente si trasporta anche un po' dell'acqua contenuta nell'alcole a gradazione inferiore, per “far durare” di più gli alcoli a titolo più alto si usa duplicare o triplicare i “bagni” in recipienti separati.

In definitiva, una “buona” *scala ascendente degli alcoli* sarà:

50° - 50° - 70° - 70° - 80° - 80° - 95° - 95° - 95° - 100° - 100° - 100° + xilene (in parti uguali) – xilene – xilene – xilene e, finalmente... paraffina!!!! (tempistica a p.25).

Inclusione in paraffina

Ed eccoci ad altre “dolenti note”: la paraffina, infatti, è una miscela di cere a vari punti di fusione. Pertanto, in commercio, per l'istologia si trovano paraffine a punto di fusione (alcuni cataloghi lo chiamano “punto di rapprendimento”...) compreso tra +42 e +58 °C.

Quale criterio adottare per scegliere?

Innanzitutto, ci si basa sul tipo (e la relativa consistenza!) del tessuto da inglobare. Tessuti “delicati”, alveolari (polmone, fegato, ad esempio) vanno inglobati in paraffina a basso punto di fusione (per non “cuocerli!”): ecco che allora si può usare la “paraffina 42-44 °C” o anche la “paraffina 46-48 °C”.

Per tessuti “duri”, come ad esempio la cartilagine (tralascio l'osso e il dente perché la loro durezza richiede trattamenti particolari nonché microtomi adatti), possono essere inclusi in “paraffina 52-54 °C”. Personalmente, non mi sento di consigliare, almeno agli inizi e finché non ci si sia dotati di un **microtomo** professionale e di una adeguata esperienza, paraffine a punto di fusione più elevato.

Le paraffine del commercio vengono vendute in blocchi o in granuli: vanno bene entrambi.

Adesso, giunti a casa con il nostro barattolo di paraffina, dobbiamo “liquefarla” senza “bruciarla”.

La cosa migliore, in mancanza di una adeguata “stufa ad acqua per paraffina” (o di una camera termostatica con regolazione della temperatura al grado Celsius), è il buon vecchio ... “bagnomaria”. Basterà un pentolino di acqua da porre sul gas con immerso un termometro preciso almeno al grado (meglio a 0,5 gradi) e, dopo un po' di prove “in bianco” (cioè senza metterci dentro la paraffina) si acquisirà l'esperienza sufficiente per capire quando allontanare il pentolino dalla fiamma e quando rimettervelo sopra.

Molto utile può essere uno scaldabiberon o uno scaldavivande... basta accertarsi che la temperatura raggiungibile sia sufficiente e che sia termostato.



Fig. 1 (sopra): Bagnomaria elettrico per fondere la paraffina.



Fig. 2 (a destra): Barattolo contenente paraffina in fusione.

Attrezzati di tutto punto, possiamo ora prelevare un po' della nostra paraffina e porla in un pentolino più piccolo che andrà posto nel bagnomaria.

Quanta paraffina mettere a fondere? Come è intuitivo, dipende dalla grandezza del pezzo! Va inoltre tenuto presente che la paraffina va cambiata tre volte!

Pertanto, supponendo di avere un reperto di circa 1 centimetro cubo di volume – occorreranno tre “bagni” da 30-50 centimetri cubi: il pezzo dovrà essere immerso nel primo bagno per un tempo adeguato (ne discuteremo in sede di “protocolli”), poi passato rapidamente (senza far raffreddare la paraffina) nel secondo bagno e tenuto altrettanto, poi nel terzo bagno (per il medesimo tempo) e, infine... incluso! Per l'immersione in paraffina, onde evitare di danneggiare il reperto con pinze o di... danneggiarsi i polpastrelli, conviene acquistare uno o più degli appositi cestelli (ne esistono in plastica termoresistente, ma vanno magnificamente bene i “vecchi” cestelli in acciaio inox; sono ovviamente di piccole dimensioni: insomma, non il “cestello” della lavatrice e neppure quello scolapasta: sono adatti quelli per il thè!!!). Il pezzo, dicevamo, finalmente viene incluso. Come? Credo che a nessuno venga in mente di acquistare gli ormai introvabili ferri (o “forme”) di LEUCKART! Oggi si trovano in commercio degli “stampi” in plastica termoresistente... del tutto simili alle vaschette per la produzione del ghiaccio nei nostri frigoriferi casalinghi! Perché, dunque, non usare le nostre vaschette (mogli e mamme permettendo... ma basta far loro presente la differenza dei costi...) per il ghiaccio?

Come si fa? Semplice: si versa uno strato - di circa 2 millimetri – di paraffina (nuova!) fusa sul fondo della vaschetta e si attende che si formi un leggero *opacamento* (indice di un iniziale raffreddamento). Si preleva rapidamente il reperto dalla paraffina fusa

e lo si pone (servendosi delicatamente di *pinzette anatomiche* – quelle senza dentini, per capirci - ... van bene anche quelle di acciaio inox che si usano in cucina e che sono decisamente più economiche di quelle per chirurgia) sullo strato appena preparato di paraffina nello stampo. Si versa immediatamente altra paraffina (nuova) fusa fino a riempire la vaschetta. Se occorresse variare la posizione del reperto prima che la paraffina inizi a raffreddarsi e a solidificarsi, lo si può fare servendosi di un ago da dissezione (vanno bene anche quelli che si trovano nel corredo dei microscopi giocattolo).

A questo punto non si deve fare altro che attendere il raffreddamento della paraffina. Attenzione!!! Alcuni Autori consigliano di immergere il contenitore (o forma) con la paraffina fusa in acqua fredda o addirittura ghiacciata, per evitare la cristallizzazione della paraffina stessa. Il Beccari e il Montaldo, citati in bibliografia, sconsigliano caldamente questa soluzione, specificando che la paraffina deve essere lasciata raffreddare lentamente. Che dire? Io seguo il Beccari e non ho mai avuto sorprese... Ognuno faccia le sue esperienze!

Preparazione del blocchetto di paraffina per il taglio

Ed ora, a raffreddamento e solidificazione avvenuti... sarà molto facile staccare il blocchetto (proprio come si fa con un cubetto di ghiaccio...) e proseguire le nostre manipolazioni.

Il blocchetto è molto sovrabbondante rispetto al reperto che vi è incluso: si potrebbe affettarlo così com'è, certamente, ma poiché le lame da microtomo costano e... perdono il filo molto facilmente... conviene eliminare la paraffina in eccesso servendosi di un taglierino, fino a ridurre lo spessore della paraffina attorno al reperto a non più di 1 o 2 millimetri.

La parte "superiore" del blocchetto, quella cioè che incontrerà la lama del nostro microtomo e che originariamente era sul fondo della vaschetta, dovrà avere uno spessore della paraffina non superiore a 0,5- 1 mm; la parte inferiore (quella che era in superficie nella vaschetta) servirà per essere "incollata" a un supportino di legno che verrà stretto nella apposita morsa del portacampioni del microtomo. La procedura - che va usata anche nei cosiddetti "microtomi a mano", fatti salvi gli opportuni adattamenti dimensionali (in genere, infatti, tali microtomi non supportano sostegni di lato maggiore di un centimetro) - è la seguente: si versa un leggero strato di paraffina fusa sulla superficie superiore del supporto, si attendono il raffreddamento e la solidificazione, quindi vi si appoggia la faccia inferiore del blocchetto di paraffina da affettare; tra queste due superfici affacciate, si fa scorrere una lama di coltello scaldata, in modo da fondere contemporaneamente un po' della paraffina del supporto e di quella del blocchetto... e il gioco è fatto!



Fig. 3: Il “blocchetto di paraffina”.
A sinistra, come si presenta una volta tolto dallo stampo.
A destra, ridimensionato per il taglio.

Si noti lo strato di paraffina sopra il reperto:
nel blocchetto “vergine” è presente;
in quello pronto per il taglio tale strato è stato già asportato.



Fig. 4: Modo di “incollare” il blocchetto di paraffina sul supporto per il taglio.

Realizzazione delle sezioni (tecnica delle “fette”)

Ora, si può procedere al taglio.

Si inizia con fette piuttosto spesse, asportando così la paraffina fino a che il reperto comincia ad essere lambito dalla lama.

A questo punto conviene raffreddare la paraffina per renderla più rigida al taglio e realizzare in tal modo sezioni più sottili. Ciò si ottiene ponendo per una trentina di secondi un cubetto di ghiaccio sopra la superficie di taglio.

Tale operazione andrà ripetuta ogni tanto (piuttosto spesso in estate!).

Le “fettine” che si ottengono debbono essere distese e il loro spessore può essere valutato (occorre un po’ di esperienza!) in base alla loro trasparenza e alla loro “distensione”. Infatti, fettine che si arrotolano su se stesse sono – in genere - troppo spesse, mentre quelle eccessivamente sottili si presentano molto ondulate e lacerate e, alla fine, si rompono appena si prova a toccarle anche con il pennellino.

Il *pennellino*... giusto! Come si raccolgono le sezioni?

Si prendono due pennellini sottili da acquerello (pelo morbido!!!). Si immergono nell’acqua tiepida (37-40°C) contenuta in un’apposita vaschetta a riscaldamento elettrico termostata e con essi si prelevano – una per una – le fettine dalla lama del microtomo (sulla quale rimangono adagiate dopo il taglio) e le si distendono sulla superficie dell’acqua.

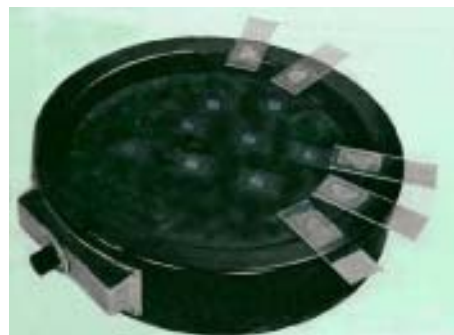
L’operazione, evidentemente, è molto delicata e diviene ancora più complessa per chi usa i microtomi “rotativi automatici” i quali, invece della singola fettina, generano un “film” di più fettine attaccate.

Ma, si sa, “val più la pratica che la grammatica”...

E la “vaschetta termostata”? Può andare bene quella usata per fondere la paraffina, purché portata alla temperatura più sopra indicata.

Abbiamo (finalmente!!!) ottenuto una (o più, spero!) fettina decente: ha il giusto spessore, ha poche (o nessuna) lacerazioni, è sufficientemente distesa e trasparente (attenzione a non alzare troppo la temperatura del bagno di acqua: si scioglierebbe la paraffina e il reperto andrebbe “a fondo” irrecuperabilmente): ora, dobbiamo trasportarla sul vetrino portaoggetti (alcuni preferiscono il coprioggetti: la cosa è del tutto indifferente e la scelta del vetrino più piccolo è solo per risparmiare sui liquidi da usare in seguito; c'è solo il lato negativo che il coprioggetti è molto più fragile...) e incollarvela.

Fig. 5: La vaschetta, a riscaldamento elettrico, termostata, contenente l'acqua sulla quale galleggiano le sezioni da raccogliere sul portaoggetti. I portaoggetti che sono sul bordo vi si trovano per sfruttare il calore della resistenza diffuso attraverso le pareti della vaschetta e favorire, in tal modo, la distensione delle fettine.



Il trasporto viene fatto immergendo un portaoggetti (contenente o no una goccia di albumina glicerinata, di cui parleremo dopo, secondo la propria pratica) inclinato sotto la fettina e, con l'aiuto del pennellino (evitando di danneggiare il reperto), si fa “scorrere” la fettina sul vetrino facendovela aderire. Si estrae il vetrino dall'acqua e lo si pone ad asciugare in piano. Si lascia il vetrino con la goccia e la fettina sovrapposta ad asciugare a 37 °C (possibilmente in termostato, ma anche a temperatura ambiente va bene: occorre solo più tempo e, magari, aiutarsi con un asciugacapelli, riscaldando leggermente la parte inferiore del vetrino) finché la fettina non apparirà ben distesa ed attaccata al portaoggetti: saranno necessarie una o più ore.

Sparaffinatura

E ora? Coloriamo? Eh, no: ancora un po' di pazienza! Occorre rimuovere la paraffina! Si preparano tre bagni di xilene e vi si immerge il vetrino con la fettina per alcuni minuti (i particolari a dopo, nella descrizione dei protocolli!) cambiando ogni volta il bagno, finché la paraffina si sarà del tutto disciolta. Nel primo bagno appariranno delle caratteristiche “nubecole” dovute alla paraffina sciolta.

Ora, si passa per una volta nel bagno xilene-alcool 100° e poi... si colora?

Reidratazione

No! Non ancora! I coloranti istologici, in genere, sono in soluzione acquosa (in modo da trovarsi allo stato ionizzato, altrimenti non colorerebbero) e non in alcol! Allora, occorre reidratare la fettina e ciò si fa passando per la “serie discendente” degli alcoli. Questa volta, poiché si passa da alcoli a gradazione superiore a quelli a gradazione inferiore, sarà sufficiente un solo bagno per ogni gradazione alcolica, fino a giungere, dopo l’alcole a 50°, all’acqua distillata.

COLORAZIONE

A questo punto, dopo una opportuna sosta nell’acqua distillata, si procederà alla colorazione (che verrà descritta più avanti, nei protocolli).

MONTAGGIO DEL PREPARATO

Disidratazione e diafanizzazione

Terminata la colorazione, secondo il metodo prescelto, si sciacquerà la sezione in acqua distillata e si procederà a disidrarla passandola per la “serie ascendente” degli alcoli, con le stesse modalità (ma con tempi notevolmente inferiori, lo vedremo in seguito, nei protocolli) fino ad arrivare allo xilene.

Montaggio in Balsamo

Dopo aver prelevato il vetrino con la sezione colorata, disidratata dagli alcoli e “diafanizzata” dallo xilene, si procederà a versare una o due gocce di “montante” (**Balsamo del Canada**, o montanti sintetici, o quel che volete, purché abbia un indice di rifrazione uguale a quello del vetro, cioè circa 1,515) e si coprirà il tutto con il vetrino coprioggetti, evitando che si formino bolle d’aria.

Si attende che il montante si sia distribuito uniformemente tra i due vetrini, eventualmente esercitando una lieve pressione, e si lascerà ad asciugare a temperatura ambiente (meglio in termostato a 37°C), in piano, per alcune ore.

Alcuni Autori suggeriscono di porre un piccolo “peso” da 20-50 g sopra il coprioggetti, per favorire la distribuzione del montante e la eventuale fuoriuscita dell’eccesso (che va immediatamente rimosso con una pezzuola imbevuta di xilene).

Le “insidie” del coprioggetti

Il vetrino coprioggetti non è “otticamente inerte” come si potrebbe pensare. Infatti, essendo a facce piano-parallele, si comporta esattamente come una lente con raggio di curvatura infinito! Ecco che occorre, allora, rispettare alcune “regole” che, se trascurate, possono riservare sgradevoli sorprese quanto alla risoluzione dell’immagine da parte dell’obiettivo, al contrasto e anche all’introduzione di alcune aberrazioni. Orbene, supponendo di avere a disposizione obiettivi che “esigono” la presenza del coprioggetti (segnalata in genere con la cifra 0,17 dopo l’indicazione della lunghezza meccanica del tubo del microscopio, p.es.: 160/0,17) e di non avere un obiettivo con la ghiera di regolazione per compensare lo spessore del coprioggetti, qualora di valore diverso, occorrerà usare proprio coprioggetti di spessore adeguato... che sarà leggermente inferiore agli 0,17 mm teorici!

Infatti, $0,17 \pm 0,01$ mm è il valore dello spessore del mezzo ottico interposto tra il preparato e la superficie superiore (superiore) del coprioggetti: e allora? Delle due, l’una: o ci si munisce di un **micrometro Palmer** (strumento in grado di misurare spessori, con sensibilità di 1 centesimo di millimetro), o si va per esperienza.

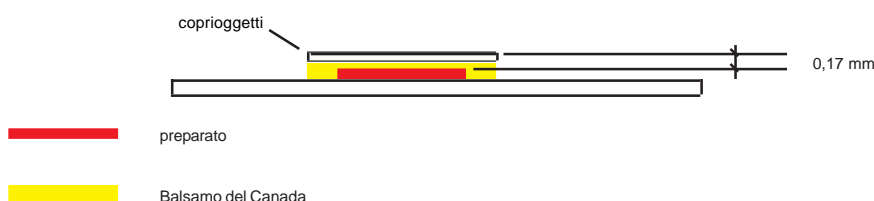


Fig. 6: Schema di un preparato montato in Balsamo tra i vetrini

A proposito della indicazione della presenza del coprioggetti, reputo opportuno ricordare che, se al posto della cifra 0,17 c’è un trattino (es.: 160/-), vuol dire che il sistema ottico è insensibile a scostamenti dallo spessore “ideale” di 0,17 e il preparato può anche non essere ricoperto con il coprioggetti (vds: Möllring, *Nozioni basilari di microscopia*, citato in Bibliografia, p.28).

In genere la situazione risulta critica con obiettivi a secco a forte ingrandimento, ma non solo.

Nel prossimo capitolo, dedicato alle preparazioni ematologiche, discuterò circa l’uso del coprioggetti sugli strisci...

Occorre inoltre prestare attenzione perché i coprioggetti commerciali (tranne particolari marche... con relativi “particolari” prezzi!) non presentano assolutamente tutti lo stesso spessore! Nella stessa confezione si reperiscono tranquillamente vetrini con spessori oscillanti tra 0,14 e 0,19 mm!

Misurazione e scelta dello spessore del coprioggetti

Ho parlato di *micrometro*: però attenzione! Il *micrometro*, benché “frizionato”, presenta una “pressione” di misura che può danneggiare il vetrino o lo stesso preparato! Personalmente, preferisco usare un **comparatore micrometrico** con sensibilità al centesimo di millimetro: è un apparecchietto ad indice rotante (come un orologio, per capirci) che normalmente viene usato sui torni per verificare l’eccentricità del pezzo da lavorare, soprattutto per “riprenderlo” sull’autocentrante.



Fig. 7 : (Da sinistra) (a) Un comparatore micrometrico nella sua confezione; (b) il comparatore montato sul supporto di misura; (c) mentre misura lo spessore del portaoggetti; (d) mentre misura lo spessore del coprioggetti montato.

Questo comparatore è dotato di un’asta a pistone (sorretta da una molla molto leggera, proprio perché deve essere in grado di registrare anche le più piccole asperità ed eccentricità di un pezzo in rotazione) che costituisce il “tastatore”. Ebbene, fissato opportunamente (rigidamente!) il comparatore al di sopra di una superficie rettificata (va bene anche un vetrino portaoggetti poggiato su un piano), si pone il coprioggetti da esaminare tra la superficie rettificata e il tastatore e si misura lo spessore. Io lo faccio per ogni serie nuova di coprioggetti e li seleziono in vari contenitori in base allo spessore effettivo. A questo punto, scelgo il coprioggetti dello spessore che reputo più adatto al singolo preparato e, una volta montato ed essiccato, verifico (sempre con il comparatore) lo spessore “effettivo”, cioè la differenza tra la faccia superiore del portaoggetti che regge il mio preparato e la faccia superiore del coprioggetti. Considerando che riesco a realizzare sezioni di 10 micrometri di spessore e che reputo abbastanza attendibile uno spessore di 2-3 micrometri di montante residuo tra il preparato e la faccia inferiore del coprioggetti, il “delta” che mi attendo è $0,17 + 0,013$ mm, cioè circa 0,18 mm di “sbalzo” tra il coprioggetti e il portaoggetti “montato”. (Vds anche: Leitz, *Il microscopio...*, citato in Bibliografia, p.38).

In genere, riesco ad ottenere preparati di spessore effettivo adeguato... altrimenti regolo l’apposita ghiera dell’obiettivo!

OPERAZIONI CONCLUSIVE E CONSERVAZIONE DEL PREPARATO

Mentre si attende l'essiccamento del preparato montato, occorre occuparsi ancora una volta del blocchetto di paraffina da cui abbiamo realizzato la nostra sezione.

Poiché la paraffina rende praticamente inalterabile il preparato incluso, conviene ricoprire la superficie di taglio del blocchetto con un leggerissimo strato di paraffina fusa, in modo da preservarlo per ulteriori sezioni e osservazioni. Ed ora?

Buone osservazioni!!!

FISSATIVI

1) Liquido di Bouin

Acido picrico, soluzione acquosa satura	15 ml
Aldeide formica 40%	5 ml
Acido Acetico glaciale	1 ml

I componenti vanno mescolati al momento dell'uso.

Il tempo di fissazione va da 12 a 48 ore (secondo la grandezza dei pezzi). Si passa poi direttamente in alcole etilico a 80° (si omettono il 50° e il 70°) che va cambiato più volte finché il pezzo non cede più colore.

In alternativa al Bouin (vista la **pericolosità dell'acido picrico concentrato**), si usa vantaggiosamente la:

2) Formalina salata di Policard

Aldeide formica 40%	100 ml (VAPORI TOSSICI)
Cloruro di Sodio	9 g
Acqua distillata	900 ml

Pezzi piccoli si fissano in poche ore, ma i tempi consigliati vanno dalle 24 alle 48 ore. Si passa, poi, nell'alcole a 50° ecc., come indicato a proposito della scala degli alcoli.

INCOLLANTE

Albumina glicerinata di Mayer

Albume d'uovo	50%
Glicerina filtrata	50%

Si mescola e si aggiunge un grano di timolo o di canfora per evitare la putrefazione.

COLORANTI

1) Ematossilina

Ne esistono varie “ricette”: io consiglio quella di **HARRIS** (usata anche nel metodo di Papanicolau per la citodiagnostica e reperibile facilmente, *già pronta per l'uso*, nei negozi di articoli chimici per analisi).

Eccone, comunque, la preparazione, basata su quella del **Beccari** (vedi Bibliografia):

Soluzione A

Ematossilina	5 g
scioglierla in:	
alcole etilico assoluto (100°)	50 ml

scaldare in bagnomaria.

Soluzione B

Alluminio Potassio Solfato (allume di potassio)	100 g
sciogliere, mescolando e scaldando, in:	
Acqua distillata	900 ml

Continuando a mescolare, versare la soluzione A nella soluzione B ancora calda e portare a ebollizione.

Togliere la soluzione così ottenuta dalla fonte di calore e aggiungere:

Sodio Iodato	370 g
--------------	-------

raffreddando rapidamente in bagnomaria freddo.

Aggiungere:

Acido Acetico glaciale	5 ml
------------------------	------

Filtrare e conservare in flaconi scuri.

ATTENZIONE: *L'Ematossilina va filtrata ogni volta prima di usarla.*

Non va usata se ha cambiato colore da rosso porpora in marrone.

Colora in 15 - 20 minuti (per il Papanicolau i tempi sono notevolmente ridotti, ma ciò dipende principalmente dal fatto che le cellule sono in monostrato e isolate).

2) Eosina

Si usa la seguente composizione:

Eosina G (Gialla)	1 g
Acqua distillata	100 ml

Questa “soluzione madre” all'1% viene diluita al momento dell'uso in acqua distillata (1/2, 1/3 o 1/4, secondo le finalità dell'esame).

È da tenere presente che, analogamente a quanto accade per altre colorazioni, ci sono due metodi alternativi da usare per la colorazione con Eosina:

a) *colorazione progressiva:*

soluzione madre diluita in ragione di 10-20 ml in 50 ml di acqua distillata, lasciata agire per 12-24 ore.

Dà immagini ricche di particolari strutture: decisamente il metodo consigliato per i principianti che vogliono imparare l'istologia e la citologia.

b) *colorazione regressiva:*

si ipercolora con una soluzione concentrata (soluzione madre all'1% diluita 1/3 in acqua distillata) per 10-15 minuti e, poiché la colorazione è molto intensa, occorre "differenziare" in acqua acidulata (acqua distillata contenente 0,5 – 1 ml di acido acetico glaciale).

È, ovviamente, un metodo molto più rapido e pertanto è usato spesso nei laboratori, ma ai principianti consiglio il metodo progressivo, anche perché la differenziazione in acqua acidulata richiede una certa pratica per non decolorare troppo.

Certamente, esistono molte altre "ricette" per questa come per altre colorazioni: si possono consultare i testi citati in bibliografia.

DISIDRATANTI

Tabella di diluizione degli alcoli

Questa tabella indica come diluire l'alcole etilico a 95° con acqua per portarlo alla gradazione richiesta.

Basta mettere in un recipiente tarato (es.: pallone tarato) la quantità di alcole a 95° indicata per la gradazione richiesta e aggiungervi acqua distillata arrivando al volume totale (acqua + alcole) di 1 litro.

Grado alcolico desiderato	ml di Alcol 95° da portare a 1 litro con acqua distillata
50	510
70	720
80	830

PROTOCOLLO DI COLORAZIONE (EMATOSSILINA - EOSINA)

Si considerano “pezzi” di spessore di 3-4 mm

- 1) Fissazione in Bouin (o analogo) per 12-48 ore.
- 2) Lavaggio in Alcole etilico a 80° (se si usa il Bouin), cambiando il liquido più volte, finché il pezzo non cede più colore
- 2 *bis*) Se si usa la Formalina salata di Policard, lavare in acqua corrente per 30 minuti, quindi passare il pezzo in alcole etilico a 50° per 60 minuti (30+30 minuti), poi in alcole etilico a 70° per 240 minuti (120+120 minuti) [può essere lasciato in questo alcole anche per molte ore, per fini conservativi]. Quindi, passare in alcole etilico a 80°, come per il Bouin.
- 3) Alcole 80° 6-8 ore (due bagni da 3-4 ore ciascuno)
- 4) Alcole 95° 6-9 ore (tre bagni da 2-3 ore ciascuno)
- 5) Alcole 100° 6-9 ore (tre bagni da 2-3 ore ciascuno)
- 6) Alcole 100° + Xilene 2-3 ore
- 7) Xilene 6-9 ore (tre bagni da 2-3 ore ciascuno)
- 8) Paraffina 9-12 ore (tre bagni da 3-4 ore ciascuno)

- 9) Taglio

- 10) Distensione delle fette sul portaoggetti (su cui, eventualmente, sarà stata posta una goccia di Albumina glicerinata di Mayer).
- 11) Essiccamento delle fette per almeno 6 ore (in termostato a 37-40°C; un soggiorno più lungo permetterà una migliore adesione delle fette).

La Sparaffinatura; si effettua in:

- 12) Xilene 2-3 minuti (tre bagni da circa 1 minuto ciascuno)
- 13) Alcole 100°+Xilene 1 minuto
- 14) Alcole 100° 3 minuti (tre bagni da 1 minuto ciascuno)
- 15) Alcole 95° 3 minuti (tre bagni da 1 minuto ciascuno)
- 16) Alcole 80° 2 minuti (due bagni da 1 minuto ciascuno)
- 17) Alcole 70° 2 minuti (due bagni da 1 minuto ciascuno)
- 18) Alcole 50° 2 minuti (due bagni da 1 minuto ciascuno)
- 19) Acqua distillata 5 minuti.

- 20) Colorazione (secondo il metodo scelto; nel caso si opti per il metodo all'Ematossilina- Eosina, quello più comune, vedi sopra le istruzioni per i singoli coloranti).

Al termine della colorazione:

- 21) Acqua distillata 2 minuti (oppure, se è stata usata la colorazione regressiva, passare direttamente al punto 23)
- 22) Alcole etilico 50° 15 secondi (un solo bagno)
- 23) Alcole etilico 70° 15 secondi (un solo bagno)
- 24) Alcole etilico 80° 15 secondi (un solo bagno)
- 25) Alcole etilico 95° 30 secondi (tre bagni da 10 secondi ciascuno)
- 26) Alcole etilico 100° 90 secondi (tre bagni da 30 secondi ciascuno)
- 27) Alcole 100° + Xilene 20 secondi
- 28) Xilene 90 secondi (tre bagni da 30 secondi ciascuno)

- 29) Montaggio in Balsamo (o altro, come descritto precedentemente).
- 30) Essiccamento per varie ore, come descritto precedentemente.

- 31)BUONE OSSERVAZIONI!!!!

CAPITOLO II

L'ALLESTIMENTO DEI PREPARATI EMATOLOGICI

INTRODUZIONE

Nel Capitolo I, ho trattato dell'allestimento dei preparati istologici permanenti. Immagino le difficoltà - da parte dei dilettanti principianti di microscopia - di procurarsi reperti animali o umani (per i vegetali, ovviamente, i problemi non esistono) da trattare ed esaminare.

Poiché nel nostro organismo c'è un tessuto facile da reperire, un "tessuto circolante", il **sangue**, desidero "farmi vicino" ai novizi con qualche suggerimento atto a rendere loro semplice e soddisfacente la preparazione e la visione/studio.

Sì, ho scritto "studio", perché tutto ciò che è fonte di apprendimento e di sapere, sia motivato dalla professionalità o dalla semplice passione o curiosità, a mio avviso deve essere considerato "studio", con le fatiche connesse sia nell'apprendimento, sia nella memorizzazione.

Ovviamente, chi fosse interessato ad approfondimenti un po' più "seri" è pregato di documentarsi sia con l'uso della bibliografia essenziale che ho posto in fondo a questo mio lavoro, sia consultando Internet o altre fonti bibliografiche.

Tengo comunque a precisare che le tecniche che descriverò sono quelle che anche io uso e che sono routinarie (accanto a metodiche ben più sofisticate, ovviamente) nei laboratori di analisi.

Per approvvigionarsi del sangue necessario, non occorre assolutamente fare uso di siringhe: è meglio (per varie ragioni, non ultime la sicurezza e l'igiene) adoperare "sangue periferico" intendendo con questa locuzione indicare quello prelevato da un dito, tramite una semplice puntura con un ago sterilizzato alla fiamma e lasciato raffreddare all'aria (oppure con uno degli appositi "pungidito" munito di "lancette" sterili monouso, reperibili in farmacia e usati per l'autodeterminazione della glicemia).

E, se qualcuno teme il dolore o, peggio, anche la semplice “vista” del sangue... beh! Si faccia assistere da qualcuno più esperto oppure... lasci perdere!

E... nessuno vada in giro a “vampirizzare” altri (fidanzate, mogli, mariti, ecc.): oltre ad essere illegale, tale manovra potrebbe comportare “alterazioni” dell'*ecosistema affettivo* familiare e, in caso di reazioni “violente” da parte dei “vampirizzandi”, anche qualche “caduta accidentale” del microscopio o qualche... “sfratto immediatamente esecutivo” delle attrezzature!

Ma veniamo al dunque: innanzitutto...

UN PO' DI STORIA

Sembra che **Andral** – nel 1843 – sia stato il primo a utilizzare sistematicamente il metodo degli strisci per lo studio delle cellule ematiche. Egli otteneva tali strisci soffiando dell'aria su una goccia di sangue deposta su una lamina di vetro (antesignana dei moderni “portaoggetti”).

La tecnica di Andral è stata progressivamente perfezionata e, infine, **Norris** – nel 1882 – ha proposto quella che è la tecnica attuale.

Il termine “striscio” (in tedesco “Ausstrich”) è stato adottato da **Ehrlich** (e dalla sua scuola) a partire dal 1879.

Inoltre, Ehrlich – ancora studente – nel 1877 ebbe l'idea di far agire – sui tessuti istologici e sul sangue – i “coloranti” che all'epoca venivano usati in Germania nell'industria delle stoffe; egli cominciò a suddividere queste sostanze cromogene in “acide”, “basiche” e “neutre” e constatò che esse si legavano – più o meno selettivamente – a strutture cellulari diverse (nucleo, citoplasma, ecc.).

Inizialmente Ehrlich colorava gli strisci servendosi di una sola sostanza cromogena, ma in seguito introdusse l'uso di “miscele” che coloravano contemporaneamente (e in modo diverso) le varie componenti cellulari, comprese le granulazioni.

I coloranti usati allora erano per lo più derivati dell'anilina: ebbene, Ehrlich notò che i vari “blu” di anilina coloravano le granulazioni di alcune cellule non in azzurro (come ci si aspettava), ma in rosso mattone! Scoprì in tal modo quel fenomeno che si chiama *metacromasia*.

I **coloranti composti** permisero, dunque, la distinzione dei leucociti e la loro classificazione in **granulociti** (*neutrofili*, *basofili* ed *eosinofili*) e **cellule prive di granulazioni** (*linfociti*, *monociti*).

Questa classificazione ha originato, dunque, la cosiddetta **formula leucocitaria**.

Nel 1891 **Romanowky** (al quale molti ematologi attribuiscono – indebitamente – la paternità dei coloranti usati per la preparazione degli strisci) e **Malakowsky** descrissero (indipendentemente) una particolare miscela di **blu di metilene** e di **eosina** che

rendeva ben visibili i nuclei dei parassiti del sangue, in particolare del *Plasmodium vivax*, l'agente eziologico della **malaria**, inoculato – come ben si sa – dalla zanzara del genere *Anopheles*.

Occorre precisare che i colori, particolarmente vivi, soprattutto il rosso acceso, sono dovuti non ai cromogeni in sé, ma all'alterazione del blu di metilene: questa sostanza, con il passare del tempo, acquisisce la proprietà di combinarsi con l'eosina, formando in tal modo l'*eosinato di blu di metilene* chiamato anche **Azur**.

Nel 1901 **Leishmann** (lo scopritore della Leishmaniosi, dovuta a parassiti appartenenti al genere *Leishmania* trasmessi dagli insetti appartenenti al genere *Phlebotomus*) ebbe l'intuizione di sciogliere i coloranti in alcole metilico invece che in acqua (come era stato fatto fino ad allora).

Nel 1902 due scienziati, **May** e **Grünwald**, prepararono la miscela che porta il loro nome: essa *non colora* i nuclei delle cellule, ma *evidenzia* – con cromaticità differenti – le diverse granulazioni.

La spiegazione delle modalità di azione dei composti di Azur si deve a **Giemsa** il quale, negli anni 1901 e 1904, ha introdotto in commercio miscele di coloranti particolarmente stabili e di facile uso, tra cui la composizione che porta il suo nome. La cosiddetta colorazione di **May-Grünwald - Giemsa**, che si avvale – come vedremo – in fasi successive delle due miscele di coloranti, deve la sua genesi a Pappenheim il quale – nel 1912 – propose quella che egli chiamò *colorazione panottica universale* ottenuta appunto dall'unione dei due coloranti di cui sopra. Ancor oggi questa colorazione è quella maggiormente usata e non solo in campo ematologico.

Wright, allievo di Leishmann, propose l'omonima miscela che *colora in blu* – invece che in rosso – le granulazioni azzurrofile: i colori ottenuti con questa miscela si presentano più sbiaditi di quelli ottenuti con il May-Grünwald - Giemsa.

Nei decenni seguenti sono state proposte (e adottate) molte tecniche citochimiche tra le quali le reazioni: di **Perls**, alla **benzidina**, delle **perossidasi**, della **fosfatasi alcalina**, delle **esterasi**, del **lisozima**, di **Feulgen**, del **verde di metile-pironina**, al **nero Sudan**, del **PAS**, ecc.

In questi APPUNTI mi limiterò a descrivere la tecnica di esecuzione degli strisci e la colorazione di May-Grünwald-Giemsa.

ESECUZIONE DELLO STRISCIO

È un'operazione di fondamentale importanza, perché nessuna colorazione potrà sopperire a un eccessivo addensamento o a una rarefazione o a una deformazione degli elementi cellulari.

Per eseguire bene questa operazione, mi è stato suggerito (e mi sento di consigliare) di usare un portaoggetti di 1-2 mm più stretto di quello su cui verrà strisciata la goccia di sangue.

La *ratio* di tale scelta risiede nel fatto che spesso, per andare a “leggere” lo striscio nei suoi bordi (vedremo più avanti l'importanza di ciò), si va ad urtare con la lente frontale dell'obiettivo su qualche parte del dispositivo *traslatore* del microscopio, oltre alla concreta possibilità che la goccia, durante l'operazione di striscio, possa debordare dal portaoggetti, perdendo in tal modo elementi cellulari importanti.

Si trovano comunemente in commercio vetrini 24x32 mm (standard) di vario spessore (da 1 a 1,5 mm), ma – soprattutto nelle confezioni per “microscopi-giocattolo – si trovano anche dimensioni più piccole. Consiglio di usare – in ogni caso – il tipo con i bordi “molati”, per evitare, soprattutto se si è alle prime armi, ferite accidentali.

Qualora non si potesse reperire un portaoggetti di lato inferiore a 24 mm, si può usare (con molta attenzione, data la fragilità) un coprioggetti.

Tecnica di esecuzione

Si pone una piccola goccia di sangue a circa 1 cm di distanza da uno dei bordi più stretti di un portaoggetti **ben pulito e sgrassato** con alcol (vedi foto qui sotto).

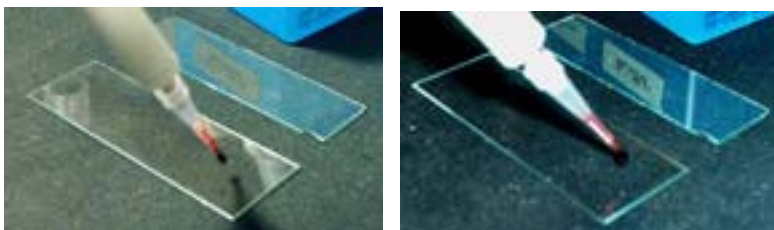


Fig. 8 Deposizione di una goccia di sangue sul portaoggetti [da sin., (a) e (b)]. Nel caso particolare, è stata usata una micropipetta da 10 μ l.

Rapidamente (per evitare assolutamente l'essiccamento) si pone *davanti* a questa goccia, dalla parte “libera” di area maggiore del portaoggetti, il secondo vetrino (che chiamerò, per evitare fraintendimenti, “*strisciatore*”), in posizione inclinata di circa 30 gradi rispetto al portaoggetti di supporto (fig. 9 a).



Fig. 9, (a), (b), (c): Esecuzione di uno striscio ematologico

Si arretra il vetrino *strisciatore* fino a che il suo bordo tocchi la goccia di sangue che immediatamente, per capillarità, vi si distenderà (fig.9 b). Immediatamente, con mossa sufficientemente *rapida e uniforme* (fig. 9 c), si sposterà lo *strisciatore* verso

l'estremità libera del portaoggetti (fino a raggiungerla), mantenendo assolutamente costanti il contatto tra i due vetrini e l'angolo di incidenza.

Lo striscio ottenuto in questo modo sarà sottile, regolare, con bordi pressoché rettilinei (se fossero ondulati, la causa andrebbe ricercata in movimenti errati – sia pure involontari - della mano che muove il vetrino *strisciato*), che termina con una estremità arrotondata.

Se la *velocità di esecuzione* è lenta, lo striscio risulterà più *sottile*, mentre si presenterà più *spesso* in caso di velocità elevata: solo l'esperienza può insegnare la velocità giusta!

Analogamente, *l'inclinazione eccessiva* (sotto i 30 gradi) dello strisciato produrrà – a pari velocità di esecuzione – uno striscio di *spessore maggiore* e viceversa.

La *distanza dei bordi dello striscio da quelli del portaoggetti* è necessaria, come abbiamo già visto sopra, data l'importanza dell'esame di tali zone dello striscio. Infatti, le cellule ematiche non si dispongono uniformemente, ma – per principi fisici quali la viscosità del sangue, le dimensioni e il peso specifico cellulare, ecc. – troveremo al centro dello striscio gli eritrociti più piccoli (più o meno ravvicinati) e i piccoli linfociti, mentre gli eritrociti di dimensioni maggiori, i granulociti, i grossi linfociti e gli elementi più voluminosi si dispongono lungo i bordi e nelle frange.

Per inciso, ricordo che in ematologia non si eseguono solo strisci di sangue, ma anche di midollo e di altri organi emopoietici.

Essiccamento dello striscio

È un'operazione a cui soprattutto il principiante non dà il giusto peso.

È importante che venga eseguita all'aria, il più velocemente possibile per evitare di alterare la morfologia soprattutto degli eritrociti.

Ciò si ottiene agitando all'aria il vetrino con lo striscio appena eseguito, oppure scaldandolo sotto una lampada ad incandescenza da 40 watt (accesa, ovviamente!), in modo da fargli raggiungere rapidamente una temperatura di circa 40 °C (non eccedere: non stiamo preparando il “sanguinaccio”!!!).

Esistono anche altre tecniche per l'esecuzione degli strisci, come quella dei due vetrini coprioggetti giustapposti: rinvio alla letteratura citata in bibliografia, in particolare all'opera di BESSIS, coloro che desiderassero approfondire l'argomento.

ALLESTIMENTO DEI PREPARATI PERMANENTI

Fissazione

È indispensabile per evitare che anche una minima traccia di umidità possa alterare i leucociti ed emolizzare gli eritrociti, benché strisci *molto vecchi* o *essiccati sotto vuoto* siano praticamente *fissati*.

Come fissativo si può usare **metanolo** (*alcole metilico*) **assoluto** (TOSSICO!!!), versandolo sullo striscio e lasciandolo agire per 3 minuti. Questo passaggio è superfluo se si usa il **colorante di May-Grünwald**, perché esso contiene metanolo.

Colorazione di MAY-GRÜNWARD – GIEMSA

- 1) Si pone il vetrino su un piano, con la faccia contenente lo striscio verso l'alto. Per evitare spandimenti di colorante, conviene usare una vaschetta (di vetro o di plastica) su cui appoggeremo due supporti (vanno bene anche i legni per spiedini) sui quali poggeremo il nostro vetrino: in tal modo, l'eccesso di colorante scolerà nella vaschetta evitando... *coloriture* di altro genere nel linguaggio che ci verrà rivolto da mogli, mamme e affini per aver imbrattato acquai, mobili, ecc.).



Fig. 10: Posizionamento del vetrino portaoggetti sul supporto di vetro posto sopra la vaschetta per colorazione.
Si noti lo striscio, posto sulla superficie superiore del vetrino, in modo da poter essere ricoperto dal colorante.

- 2) Sul vetrino, così preparato e disposto, si versa il **colorante di May-Grünwald** fino a ricoprire interamente lo striscio (servirsi di un contagocce e contare le gocce: il calcolo ci servirà dopo).
- 3) Lasciar agire per 3 minuti (il colorante non colora, perché i cromogeni sono disciolti in metanolo e, dunque, non sono ancora allo stato ionizzato).
- 4) Trascorso tale tempo, versare sul preparato, con un contagocce, tante gocce di acqua distillata quante sono state le gocce di **colorante di May-Grünwald** usate nel passaggio precedente e, soffiando leggermente attraverso un tubicino (una *pipetta Pasteur* o simili), mescolare l'acqua e il colorante.

Attenzione: per l'uso dell'acqua distillata, vedere l'apposita nota più avanti.

- 5) Lasciare che i coloranti – ormai ionizzati in acqua – compiano il loro mestiere per 3 minuti (tempi minori esaltano le granulazioni eosinofile... ma occorre pratica!).
- 6) Versare via il colorante, senza sciacquare.
- 7) Ricoprire lo striscio con il **colorante di Giemsa** diluito 1:10 in acqua distillata (vedi l'apposita nota).



Fig. 11: Il portaoggetti posto sui supporti nella vaschetta per la colorazione di Giemsa. Lo striscio, già colorato con il May-Grünwald, è posto sul lato inferiore del vetrino, in modo che, quando la vaschetta verrà riempita con il colorante, questo non possa lasciare depositi sul preparato.

- 8) Lasciare agire per 20 – 30 minuti (la pratica suggerirà il tempo ottimale che varia in base alla fabbricazione del colorante, alla temperatura ambiente, ecc.).
- 9) Terminata la colorazione, sciacquare il vetrino immergendolo in una vaschetta con acqua corrente (getto sottile, per evitare il distacco delle cellule) per alcuni minuti (la pratica e gli errori di colorazione suggeriranno i tempi migliori).
- 10) Lasciare asciugare completamente in posizione verticale (o quasi!) all'aria.

Montaggio in balsamo (o No?)

Normalmente gli strisci ematologici vengono esaminati con l'obiettivo ad immersione in olio: il vetrino coprioggetti e il relativo montaggio in Balsamo del Canada *sarebbero* superflui.

Anzi, Marcel BESSIS (vedi bibliografia) afferma che non solo è inutile ricoprire gli strisci con il coprioggetti, ma addirittura errato ritenere che gli strisci si conservino meglio se ricoperti.

Si potrebbe ritenere più facile allontanare l'olio da immersione da un coprioggetti che non da uno striscio (che si rovinerebbe se strofinato con una pezzuola imbevuta di solvente): in realtà, basta immergere – dopo l'uso – il vetrino direttamente in un bagno di xilene e lasciarvelo per 2-3 minuti, dopodiché lo si fa asciugare all'aria ed... è come nuovo!

Strisci non ricoperti che risalgono ai miei anni di liceo (1966 e dintorni) fanno parte della mia raccolta e posso assicurare che si conservano meravigliosamente, basta usare un po' di cautela nel maneggiarli (evitare, ad esempio, di urtare lo striscio con la lente frontale dell'obiettivo a immersione...).

Tuttavia, poiché è buona norma iniziare qualsiasi osservazione a basso ingrandimento e poiché la maggior parte degli obiettivi dai 25x ai 40x "esigono" la presenza del coprioggetti, pena la perdita di contrasto e l'introduzione di aberrazioni anche notevoli, ... è giocoforza ricoprire gli strisci, a meno di disporre di obiettivi calcolati proprio per fare a meno del coprioggetti (vedansi in proposito le mie note sull'allestimento dei preparati istologici).

Ovviamente, se si decide di ricoprire gli strisci, non si potranno usare i coprioggetti "standard" da 24x32 mm, ma si dovrà ricorrere ai 24x50 o anche ai 24x60 mm, entrambi di facile reperibilità in commercio.

OSSERVAZIONE DEI PREPARATI

Do per scontato che anche il dilettante principiante conosca la classificazione, la morfologia e i caratteri tintoriali delle cellule ematiche: in caso contrario, prima di mettere l'occhio all'oculare, è opportuno consultare un buon testo-atlante di ematologia (vedi bibliografia).

Effetti dopo la colorazione di May-Grünwald – Giemsa

- 1) *Nuclei*: si colorano in rosso-violetto o in rosa, a seconda del tipo di cromatina.
- 2) *Citoplasm*i:
 - a) *basofili*: assumono colorazione variabile dal celeste al blu scuro;
 - b) *acidofili*: si colorano in rosa.
- 3) *Granuli*:
 - a) *Neutrofili*: si presentano nei colori beige e rosato a causa del miscuglio delle granulazioni;
 - b) *Eosinofili* (o *acidofili*): si colorano in arancione;
 - c) *Basofili*: assumono colore violetto scuro a causa della metacromasia;
 - d) *Azzurrofili*: si colorano in porpora o in violetto-porpora.
- 4) *Granulazioni basofile degli eritrociti*: del tutto eccezionali nell'adulto (in condizioni fisiologiche) ma non rare nell'embrione e nel lattante, si presentano di colore azzurro cobalto.

A proposito di tali granulazioni, ritengo utile precisare che esse si riscontrano nell'anemia da intossicazione da piombo (il cosiddetto *saturnismo*) e che tale

reperto ha valore medico-legale; tuttavia, esse sono presenti anche in molte altre anemie tossiche o comunque gravi.

5) *Mitocondri e Centrioli*: non sono visibili con questa colorazione (è bene ricordarlo per non prendere abbagli!).

6) *Eritrociti (normali)*: quelli esaminati al centro di uno striscio ben eseguito (vedi paragrafo sugli artefatti) si presentano isolati gli uni dagli altri, rotondeggianti, a forma biconcava, del diametro di circa 8 micrometri (micron, se si preferisce la vecchia dicitura), di colore rosa più marcato nella parte esterna (a mo' di anello nuziale) e sfumante via via verso il centro che appare pallido. Come è noto, ciò è dovuto alla perdita del nucleo (che non ha alcuna funzione riproduttiva o di sintesi proteica nell'eritrocito maturo) da parte di queste cellule che hanno esclusivamente funzioni di trasporto dell'ossigeno e una vita media di 120 giorni dalla loro immissione nel circolo sanguigno.

Artefatti

Possono essere dovuti a varie cause.

1) La presenza di eritrociti nei quali il colore rosa invece che sfumare verso il centro vi si distingue con una linea netta, talvolta irregolare, che conferisce alla cellula una forma particolare a figura geometrica "toroide" (da cui il nome *torociti* dato ai globuli rossi con questa morfologia) è ascrivibile – in genere – a un essiccamento eccessivamente lento dello striscio appena eseguito.

2) Il colore "globalmente" assunto dallo striscio dovrebbe essere rosa-bluastro:

- se esso è **troppo blu**, ciò può dipendere da:

- uno spessore eccessivo dello striscio;
- un lavaggio insufficiente a seguito della colorazione con il Giemsa;
- una colorazione troppo prolungata con il Giemsa;
- uso di Acqua distillata troppo alcalina (vedi nota in proposito).

In tal caso:

- . gli eritrociti appariranno di colore blu o verde;
- . il citoplasma dei linfociti si presenterà grigio o color lavanda;
- . i granuli dei neutrofili appariranno voluminosi e scuri;
- . i granuli degli eosinofili appariranno grigi o blu.

· se esso è **troppo rosso**, ciò può dipendere da:

- uno spessore troppo esiguo dello striscio;

- un lavaggio eccessivamente prolungato dopo il Giemsa;
- uso di un colorante eccessivamente acido;
- uso di acqua distillata troppo acida (vedi nota in proposito).

In tal caso:

- . la cromatina nucleare apparirà di colore rosso anziché violaceo;
- . gli eritrociti si presenteranno di colore rosso o arancione, anziché rosa;
- . i granuli eosinofili assumeranno un colore rosso brillante.

Ovviamente, per poter giudicare la bontà dell'esecuzione e della colorazione di uno striscio occorrerà far riferimento a elementi cellulari di morfologia e cromatismo perfettamente noti: in genere, a tal fine si "usano" gli eritrociti.

A vantaggio di principianti, riassumo qui i principali *dati morfometrici* degli *eritrociti normali in circolo*:

- **forma:** disco biconcavo (da cui il nome, talvolta usato, di **discocito**);
- **diametro:** 8 micrometri (per i "precisini" fanatici del Sistema Internazionale: 8×10^{-6} m; per i "nostalgici": μ "micron");
- **spessore al bordo:** 2,5 micrometri;
- **spessore al centro:** 1 micrometro;
- **superficie:** 1,60 micrometri quadrati (μ^2);
- **volume:** 90 micrometri cubici (μ^3).

Tali valori debbono intendersi affetti da una *variabilità* del ± 5 % circa.

3) Deformazioni notevoli degli eritrociti sono presenti nella parte iniziale, lungo i bordi e nelle sfrangiature dello striscio: tali forme anomale, dovute agli effetti meccanici della strisciatura, debbono essere ben conosciute dall'osservatore, per non incorrere in madornali errori diagnostici. Si consulti un buon testo-atlante (vedi, ad esempio, in bibliografia).

Tra gli artefatti possibili, va annoverata la presenza di **echinociti** (eritrociti dotati di spicole). Essi si repertano nella maggior parte degli strisci mal eseguiti, ma anche – sia pure sporadicamente – negli strisci eseguiti a regola d'arte.

La motivazione che più facilmente potrebbe essere addotta è la disidratazione della goccia di sangue in fase di fissazione: ma non è così.

La causa sembra, invece, doversi ricercare nel cosiddetto "effetto vetro" (infatti non si presenta se si usano vetrini in plastica) dovuto alla diffusione, nello striscio umido, di sostanze alcaline liberate dalla superficie del vetro per "aggressione chimica" da parte di alcuni componenti del sangue.

La comparsa di echinociti in sangue conservato (bastano 24 ore a +30 °C o circa tre settimane in frigo a +4 °C) è dovuta, invece, alla diminuzione dell'ATP (adenosin-trifosfato) intracellulare e alla comparsa di **lisolecitina** nel plasma (per il principiante, rammento sommariamente che il **plasma** è la parte non corpuscolata che si separa nel sangue reso incoagulabile con opportune sostanze quali l'eparina, il citrato di Sodio, l'EDTA – acido Etilen-Diamino Tetracetico, ecc. Il **siero**, invece, è quella parte liquida, contenente proteine ed altro, che si separa dalla parte corpuscolata dopo coagulazione del sangue intero).

Anche il plasma conservato diviene echinogeno: ciò va tenuto presente nella diagnostica.

Se il sangue viene scaldato per 30 minuti a +56 °C, viene distrutta la **lecitin-colesterol-acil-transferasi**, enzima che presiede alla formazione della lisolecitina: in tal modo viene bloccata l'echinocitogenesi.

(Per ulteriori dettagli, vedi: M. BESSIS, opera citata in bibliografia).

ALLESTIMENTO DEI PREPARATI PER L'OSSERVAZIONE *IN VIVO*

CONTRASTO DI FASE

Questa metodica, di cui anche molti microscopisti dilettanti hanno dotato il proprio strumento, fu inventata dal fisico Fritz **Zernicke** del 1932, e valsero all'autore il premio Nobel per la Fisica nel 1953.

Si tratta di un dispositivo ottico che, applicato ad un microscopio in luce trasmessa, aumenta il contrasto nell'immagine generata dall'oggetto. Questa tecnica è molto utile nell'osservazione di oggetti molto trasparenti (ad esempio, cellule o microrganismi) qualora si vogliano seguire le loro attività vitali.

Non entro del dettaglio della metodica: ricordo solo che esiste un contrasto di fase "positivo" (che permette di vedere, più scuro del fondo, un oggetto più rifrangente del mezzo circostante) e un contrasto di fase "negativo" (che, invece, mostra più chiari del fondo gli oggetti più rifrangenti).

Per ulteriori, abbondanti approfondimenti, rinvio all'esauriva opera del prof. Giovanni Pietro SINI, reperibile nel sito: http://www.funsci.com/fun3_it/sini/mo/alone.pdf.

Ricordo solo che, in genere, gli obiettivi per contrasto di fase presentano lo stesso potere risolutivo di quelli per luce trasmessa, sia che vengano usati in contrasto di fase, sia che vengano usati con il classico condensatore in campo chiaro e con luce trasmessa. Si ha, per la verità, un leggero calo del contrasto dell'immagine, se vengono usati in campo chiaro con preparati colorati: tale diminuzione, peraltro, in genere si nota solo nell'uso di obiettivi dotati di ingrandimenti molto forti.

La microscopia in contrasto di fase permette di visualizzare nettamente la cromatina, i mitocondri, il centrosoma, le granulazioni, talvolta in modo ancora più nitido rispetto ai preparati colorati.

Inoltre tale metodica, consentendo di osservare le cellule *in vivo*, permette di visualizzare sia i movimenti cellulari sia quelli intracellulari.

Insomma, specialmente se abbinato all'uso di una videocamera, il contrasto di fase apre anche al dilettante un vasto campo di indagine.

Provare per credere!

CONTRASTO D'INTERFERENZA

Questa metodica, conosciuta anche con la sigla **DIC** (*Differential Interference Contrast*) e inventata da Georges **Nomarski** negli anni intorno al 1950 nel tentativo di migliorare – sopprimendone gli aloni tipici – il contrasto di fase secondo Zernicke, si basa sull'interferenza di due raggi luminosi polarizzati perpendicolarmente tra di loro.

Anche per i dettagli di questa metodica rinvio all'opera di Giovanni Pietro SINI presso il sito: http://www.funsci.com/fun3_it/sini/mo/alone.pdf e alla pubblicazione della ZEISS citata in bibliografia.

Oggi, questa metodica – benché costosa – è alla portata di non pochi microscopisti dilettanti, grazie anche alla possibilità di reperire in abbondanza (anche via Internet) materiale usato.

La microscopia a contrasto interferenziale, poi, rendendo possibile la *misura della densità ottica* delle strutture biologiche, consente di determinarne lo *spessore* e, dunque, il *peso secco*: dati interessanti per la ricerca.

Ricordo che le immagini ricavate con tale metodica presentano un particolare, caratteristico *effetto di rilievo*, simile a quello ottenibile con la tecnica dell'**ombreggiatura** (*shadowing*) prodotta mediante **metallizzazione obliqua**.

Tuttavia, questo effetto ombreggiatura fa apparire organuli, contenuti all'interno delle cellule, come se invece fossero dislocati sulla loro superficie o addirittura come se fossero depressioni o invaginazioni superficiali.

Occorrerà, dunque, prestare attenzione a non prendere abbagli nel riconoscimento delle strutture.

Il grande vantaggio del DIC, rispetto ad contrasto di fase, è l'assenza dei caratteristici aloni pericellulari o che comunque circondano gli organuli interni cellulari: gli eritrociti e le granulazioni presentano, dunque, contorni molto nitidi.

Inoltre, i cristalli intraglobulari (ad esempio, quelli di emoglobina) che in contrasto di fase mostrano immagini poco nitide, vengono evidenziati nettamente.

Con questa metodica, dunque, anche i dilettanti che ne sono muniti potranno sbizzarrirsi e formarsi una solida esperienza.

In Internet sono presenti, poi, *mailing list* e *forum* (tra quelli in lingua italiana, mi permetto di citare: microcosmo_italia@yahoo.it) nei quali microscopisti, dilettanti e non, mettono a disposizione la loro esperienza anche nell'uso di queste metodiche.

Mi si permetta, ora, una breve precisazione: sia per il contrasto di fase, sia per il DIC, occorre rispettare alcune norme e precauzioni nella preparazione del campione: rimando ai testi indicati in bibliografia.

Inoltre, occorre ricordare che, ad esempio, i leucociti – essendo sferici – sono in genere circondati da un grosso alone e non lasciano trasparire alcun dettaglio interno, a meno di applicare una adeguata compressione dei vetrini, in modo da allontanare le cellule tra di loro e ridurre lo spessore.

Ricordo che, in genere, non si ottiene alcun vantaggio nell'applicare il contrasto di fase a preparati colorati, a meno che non si tratti di strisci molto sottili e ipocromici. Al contrario, DIC e contrasto di fase possono essere vantaggiosamente usati in unione con i metodi citochimici (Feulgen, PAS, ecc.) che in genere presentano colori piuttosto tenui.

NOTA

SULL'USO DELL'ACQUA DISTILLATA NELLE COLORAZIONI

L'acqua distillata, qualora veramente “pura” (*resistenza* compresa tra 15 e 18 M Ω e *conducibilità* compresa tra 0,067 e 0,05 μ S) dovrebbe avere pH 7, cioè **neutro**.

In realtà, quest'acqua, tecnicamente definita “ultrapura” e ottenuta per scambio ionico su opportune resine (e usata solo in gascromatografia, spettrometria di massa e poche altre metodiche), è tale solo al momento della produzione. Appena entra in contatto con l'aria dell'ambiente circostante, si comporta letteralmente come una spugna assorbendo, in particolare, l'anidride carbonica e formando, così, tracce di acido carbonico. Ecco che il pH diviene leggermente acido.

Per l'acqua deionizzata o distillata “ordinaria”, quella reperibile in commercio, la reazione è senz'altro lievemente acida, attestandosi attorno a pH 6,5 o anche inferiore.

Tale leggera acidità, potendo interferire sulla resa cromatica delle colorazioni, **rende necessario** (soprattutto ai fini della ripetitività e della precisione delle analisi) l'uso di **soluzioni tampone**, “sistemi chimici” in grado di mantenere costante il pH iniziale. In Biochimica si usa molto il **Tampone Fosfati**, che, comunque, è di facile reperibilità - già pronto o in fiale da “ricostituire” con acqua distillata - in commercio.

REAGENTI

Tampone Fosfati

Ne esiste più di una variante, ma la formulazione “classica” è la seguente:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (0,1 M).

Per chi non si intendesse di chimica: **0,1 molare**, cioè che contiene **0,1 moli** in 1000 millilitri *di soluzione*: la **mole** è la *quantità in grammi di una sostanza, pari al suo peso molecolare*).

ATTENZIONE: per preparare una “soluzione titolata” occorre pesare la quantità di sostanza da disciogliere, porla in un pallone “tarato” e **portare al volume** desiderato con acqua (**non** aggiungere la quantità finale di acqua!).

Poiché esistono varie “preparazioni” di Fosfato di Sodio, contenenti più o meno H_2O (come acqua di cristallizzazione), ecco i pesi molecolari (**m.w., molecular weight**) dei prodotti reperibili in commercio:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - m.w.: 178,05; la soluzione 0,2 M ne contiene 35,61 g che dovranno essere sciolti in H_2O (distillata), portando al volume finale di 1000 ml;
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - m.w.: 358,22; la soluzione 0,2 M ne contiene 71,64 g;
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - m.w.: 156,03; la soluzione 0,2 M ne contiene 27,6 g;
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - m.w.: 138,0; la soluzione 0,2 M ne contiene 31,21 g.

Si possono ottenere diversi valori di pH, a seconda delle quantità delle soluzioni dei due Sali che si mescolano tra loro; poiché a noi interessa il pH 7,0, mi limito a fornire solo il dosaggio relativo:

soluzione 0,2 M di Na_2HPO_4 61,0 ml

soluzione 0,2 M di NaH_2PO_4 39,0 ml

mescolare e portare a 200 ml con H_2O (distillata).

Misurare il pH con un pH-metro elettronico (ne esistono di “portatili” il cui costo è di circa 50 euro) ed eventualmente “aggiustare” il valore a pH 7,0 aggiungendo – goccia a goccia – **HCl** (0,01 M) o **NaOH** (0,01 M), secondo necessità.

Poiché la preparazione del tampone non è proprio semplicissima, per un principiante, conviene acquistarlo già pronto presso le Ditte di prodotti chimici.



Fig. 12: pH-metro portatile



Fig. 13: pH-metro da laboratorio



Fig. 14: conduttimetro per acqua distillata



Fig. 15: conduttimetro per acqua ultrapura



Fig. 16 (a sinistra): cartine universali indicatrici di pH (range: 0-14)

COLORANTI

Il May-Grünwald e il Giemsa si trovano in commercio già pronti: non conviene assolutamente prepararsi da soli, sia per motivi economici, sia perché il metanolo, in cui vanno disciolti i vari componenti, non è di libera vendita, ma è soggetto a una apposita Licenza dell'UTIF (UFFICIO TECNICO IMPOSTE DI FABBRICAZIONE). Ciò premesso, ne ometto la composizione.

CAPITOLO III

L'ALLESTIMENTO DEI PREPARATI MICROBIOLOGICI

INTRODUZIONE

Il microscopista dilettante ha spesso difficoltà nel reperire materiale per le sue osservazioni. Voglio, pertanto, fornire qualche semplice suggerimento per esplorare un mondo assai ricco di materiale, quello microbiologico, i cui appartenenti ci circondano, ci avvolgono, “abitano” anche all’interno del nostro organismo e senza di essi la vita, così come noi la conosciamo, non sarebbe possibile.

Non tutti sanno – ad esempio – che solo il 3 % dei batteri è patogeno, mentre il restante 97% si occupa della fertilizzazione delle piante, di antagonizzare la popolazione patogena, di aiutare l’organismo anche nella difesa contro i virus e... persino di consentire la digestione (la “famosa” flora batterica intestinale).

Do per scontata, comunque, una conoscenza di base della microbiologia: qualora fosse necessario, si consulti la bibliografia.

Mi limiterò a fornire qualche informazione sulle tecniche preparative più semplici, senza neppur sfiorare le tecniche colturali che non ritengo adatte a principianti inesperti (ai quali sono dirette queste mie brevi note) e che eventualmente possono essere reperite nei testi citati in bibliografia.

Mi riferirò a cellule batteriche “uccise” e colorate: pertanto le dimensioni visive potranno non coincidere con quelle *in vivo*, spesso citate nei testi.

ATTENZIONE: Benché nelle metodiche che descriverò si operi con microrganismi “morti” e, dunque, non più infettivi (nel caso fossero patogeni), ricordo che il materiale fissato è, comunque, suscettibile di produrre infezioni generiche qualora penetri nella cute o nel circolo ematico. Occorre, dunque, la massima attenzione per non ferirsi e, nel caso, disinfettare immediatamente la ferita e rivolgersi al medico.

Pericolosissima è la *penetrazione* dei microrganismi (vivi, ovviamente) *attraverso la cornea*: soprattutto nelle fasi della fissazione è indispensabile proteggersi con appositi occhiali o, meglio, maschere facciali (tipo quelle per giardinaggio).

Una maschera di carta da giardinaggio (meglio, tuttavia, del tipo chirurgico) sarà indispensabile per proteggere il volto e le prime vie aeree.

E, soprattutto, non mi stancherò mai di ripeterlo in particolare ai più giovani: fatevi aiutare da adulti, meglio se esperti.

MATERIALI

1. Ansa di platino (va bene anche di Nichel-Cromo, assai più economica). Oggi esistono anse di plastica in confezioni sterili monouso e di diametro vario a seconda della quantità di materiale da prelevare: sentire il proprio fornitore di prodotti chimici.
2. Becco di Bunsen (bruciatore a gas), sostituibile con un fornello a gas da campeggio o anche più semplicemente da una “lampada a spirito”.
3. Pinzette a becco piatto, largo e inclinato per reggere il vetrino portaoggetti durante la fissazione al calore.
4. Vaschetta per colorazioni (va bene anche una ciotola di plastica).
5. Supporto per appoggiare i vetrini sulla vaschetta (si può realizzare piegando ad U – per mezzo della fiamma – una bacchetta di vetro; oppure, molto più semplicemente, appoggiando sui bordi della vaschetta due stecchi per spiedini!).
6. Vetrini portaoggetti.
7. Vetrini coprioggetti.
8. Guanti di lattice.
9. Maschera per vie aeree.
10. Occhiali (meglio maschera facciale, vedi sopra).
11. Kit lavaocchi.
12. Portarifiuti biologici.



Fig. 17 : Anse di platino per microbiologia:
quella superiore ha una “capacità” di 5 μ l;
quella inferiore ha una “capacità” di 1 μ l.

REAGENTI

1. Acetone (NON va bene il solvente per vernici alla nitrocellulosa: occorre proprio quello per chimica che si può acquistare anche in Farmacia).
2. Alcole etilico a 95° (va bene quello per uso alimentare).
3. Xilene (meglio se si usano i nuovi prodotti a base di Limonene, perché lo Xilene è **CANCEROGENO**).
4. Balsamo del Canada (o prodotti analoghi, sentire il proprio fornitore...).
5. Acqua distillata (va bene quella sterile, per preparazioni iniettabili, che si può acquistare in farmacia in flaconi da 500 ml).
6. Acido Solforico al 20% (può andare bene anche quello per le batterie al piombo degli auto-motoveicoli; altrimenti occorre diluire quello per analisi... manovra **MOLTO PERICOLOSA!!**).

Ricordo a tutti che *l'acido solforico concentrato per analisi è al 96-98%*: è altamente corrosivo, tossico anche per inalazione (oltre che, ovviamente, per ingestione) e che, comunque, qualora si volesse usarlo per diluirlo in H₂O (distillata), occorre **versare l'Acido LENTAMENTE**, facendolo scorrere lungo una bacchetta di vetro che appoggia sul fondo del recipiente di vetro contenente già la quantità di acqua necessaria per la diluizione.

NON si provi neppure a versare l'acqua nell'acido: tutto l'acido, infatti, reagirebbe anche con poche gocce di acqua, producendo una violenta reazione con **proiezione di schizzi** molto pericolosi!!!! Inoltre, la diluizione di acido con acqua produce una reazione esotermica, cioè **genera molto calore!**

Attenzione, dunque, a possibili rotture dei recipienti di vetro.

Poiché si tratta di una **sostanza molto pericolosa**, ritengo sia meglio non fornire calcoli di diluizione: chi sa maneggiare tale sostanza sa certamente anche eseguire i calcoli necessari.

Per gli inesperti, ricordo che è meglio procurarsi una boccetta (da 50 ml) di acido per batterie (**comunque pericoloso**).

7. Acido Acetico glaciale (è meno corrosivo dell'Acido Solforico, ma **i suoi vapori sono tossici e irritanti**: possono provocare **occlusione della glottide con soffocamento, ipossia e perdita di coscienza. ATTENZIONE, dunque!**).
8. Acqua corrente.
9. Soluzioni Disinfettanti sia per la cute sia per il piano di lavoro.

COLORANTI

Violetto di Genziana Fenicato di Nicolle

- Soluzione alcolica satura di **Violetto di Genziana** 10 ml
- Soluzione acquosa all' 1% di **Acido Fenico** 100 ml

Si trova comunque in commercio e si evitano i rischi connessi con l'uso di acido fenico.

Liquido di Lugol

- Iodio 1 g
- Ioduro di Potassio 2 g
- H₂O (distillata) 200 ml

In realtà, non è un colorante, ma un *mordente*, cioè consente una migliore azione di alcuni coloranti: non conviene fabbricarselo, perché i vapori di iodio sono pericolosi e, inoltre, si trova già pronto in commercio.

Fucsina Fenicata di Ziehl

- Fucsina basica 1 g
- Acido Fenico 5 g
- Alcole Etilico a 95° 10 ml
- H₂O (distillata) 90 ml

Si trova facilmente già pronta in commercio.

Blu di Metilene di Löffler

- Blu di Metilene (soluzione alcolica satura) 30 ml
- KOH (soluzione allo 0,01 % in H₂O distillata) 100 ml

Blu di Metilene (può essere usato in sostituzione del Blu di Metilene di Löffler)

- Blu di Metilene (polvere) 1 g
- H₂O (distillata) 100 ml

Colorante di Albert

· Soluzione A

- . Blu di Toluidina 0,15 g
- . Verde Malachite 0,2 g
- . Alcole etilico a 95° 2 ml
- . H₂O (distillata) 100 ml
- . Acido Acetico glaciale 1 ml

Si sciolgono il blu di toluidina e il verde malachite in 2 ml di alcole etilico a 95°; si aggiunge la soluzione così ottenuta ai 100 ml di H₂O (distillata), nei quali sarà stato preventivamente versato l'acido acetico glaciale. La soluzione così ottenuta va lasciata a riposo per 24 ore, quindi la si filtra su carta ed è pronta all'uso.

· Soluzione B

- . È costituita dal Liquido di Lugol (vedi sopra).

PREPARAZIONE DEL MATERIALE DA ESAMINARE

1. Sterilizzare l'ansa di platino (se è di plastica è già venduta in confezione sterile!) tenendola nella parte centrale della fiamma del Bunsen, fino a renderla incandescente. Ritrarla, quindi e lasciarla raffreddare all'aria per alcuni secondi. Accertarsi che sia fredda immergendola in H₂O (distillata) sterile (quella delle preparazioni farmaceutiche iniettabili, per capirci).
2. Immergere l'ansa sterilizzata nel materiale da esaminare finché l'occhiello terminale dell'ansa stessa sia ricoperto.
3. Ritrarre l'ansa "caricata" e strisciarla su un portaoggetti, producendo uno striscio uniforme e sottile, soprattutto se si tratta di materiale semisolido.
4. Sterilizzare nuovamente l'ansa alla fiamma e raffreddarla immediatamente in H₂O.
5. Far asciugare il preparato all'aria.
6. Passare il portaoggetti, con lo striscio rivolto in alto, nella parte centrale della fiamma del Bunsen per tre volte, facendo attenzione a non surriscaldarlo per evitare che si rompa (solo la pratica e... qualche insuccesso potrà suggerire tempi e modalità).

Durante questa ultima fase, prestare attenzione a eventuali schizzi di materiale (possibili soprattutto se non è bene asciutto).

Al termine di tale operazione, comunque, il materiale deve essere ben asciutto e aderente al portaoggetti e risulta, così, fissato (se la temperatura è stata sufficientemente alta, circa +100 °C, i microrganismi saranno stati uccisi e si potrà lavorare in relativa sicurezza).

Durante tutta questa operazione indossare gli occhiali protettivi, la maschera e i guanti.

A proposito dei *guanti di lattice*: fare attenzione perché, lavorando vicino alla fiamma, essi possono letteralmente sciogliersi, penetrando nei pori della pelle e producendo ustioni dolorose e pericolose.

COLORAZIONI

Ne esistono diverse, ma mi limiterò alle più classiche (peraltro anch'esse soggette a varianti, secondo Autori e Laboratori) e descriverò la “procedura” che mi è stata insegnata e che uso io stesso.

Metodo di GRAM

Tale metodica fu proposta – nel 1884 – dal medico danese Christian **GRAM**. Si basa sulla proprietà che hanno alcuni microrganismi (chiamati GRAM-positivi) di trattenere un colorante basico (il **Violetto di Genziana fenicato di Nicolle**) – soprattutto dopo *mordenzamento* con una soluzione **iodio-iodurata** (il Liquido di Lugol) – anche dopo *decolorazione* con **Alcole etilico** o **Acetone**.

I microrganismi che non hanno questa proprietà vengono chiamati GRAM-negativi e, in questa metodica, vengono evidenziati con un colorante di contrasto (la **Fucsina fenicata di Ziehl** o, in alcune varianti, la **Safranina**): appariranno, in tal modo, rossi, contro i GRAM-positivi che risulteranno violetti.

- 1) Preparazione, essiccazione e fissazione come sopra descritto.
- 2) Poggiare il portaoggetti sui supporti della vaschetta per colorazioni (vedi MATERIALI, sopra) con il materiale strisciato in alto.
- 3) Ricoprire il vetrino con il **Violetto di Genziana fenicato di Nicolle**.
- 4) Lasciare agire per 1 minuto.
- 5) Versare via il colorante dal vetrino.
- 6) Lavare con **Liquido di Lugol** facendolo scorrere rapidamente sopra il vetrino tenuto inclinato.
- 7) Riporre il vetrino sui supporti, in piano e ricoprirlo con il **Lugol**.
- 8) Lasciare agire per 60-90 secondi.

- 9) Versare via il **Lugol**.
- 10) Lavare rapidamente con H₂O distillata sterile (per evitare di trasportare batteri estranei sul preparato).
- 11) Decolorare con **Alcole etilico** a 95° (oppure con **Acetone**) per 10-20 secondi.
- 12) Lavare con H₂O distillata sterile e lasciare sgocciolare l'acqua in eccesso.
- 13) Ricoprire il preparato con **Fucsina Fenicata di Ziehl** diluita 1:10 in H₂O distillata sterile.
- 14) Lasciare agire per 30 secondi.
- 15) Lavare con acqua corrente.
- 16) Lasciare asciugare all'aria.
- 17) Immergere il vetrino per 1 minuto in Xilene.
- 18) Montare in Balsamo del Canada.
- 19) Osservare con obiettivo a immersione.

Ricordo che, prima della decolorazione, TUTTI i microrganismi appaiono di colore violetto e che i GRAM-positivi "in fase di invecchiamento" appaiono di colore rosa.

Metodo di ZIEHL – NEELSEN

Si basa sulla proprietà che hanno alcuni microrganismi – che peraltro mal si tingono con i comuni coloranti, per cui hanno bisogno di un *mordenzante* come l'acido fenico o l'olio di anilina – di trattenere il colorante anche se vengono trattati con acidi. Tale proprietà, chiamata appunto *acidoresistenza*, è tipica:

- dei microrganismi appartenenti al genere **Mycobacterium** (come quello della *Tubercolosi* o quello della *Lebbra*);
- delle **spore** batteriche in genere;
- delle formazioni claviformi dei microrganismi appartenenti al genere **Actinomyces**, presenti sia nei tessuti umani sia in quelli animali.

L'*acidoresistenza* è di *grado variabile*: ad esempio, il **Mycobacterium Tuberculosis** trattiene il colorante anche se trattato con H₂SO₄ al 20%, mentre il **Mycobacterium Leprae** resiste solo alla decolorazione con H₂SO₄ al 5%. Le **spore** tollerano una decolorazione con H₂SO₄ allo 0,25-0,5% mentre per decolorare le formazioni di **Actinomyces** si usa H₂SO₄ all'1%.

- 1) Preparazione, essiccazione e fissazione, come sopra descritto.
- 2) Porre il portaoggetti sui supporti della vaschetta per colorazione, come per il GRAM (vedi);
- 3) Ricoprire il preparato con la **Fucsina Fenicata di Ziehl** (non diluita).
- 4) Lasciar agire per 5 minuti, scaldando a intervalli il vetrino sulla fiamma, fino alla comparsa dei primi vapori del colorante.

- 5) Lavare abbondantemente con H₂O distillata sterile (è importante, perché nell'acqua di rubinetto spesso sono presenti specie microbiche *saprofite* acidoresistenti che potrebbero rimanere adese al preparato, falsando il riconoscimento).
- 6) Allontanare l'eccesso di acqua, facendola scolare via.
- 7) Versare sul vetrino H₂SO₄ al 20% (o alla concentrazione richiesta, vedi sopra).
- 8) Lasciare agire per 30-60 secondi, cambiando 2 o 3 volte l'acido, fino a che il preparato assuma un colorito giallastro.
- 9) Lavare con H₂O distillata sterile.
- 10) Trattare a più riprese, da 20-30 secondi ciascuna, con Alcole etilico a 95°, finché il preparato appaia quasi incolore.
- 11) Lavare con H₂O distillata sterile.
- 12) Ricoprire il preparato con Blu di metilene all'1%.
- 13) Lasciare agire per 2 minuti.
- 14) Lavare bene con acqua corrente.
- 15) Lasciare asciugare all'aria.
- 16) Immergere in Xilene per 1 minuto.
- 17) Montare in Balsamo del Canada.
- 18) Osservare con obiettivo a immersione.

I microrganismi acidoresistenti appariranno di colore rosso-violetto, mentre gli altri saranno di colore blu.

Metodo di ALBERT

Si usa per dimostrare la presenza di granuli citoplasmatici di “**volutina**” (polifosfati “di riserva”) in alcuni microrganismi, soprattutto in quelli appartenenti al genere **Corynebacterium** (dei quali solo il *Corynebacterium Diphtheriae* – agente eziologico della **Difterite**, è patogeno per l'uomo, mentre gli appartenenti agli altri *stipiti* fanno parte della normale flora batterica delle vie respiratorie e di altre mucose).

Poiché tutti gli appartenenti a questo *genere* sono GRAM-positivi e la **volutina** è presente anche in molti GRAM-negativi, ai fini della corretta identificazione e classificazione è necessario allestire, in parallelo, una colorazione di GRAM.

- 1) Preparazione, essiccazione e fissazione del campione, come per le altre metodiche descritte.
- 2) Porre il portaoggetti sui supporti della vaschetta per colorazione, come nelle precedenti metodiche.

- 3) Ricoprire il preparato con la *Soluzione A* (**Blu di toluidina - Verde malachite**).
- 4) Lasciare agire per 3-5 minuti.
- 5) Lavare in acqua corrente.
- 6) Allontanare l'eccesso di acqua facendola scolare via.
- 7) Asciugare bene agitando il vetrino all'aria.
- 8) Ricoprire il preparato con il **Liquido di Lugol** (*Soluzione B*).
- 9) Lasciare agire per 1 minuto.
- 10) Lavare in acqua corrente.
- 11) Far asciugare il preparato all'aria.
- 12) Immergere il vetrino in Xilene per 1 minuto.
- 13) Montare in Balsamo del Canada.
- 14) Osservare con obiettivo a immersione.

I microrganismi appariranno sotto forma di sottili bastoncini – dritti o leggermente ricurvi – di colore verde e i **granuli di volutina** – se presenti – appariranno neri. Per poter evidenziare i granuli di volutina si ricorre, in genere, all'arricchimento dei microrganismi ponendoli in coltura su *terreno nutritivo al siero*, secondo la formulazione di **Löffler**, mentre se si usa *terreno al sangue-tellurito* i granuli di volutina saranno scarsi o del tutto assenti.

Metodo di Schaeffer - Fulton

Si basa sulla proprietà delle spore di trattenere i coloranti, anche dopo decolorazione.

- 1) Preparazione, essiccazione e fissazione del campione, come per le altre metodiche descritte.
- 2) Ricoprire lo striscio con Verde di malachite (al 5% in H₂O distillata).
- 3) Scaldare il vetrino sul bunsen, fino a che il campione emette vapori (non portarlo ad ebollizione!).
- 4) Tenere il preparato sulla fiamma per 3 minuti; il campione deve essere sempre ricoperto di colorante: aggiungere Verde malachite, se necessario.
- 5) Lasciar raffreddare il vetrino.
- 6) Lavare con acqua corrente.
- 7) Colorare con Safranina (allo 0,5% in H₂O distillata) per 3 minuti.
- 8) Lavare con acqua e lasciar asciugare all'aria.
- 9) Osservare con obiettivo a immersione.

Le spore si colorano in verde, le cellule batteriche in rosso.

Poiché queste brevi note sono indirizzate a dilettanti principianti, ricordo un po' di *nomenclatura essenziale*:

- I **cocchi** sono microrganismi sferici o sferoidali, che si presentano isolati, oppure a coppie (**diplococchi**), o a catena (**streptococchi**), o a grappolo (**stafilococchi**, dal greco “*staphilé*” = grappolo), raggruppati a tetradi - con una struttura che ricorda quella degli atomi di un cristallo di forma cubica – (**gaffkye**) o a pacchetti regolari di otto elementi (**sarcine**) o ancora a “chicco di caffè” (**neisserie**).
- I **bacilli** si presentano come bastoncelli relativamente dritti, isolati o a catenella (**streptobacilli**) o a “palizzata”.
- I **vibrioni** si presentano come bastoncelli chiaramente incurvati a “virgola”.
- Gli **spirilli** si presentano come bastoncelli non flessuosi spiraliformi.
- Le **spirochete** appaiono, invece, come bastoncelli flessuosi spiraliformi.

Sono **GRAM-positivi**:

- Diplococchi
- Streptococchi
- Stafilococchi
- Gaffkye
- Sarcine.

Sono **GRAM-negativi**:

- Neisserie
- Vibrioni
- Spirilli
- Spirochete.

Ricordo che solo alcuni GRAM-positivi sono **sporigeni** e, in particolare, che la **spora** – nei *ceppi aerobi* – è situata in posizione centrale nel corpo batterico, mentre è in posizione terminale (a mo' di “bacchetta di tamburo”) nei *ceppi anaerobi*.

Tra i **GRAM-positivi non sporigeni** si annoverano i generi:

- *Corynebacterium*
- *Erysipelothrix*
- *Lactobacillus*
- *Lysteria*.

I **GRAM-negativi** comprendono numerosi generi, tra i quali:

- *Pseudomonas*

- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Proteus*
- *Pasteurella*
- *Brucella*.

A scanso di grosse delusioni e di madornali errori ricordo che l'identificazione e la tipizzazione dei microrganismi necessita di "colture", reazioni biochimiche e tecniche siero-immunologiche o di altro genere: l'osservazione morfologico-tintoriale non risulta quasi mai sufficiente.

La presenza della "capsula" - uno spesso strato gelatinoso circoscritto, all'esterno della membrana cellulare che si sviluppa (nei ceppi che ne sono provvisti, ad esempio i pneumococchi) solo quando i microrganismi crescono su un tessuto ospite e non in coltura - non può essere evidenziata con i comuni metodi di colorazione.

Si ricorre, allora, al:

Metodo all'inchostro di China

- 1) Un'ansata di **Inchostro di China nero** viene mescolata - direttamente sul portaoggetti - con un'ansata del materiale da osservare.
- 2) Si ricopre l'emulsione con un coprioggetti.
- 3) Si rovescia il "wafer" dei vetrini su un foglio di carta assorbente, in modo che il coprioggetti sia in contatto con la carta.
- 4) Si comprime il portaoggetti, in modo da rendere sufficientemente sottile il preparato (la carta assorbirà l'eccesso di preparato e di colorante che fuoriesce dai bordi del coprioggetti).
- 5) Si osserva direttamente con l'obiettivo a immersione.

La eventuale **capsula** verrà evidenziata come un alone chiaro circondante i corpi batterici - più scuri - su un fondo nero o grigio scuro.

Ricordo - per inciso - che, nonostante alcuni batteri risultino patogeni solo allo stato capsulato, *non è possibile correlare* univocamente la presenza della capsula con la **virulenza** dei microrganismi, essendo la struttura capsulare presente anche in alcune specie **saprofite**.

I **flagelli**, appendici filamentose di cui sono dotati – in numero e posizione diversi – gli stipti batterici mobili (ad eccezione delle spirochete), non possono essere evidenziati con le normali tecniche. Il loro spessore, infatti, è di 0,02 micrometri o anche meno: dunque al di sotto del potere risolutivo del microscopio a luce trasmessa in campo chiaro. Occorre, pertanto, usare tecniche particolari, come l'impregnazione argintica, oppure ricorrere al microscopio elettronico.

I dilettanti volenterosi, tuttavia, se dotati di microscopio a contrasto di fase o a contrasto di interferenza, potranno cimentarsi in questo campo usando preparati fissati e non colorati.

Qualora, poi, si optasse per un esame **a fresco** (cioè su materiale non fissato e non colorato), per dedurre la presenza di flagelli sulla base della motilità dei microrganismi, occorrerà prestare attenzione a non farsi ingannare dal **moto browniano** delle cellule e, soprattutto, *prendere le opportune precauzioni per assicurare l'incolumità dell'osservatore* (trattandosi di organismi vivi e, dunque, capaci di infettare se appartenenti a ceppi patogeni).

Mi piacerebbe dilungarmi nella descrizione delle più comuni metodiche e dei più usati terreni di coltura, ma la cosa risulterebbe molto impegnativa e... assolutamente non scevra di pericoli per il dilettante inesperto o non adeguatamente attrezzato.

In bibliografia, comunque, è citato un capitolo di un testo che descrive i rudimenti della coltivazione di batteri saprofiti.

Però, ripeto, **occorre prestare la massima attenzione: anche tra i comuni saprofiti può annidarsi qualche patogeno che, magari, nell'*habitat* normale è "tenuto a bada" dai saprofiti, mentre in coltura potrebbe proliferare, prendere il sopravvento e diventare virulento, con le conseguenze che ben si possono immaginare.**

CAPITOLO IV

L'ALLESTIMENTO DEI PREPARATI MICROSCOPICI NELLA CITOLOGIA ESFOLIATIVA

INTRODUZIONE

La citologia esfoliativa si occupa dello studio delle cellule, appartenenti a epiteli di rivestimento mono o pluristratificati, che “*desquamano*” in cavità corporee (bocca, vagina, utero, bronchi, ecc.) oppure nell’ambiente esterno (cute).

Non si tratta di *cellule morte* (anche se un certo numero di esse effettivamente è in stato necrotico), bensì di una fase - sia pure terminale - del trofismo del tessuto a cui esse appartengono (a meno di situazioni patologiche).

Tra i vari **metodi di repertamento** delle cellule destinate allo studio citologico, sono da ricordare: il prelievo del materiale endocavitario per semplice raccolta; lo *scraping* (lett.: *scarificazione* o *grattamento*) della superficie da cui si vogliono prelevare le cellule da osservare; il lavaggio endocavitario (ad esempio, il lavaggio bronchiale); l’agobiopsia (nelle forme “cieca” oppure radio- o eco-guidata); l’agoaspirazione evacuativa di cisti; l’*impronta per apposizione* del vetrino sulla parte anatomica di cui si vuole studiare la citologia.

Non entrerà volutamente negli aspetti clinici, siano essi normali o patologici: mi limiterò a descrivere qualche tecnica utile all’osservazione.

Se, poi, qualcuno fosse interessato ad approfondire gli aspetti diagnostico-clinici, potrà trovare in Bibliografia qualche indicazione utile.

UN PO' DI STORIA

Padre della patologia cellulare è ritenuto Rudolf **Virchow** (1821-1902) il quale espone ampiamente il suo concetto di “**patologia cellulare**” nel trattato (in sei volumi) *Handbuch der speziellen Pathologie und Therapie*. Celebre è la sua frase “omnis cellula e cellula” (ogni cellula viene da una cellula), con ciò introducendo il concetto dinamico del processo patologico, alla cui base sono alcune lesioni strutturali organiche.

Tuttavia, in letteratura le prime tracce di osservazioni citologiche si riferiscono a un lavoro di F. **Donaldson** il quale – nel 1853 – descrisse la presenza di cellule atipiche nei liquidi tumorali nella sua opera *The Practical Application of the Microscope in Cancer*.

In realtà, nonostante i lavori di **Sanders** (1864) e di altri, è ad **Ehrlich** che si deve – nel 1882 – la descrizione della colorazione degli strisci essiccati.

Per un approfondimento sulla “Storia” della citopatologia, si può consultare l'articolo di Nery ROMERO, *Reseña histórica de la citopatología y los orígenes del Papanicolaou* (citato in Bibliografia).

L'applicazione della citologia alla patologia umana (almeno come oggi la conosciamo) è opera del medico greco Georgos Nicholas **Papanicolau** (americanizzato in George dopo il suo arrivo negli USA) il quale, nel 1923, in un Congresso a New York, aveva suggerito il suo metodo per la diagnosi del cancro dell'utero.

In seguito, nel 1928, aveva presentato una comunicazione alla *Third Race Betterment Conference* dal titolo *New cancer Diagnosis* (vedi Bibliografia), rimasta “lettera morta” per circa 20 anni!

È infatti solo del 1941 la pubblicazione di Georgos N. PAPANICOLAU - Herbert F. TRAUT, *The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus* (citata in Bibliografia).

Mentre Papanicolau presentava il suo contributo a Battle Creek, Babes A. **Aurel** produsse un lavoro sulla *citologia vaginale* che fu pubblicato da *La Presse Médical* nell'aprile 1928. Aurel, tuttavia, utilizzava una tecnica differente da quella proposta da Papanicolau (che tra l'altro sembra non fosse a conoscenza di tale lavoro) sia nella preparazione, sia nella colorazione, sia nell'interpretazione dei risultati.

Il grande merito di Papanicolau (celebrato anche con un'emissione filatelica negli USA) è quello di aver sistematizzato la tecnica, dal metodo di prelievo alla colorazione e ai criteri di valutazione.

La prima classificazione, proposta da Papanicolau, è stata via via perfezionata e, nel 1999, è stata sostituita dal cosiddetto *Bethesda System*, rivisto poi - a seguito dell'introduzione di nuove tecnologie e dei risultati delle più recenti ricerche - nel 2001 e pubblicato nell'aprile 2002 da JAMA (*Journal of the American Medical Association*) (vedi Bibliografia).

Qualora il microscopista dilettante fosse interessato alle applicazioni cliniche e alla citopatologia, in Bibliografia potrà trovare materiale e, facendo uso di Internet, potrà aggiornarsi dopo aver conseguito una sufficiente preparazione di base.

Mi permetto, però, di far presente (in particolare se tra i lettori ci fosse qualche studente di medicina o di biologia) che, quando si entra nel campo della patologia – soprattutto umana –, non si può prescindere (dopo gli opportuni approfonditi studi teorici su manuali e atlanti) dall'assistenza e dalla supervisione – durante le osservazioni al microscopio – di esperti docenti e/o professionisti, onde evitare di prendere madornali abbagli.

Quanto sopra vale - ovviamente - anche per le altre discipline osservative, come l'istologia, l'ematologia e la microbiologia.

Ciò rende ragione della mia affettuosa gratitudine, mostrata anche in sede bibliografica, verso Coloro che, con pazienza e metodo, mi hanno erudito e addestrato e a quanti, con le loro Opere, hanno contribuito a tale formazione.

Insomma: non fate tutto da soli! Rivolgetevi ai docenti (universitari o anche liceali) e troverete sicuro consiglio.

Spesso si ha quasi una sorta di “timore reverenziale” nel rivolgersi ai Docenti (soprattutto se universitari): è un mito da sfatare, perché la maggior parte di essi prova un immenso piacere nel trasferire le proprie competenze ed esperienze.

Provare per credere!

MATERIALI

1. Spatole di Ayre (si trovano sia di legno sia di plastica, in confezioni sterili monouso).



Fig. 18 : Spatola di Ayre

2. Spazzolini per prelievo vaginale (anch'essi reperibili in confezioni sterili monouso).

3. Vetrini portaoggetti 24x36 mm.
4. Vetrini coprioggetti 22x50 (o anche 22x60)mm.
5. Vaschette per colorazioni (sostituibili con recipienti analoghi in plastica o in vetro, reperibili nei supermercati).
7. Rastrelliera portavetrini per colorazione.
6. Vetreria tarata e graduata.



Fig. 19 (a sinistra): vaschette per colorazione di tipo... "domestico" con rastrelliera portavetrini.

Fig. 20 (a destra): vaschette per la serie degli alcoli e per colorazione; si notano: vaschette "professionali" e vaschette "domestiche".



REAGENTI

1. Fissativo alcol-etero (o **spray fissanti** analoghi, consultare il proprio fornitore).
2. Serie ascendente degli Alcoli (vedi capitolo sui preparati istologici).
3. Alcole etilico assoluto.
4. Xilene (CANCEROGENO) (o, meglio, prodotti non tossici a base di limonene: sentire il proprio fornitore).
5. Acido Cloridrico al 37% (**TOSSICO E CORROSIVO**) (vedi appresso).
6. Ammoniaca al 25% (**TOSSICO**) (vedi appresso).
7. Acqua distillata.
8. Acqua corrente
9. Soluzione Tampone a pH 7,0 (vedi capitolo II).
10. Balsamo del Canada (o analoghi).
11. Matita con punta di diamante (per scrivere sui vetrini).

COLORANTI

Si trovano TUTTI facilmente in commercio: non conviene fabbricarseli da soli. Tuttavia, per completezza, ne trascrivo la preparazione.

Ematossilina di HARRIS (preparazione tratta da **Ishizuka-Oota-Masubuchi**, vedi Bibliografia: differisce leggermente da quella proposta da Beccari)

Ematossilina	5 g
Alcole Etilico a 95°	50 ml

Allume di Ammonio 100 g
Ossido di Mercurio 2,5 g
Acqua distillata 1000 ml

- Sciogliere l'ematossilina in Alcole Etilico a 95°
- Porre l'acqua distillata in un recipiente (Becher) di vetro e, dopo averla scaldata, sciogliere in essa l'Allume di Ammonio.
- Portare a ebollizione.
- Allontanare la fonte di calore e aggiungere l'Ossido di Mercurio
- Mescolare delicatamente finché la soluzione acquista colore porpora scuro.
- Raffreddare rapidamente il becher immergendolo in acqua di rubinetto.
- Filtrare su carta e conservare in una bottiglia scura, tappata.
- Lasciar maturare il colorante così preparato per almeno 24 ore.

Va filtrata ogni volta prima dell'uso.

Si può usare così com'è o si può diluire al 50% in Acqua distillata (a pH 7).

Orange G (chiamato originariamente **OG6** da Papanicolau)

Soluzione A (sol. 10% in H₂O, necessaria perché l'Orange G non è solubile in alcole)

Orange G 10g

Portare al volume finale di 100 ml con H₂O distillata.

- Soluzione A 50 ml
- Alcole etilico a 95° 950 ml
- Acido fosfotungstico 0,15 g

Conservare in flacone scuro, tappato.

Va filtrata prima dell'uso.

Miscele policrome EA

Soluzione A

Verde chiaro S.F., soluzione al 2% in H₂O distillata.

Soluzione B

Marrone di Bismark Y, soluzione al 10% in H₂O distillata.

Soluzione C (standard di Verde chiaro allo 0,1%)

Soluzione A 50 ml

Alcole etilico a 95° 950 ml

Soluzione D (standard di Marrone di Bismark allo 0,5%)

Soluzione B	5 ml
Alcole etilico a 95°	95 ml

Soluzione E (standard di Eosina allo 0,5%)

Eosina Y	5 g
Alcole etilico a 95°	1000 ml

Soluzione F (soluzione satura di Carbonato di litio)

La soluzione satura di Carbonato di Litio, a temperatura ambiente, ha una concentrazione di circa 1,33%; pertanto:

Carbonato di Litio	0,2 g
H ₂ O distillata	10 ml

Sciogliere bene, decantare il supernatante dopo aver lasciato sedimentare la soluzione e filtrare su carta prima dell'uso.

Soluzione G (standard di Verde chiaro allo 0,05%)

Soluzione A	25 ml
Alcole Etilico a 95°	975 m

Preparazione dell'EA-36 (chiamata originariamente EA-50)

. Soluzione C	450 ml
. Soluzione D	100 ml
. Soluzione E	450 ml
. Soluzione F	10 gtt (gocce)
. Acido Fosfotungstico	2 g

Mescolare bene.

Conservare in flacone scuro, tappato.

Filtrare su carta prima dell'uso.

Preparazione dell'EA-65

. Soluzione G	450 ml
. Soluzione D	100 ml
. Soluzione E	450 ml
. Acido Fosfotungstico	6 g

Mescolare bene.

Conservare in flacone scuro, tappato.
Filtrare su carta prima dell'uso.

Soluzione di Acido Cloridrico allo 0,25%

Supponendo di avere HCl al 37% (in commercio si trovano anche concentrazioni inferiori), diluire 0,68 ml di HCl in 50 ml H₂O distillata (VERSARE LENTAMENTE L'ACIDO NELL'ACQUA!) e portare al volume finale di 100 ml con H₂O distillata.

Soluzione di Ammoniaca all'1,5%

Supponendo di avere NH₃ al 25% (esiste in commercio anche a concentrazioni inferiori), diluire 6 ml di NH₃ in 50 ml di Alcole Etilico a 70° e portare al volume finale di 100 ml con Alcole Etilico a 70°.

N.B.: le precauzioni di diluire in due volte le soluzioni di acidi e basi forti sono necessarie per smaltire il calore che si forma e per ottenere un volume finale esatto: a tal fine ricordo di usare vetreria **tarata**, non essendo quella **graduata** sufficientemente precisa).

METODI DI ALLESTIMENTO

Innanzitutto, occorre scegliere il materiale da esaminare.
Escludendo prelievi vaginali, agoaspirati, agobiopsie e lavaggi endocavitari (**tutti di competenza medica**), ritengo che per il principiante la fonte maggiore di materiale sia... lo *scraping* della mucosa interna delle proprie guance o il semplice espettorato (non lo sputo, perché non contiene cellule di derivazione bronchiale).

Basterà passare una spatola di **Ayre** sulla mucosa interna delle guance e immediatamente strisciare la medesima su un vetrino portaoggetti.

Nel caso dell'espettorato, si può deporlo direttamente sul portaoggetti e strisciarlo (in laboratorio, peraltro, esso va prodotto direttamente in una scatola di vetro contenente la soluzione fissativa).

FISSAZIONE

Appena effettuato lo striscio, esso va immerso – per almeno 15-30 minuti - in una soluzione di Alcole etilico a 90° e Etere etilico (in parti uguali) oppure immediatamente ricoperto con un fissativo spray spruzzato da una distanza di circa 25 cm, in modo da non soffiare via (con conseguente ammassamento artificioso in un'area ristretta del vetrino) le cellule (ricordare che la disposizione e l'ammassamento delle cellule hanno importanza nella formulazione della diagnosi).

Nel caso di uso del fissativo spray, tenere il vetrino in piano durante la nebulizzazione e lasciarvelo per almeno 30 minuti o, comunque, fino all'essiccamento.

ATTENZIONE: L'Etere Etilico (etere dietilico, nella terminologia chimica; chiamato anche etere solforico) è **altamente infiammabile**, ha una temperatura di ebollizione +34 °C e può bastare una microscintilla (prodotta – ad esempio – dall'elettricità statica delle scarpe su un tappeto) per provocare l'esplosione dei suoi vapori!!! Nel passato, quando veniva usato “a gocciolamento” sulle maschere “aperte” di Esmarch (o da essa derivate) per produrre l'anestesia, più di qualche sala operatoria è stata danneggiata in questo modo! Inoltre, l'Etere etilico è **tossico** soprattutto per il fegato!

COLORAZIONE

Metodo di PAPANICOLAU

- 1) Il preparato deve essere strisciato sul portaoggetti, fissato e asciutto.
- 2) Alcole Etilico a 80° (15-30 secondi)
- 3) Alcole Etilico a 70° (15-30 secondi)
- 4) Alcole Etilico a 50° (15-30 secondi)
- 5) H₂O distillata (15-30 secondi)
- 6) Ematossilina di Harris (3 minuti se usata pura)
(6 minuti se diluita al 50% con H₂O)
- 7) H₂O distillata (3 bagni diversi; 10 secondi ciascuno)
- 8) Acqua corrente (6 minuti)
- 9) Alcole Etilico a 50° (15 secondi)
- 10) Alcole Etilico a 70° (15 secondi)
- 11) Alcole Etilico a 80° (15 secondi)
- 12) Alcole Etilico a 95° (15 secondi)

- 13) Orange G (OG6) (90 secondi - 10 minuti, secondo la Casa produttrice)
- 14) Alcole Etilico a 95° (2 bagni separati; 5-10 secondi ciascuno)
- 15) EA-36 (90 secondi -5 minuti, secondo la Casa produttrice)
- 16) Alcole Etilico a 95° (3 bagni diversi; 5 secondi ciascuno)
- 17) Alcole Etilico Assoluto (2 bagni separati; 10-20 secondi ciascuno)
- 18) Alcole Etilico Assoluto-Xilene (in parti uguali) (15-30 secondi)
- 19) Xilene (3 bagni diversi; 30 secondi ciascuno)
- 20) Montare in Balsamo del Canada (o simili).
- 21) Montare in Balsamo del Canada (o simili).

L'EA-36 va usato per gli "strisci spessi", come quelli vaginali.

Per quelli "sottili" (come quelli buccali, urinari, ecc.) va usato l'EA-65, con le stesse modalità.

Metodo "alternativo"

È più rapido del metodo standard, ma non è adatto a strisci "spessi" (come quelli vaginali) perché l'Ematossilina rimane nel citoplasma rendendo il nucleo indistinto e il citoplasma poco trasparente.

Può essere adottato per colorare strisci provenienti da lavaggio gastrico o urinario.

Può essere "tentato" su strisci provenienti da *scraping* della mucosa buccale.

È identico al metodo standard fino al passaggio:

- 10) Ematossilina di Harris (pura, 45 secondi)
- 11) H₂O distillata (3 bagni diversi; 10 secondi ciascuno)
- 12) Acqua corrente (6 minuti)
- 13) Alcole Etilico a 50° (15 secondi)
- 14) NH₃ all'1,5% (60 secondi)
- 15) Alcole Etilico a 70° (15 secondi)
- 16) Alcole Etilico a 80° (15 secondi)
- 17) Alcole Etilico a 95° (15 secondi)
- 18) Orange G (OG6) (90 secondi)
- 19) Alcole Etilico a 95° (2 bagni separati; 5-10 secondi ciascuno)
- 20) EA-36 (3 minuti)
- 21) Alcole Etilico a 95° (3 bagni diversi; 5 secondi ciascuno)
- 22) Alcole Etilico Assoluto (2 bagni separati; 10-20 secondi ciascuno)

- 23) Alcole Etilico Assoluto-Xilene (in parti uguali) (15-30 secondi)
- 24) Xilene (3 bagni diversi; 30 secondi ciascuno)
- 25) Montare in Balsamo del Canada (o simili).

Metodo rapido di Giemsa (particolarmente adatto per strisci ginecologici)

Poiché la fissazione è già avvenuta, non occorre il passaggio in May-Grünwald. Si prepari, invece, una soluzione cromogena di *Giemsa alcolico* in questo modo:

- Giemsa (soluzione madre) 1 ml
- Alcole Etilico a 90° 9 ml

- 1) Alcole Etilico a 95° (15 secondi)
- 2) Porre il vetrino in piano sui supporti della vaschetta per colorazioni
- 3) Versare, con un contagocce, circa 10 gocce (comunque fino a ricoprire lo striscio) di Giemsa alcolico sul preparato
- 4) Lasciare il colorante evaporare lentamente e la colorazione virare dal blu al porpora rossastro (occorreranno circa 7-10 minuti)
- 5) Lasciare la superficie del preparato lievemente umida!
- 6) Acetone (5 secondi)
- 7) Alcole Etilico a 95° (varie immersioni, per lavare via il Giemsa)
- 8) Alcole Etilico Assoluto (2 bagni separati; 10-20 secondi ciascuno)
- 9) Alcole Etilico Assoluto-Xilene (in parti uguali) (15-30 secondi)
- 10) Xilene (3 bagni diversi; 30 secondi ciascuno)
- 11) Montare in Balsamo del Canada (o simili).

Ovviamente, si può sempre eseguire la colorazione “classica” di May-Grünwald – Giemsa con i tempi e le modalità usati nelle colorazioni ematologiche (vedi).

Metodo di SHORR

Questo metodo, molto adatto per la valutazione ormonale dello striscio, non è adatto per la diagnostica oncologica in quanto i nuclei risultano ipercromici e poco trasparenti. Lo striscio, inoltre, va eseguito per *scraping* dal fornice laterale della vagina, mentre per la diagnosi oncologica il materiale deve provenire dal collo dell'utero e dal fornice posteriore.

Potrebbe essere usato, forse, per tentare di valutare l'assetto ormonale a partire da cellule provenienti da *scraping* della mucosa buccale (dato che la saliva presenta la

stessa “felcizzazione” del muco cervicale negli stessi “momenti” ormonali – il cosiddetto *ferning test* –), ma non ho riscontri definitivi in merito.

Si esegue su strisci eseguiti e fissati come nel Papanicolau.

- 1) Portare gli strisci all'Acqua distillata, come nei passaggi 2-5 del Papanicolau
- 2) SHORR S III (1 – 3 minuti)
- 3) Alcole Etilico a 70° (10 secondi)
- 4) Alcole Etilico a 95° (30 secondi)
- 5) Alcole Etilico Assoluto (due bagni; 30 secondi ciascuno)
- 6) Alcole Etilico Assoluto-Xilene (in parti uguali) (15-30 secondi)
- 7) Xilene (3 bagni diversi; 30 secondi ciascuno)
- 8) Montare in Balsamo del Canada (o simili).

Ometto le tecniche in **Fluorescenza**, perché si tratta di metodiche basate su reazioni con anticorpi marcati con fluorocromi e sono usate per indagini particolari (come, ad esempio, la determinazione della presenza di recettori ormonali per gli estrogeni o per il progesterone) decisamente fuori della portata del dilettante non attrezzato a livello professionale, anche perché i reattivi usati in immunofluorescenza sono oltremodo costosi!

Ad ogni buon conto, in Bibliografia ho segnalato qualcosa in merito.

Non sto ad indicare “cosa si può osservare” in campo citologico, perché sarebbe eccessivamente lungo e impegnativo: si consulti la Bibliografia se si è interessati all'argomento.

BIBLIOGRAFIA

CAPITOLO I

Nello BECCARI, *Elementi di Tecnica Microscopica*, Società Editrice Libreria, Milano, 5^a ed., 1952.

Nello BECCARI - Valdo MAZZI, *Manuale di tecnica microscopica*, Società Editrice Libreria, Milano, 6^a ed., 1966.

Valdo MAZZI, *Tecniche istologiche e istochimiche*, Piccin Editore, Padova, 1977.

Giovanni MONTALDO, *Manuale di Tecnica Istopatologica*, Edizioni Minerva Medica, Torino, 2^a ed., 1973.

Hans-Christian BURCK, *Tecnica istologica*, Editrice Internazionale Arti e Scienze, Roma (trad. italiana).

Roberto MASTROSTEFANO, *Istochimica*, Fonte del Libro Medico, Roma, 1974.

Piero GALLO, *Introduzione allo studio dell'Istochimica*, Lombardo Editore, Roma, 1976.

Ermanno BONUCCI, *Manuale di Istochimica*, Lombardo Editore, Roma, 1981.

Arthur W. HAM, *Istologia*, 2 voll., USES, Firenze, 2^a ed. italiana, 1969.

Valerio MONESI, *Istologia*, Piccin, Padova, 1975.

J. DALION, *Atlante di Istologia Normale*, Società Editrice DEMI, Roma, 1973.

Zaccaria FUMAGALLI, *Guida allo studio dell'anatomia dell'uomo*, 5 voll., Vallardi, Milano, 2^a ed., 1973.

Giulio CHIARUGI - Luigi BUCCIANTE, *Istituzioni di Anatomia dell'Uomo*, 5 voll., Vallardi, Milano, 10^a ed., 1968.

BIBLIOGRAFIA

Giuseppe Carlo BALBONI - Giulio MARINOZZI - Pietro MOTTA et al., *Anatomia Umana*, 3 voll., Edi.Ermes, Milano, 2^a ed., 1977.

Pietro MOTTA, *Anatomia Microscopica*, Vallardi, Milano, 2^aed., 1977.

Giuseppe Carlo BALBONI - Giovanni TEDDE, *Anatomia Microscopica*, Società Editrice Universo, Roma, 1977.

Oliviero M. OLIVO - Giorgio TONI, *Atlante di Anatomia Microscopica*, Vallardi, Milano, 2^aristampa 1965.

R. RIVA - C. DELL'ORBO, *Atlante di Anatomia Microscopica*, La Goliardica Pavese, 1975.

Antonio ASCENZI - Pietro MOTTURA, *Trattato di Anatomia Patologica*, 2 voll., UTET, Torino 1974.

Robertson F. OGILVIE, *Testo-Atlante di Istologia Patologica*, Piccin, Padova, 1964.

R.C. CURRAN, *Atlante di Istopatologia a colori*, Società Editrice Universo, Roma, 1973.

Cesare CAVALLERO, *Atlante di Istologia Patologica dell'Uomo*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 1957.

W. SANDRITTER - C. THOMAS, *Istopatologia*, Testo-atlante, Editoriale Grasso, Bologna, 3^a ed. italiana sulla 7^a ed. tedesca, 1979.

CAPITOLO II

Marcel BESSIS, *Reinterpretazione degli strisci di sangue*, Piccin Editore, Padova, 1978.

George A. McDONALD – T.C. DODDS – Bruce CRUIKSHANK, *Atlante di Ematologia*, Edizioni Mediche Scientifiche Internazionali, Roma, 2^a ed. italiana (trad. dalla 4^a inglese), 1979.

F.G.J. HAYHOE – R.J FLEMANS, *Atlante di Citologia Ematologica*, E.T.I.M. - Vaduz (FL).

Paolo INTROZZI (diretto da), *Trattato Italiano di Medicina Interna*, Parte terza, *Malattie del Sangue e degli organi Emopoietici – Malattie del Sistema Reticolo-Istiocitario*, 5 voll., USES, Firenze, 2^a edizione, 1978-1988.

D. ZUCKER-FRANKLIN – M.F. GREAVES – C.E. GROSSI – A.M. MARMONT, *Le Cellule del sangue – Funzioni e patologia*, Atlante, 2 voll., Edi-Ermes, Milano, 2^a ed., 1988.

Franco MANDELLI, *Lezioni di Ematologia*, La Goliardica Editrice, Roma, ristampa 1978.

Sante TURA, *Lezioni di Ematologia*, Editrice Esculapio, Bologna, 2^a ed., 1977.

J. BERNARD – J.-P. LEVY (et al.), *Ematologia*, Masson, Milano, 1978 (trad. italiana dalla 4^a ed. francese).

Ivo DE CARNERI, *Parassitologia Generale e Umana*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 4^a ed., 1972.

Per quanto riguarda le **notizie storiche** circa la tecnica degli strisci, esse sono state trattate principalmente - con aggiunte, modifiche e varianti del cui contenuto mi assumo la piena responsabilità - da: M.BESSIS, *Reinterpretazione degli strisci di sangue*, citato.

CAPITOLO III

Aldo CIMMINO, *Lezioni di Microbiologia*, Edizioni Porziuncola, Assisi, 1967.

R.R GILLIES – T.C. DODDS, *Batteriologia Illustrata*, Il Pensiero Scientifico Editore, Roma, 1^a ed. italiana sulla 2^a ed. inglese (1968), 1970.

R. BUTTIAUX – H. BEERENS – A. TACQUET, *Tecniche Batteriologiche*, Società Editrice DEMI, Roma, 1^a ed. italiana sulla 4^a ed. francese, 1975.

Handbook of Microbiology, E.Merck, Darmstadt.

S.T COWAN – K.J STEEL, *Manuale per l'identificazione dei batteri di interesse clinico*, Edi. Ermes, Milano, 1^a ed.italiana sulla 2^a ed. inglese (1974), 1979.

J.M. HOSKINS, *Diagnosi Virologica*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 1975.

Bernard D. DAVIES – Renato DULBECCO – Herman N. EISEN – Harold S. GINSBERG – W. Barry WOOD, *Microbiologia*, 2 voll., Il Pensiero Scientifico Editore, Roma, 1^a ed. italiana, 1971.

Paolo TOLENTINO, *Malattie Infettive*, Minerva Medica, Torino, 2^a ed., 1964.

Giuseppe NICOLETTI – Vito Mar NICOLOSI, *Dizionario di Batteriologia Umana normale e patologica*, Centro di Documentazione Scientifica Menarini, Firenze.

Lansing M. PRESCOTT – John P. HARLEY – Donald A. KLEIN, *Microbiologia*, McGraw-Hill, Milano, 6^a ed., 2006.

Come si coltivano innocui Batteri da usare nelle osservazioni, (tratto da *Scientific American*) in *COME SI FA*, Enciclopedie Pratiche Sansoni, Firenze, 1966.

Luigi DE CARLI – Fiorella NUZZO, *Culture Cellulari*, Boringhieri, Torino, 1973.

CAPITOLO IV

Yoshio ISHIZUKA – Kunio OOTA – Kazumasa MASUBUCHI, *Citodiagnostica Pratica*, Società Editrice Universo, Roma, 1973.

Carlo RAVETTO, *Citodiagnostica Oncologica* (Testo-Atlante), Piccin, Padova, 1973.

Cesare CAVALLERO (diretto da), *Citopatologia e Citodiagnostica*, Marrapese Editore – DEMI, Roma, 1976.

Potito D'ALESSANDRO, *Istocitologia delle atipie cervicali in gravidanza e durante trattamento*, in *CITOPATOLOGIA E ONCOLOGIA GINECOLOGICA*, I Corso Superiore diretto da G. Valle e A. Vecchione, Marrapese Editore - DEMI, Roma, 1975.

Aldo VECCHIONE et AL., *Citopatologia Ginecologica e note di Chemioterapia*, Samil-Pabyrn, 1985.

Rosa Maria TOMASINO – Lorenzo MARASÀ, *Citodiagnostica mammaria*, Lombardo Editore, Roma, 1981.

A.I. SPRIGGS – M.M. BODDINGTON, *La Citologia dei Versamenti Pleurico, Pericardico e Peritoneale e del Liquido Cerebrospinale*, Edizioni Mediche Scientifiche Internazionali, Roma, 2^a ed., 1973.

Alfonso FERNÁNDEZ-CID FENOLLERA – Luciano LÓPEZ MARÍN, *Citopatologia Ginecologica e Mammaria*, CIC Edizioni Internazionali, Roma, 2^a ed., 1995.

H. MEISSNER, *Cytodiagnostic à l'aide de la coloration selon Papanicolau et selon Shorr*, E.Merck, Darmstadt.

Nery ROMERO, *Reseña histórica de la citopatología y los orígenes del Papanicolaou*, ANALES DE LA FACULTAD DE MEDICINA, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2001.

CA - *A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS*, *Keeping up with Cancer*, 1955, 5; pp.38-44.
Georgos N. PAPANICOLAOU - Herbert F. TRAUT, *The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus*, *AMERICAN JOURNAL OF OBSTRECTIS AND GYNECOLOGY*, 1941,42; pp. 193-206.

BIBLIOGRAFIA

G.N. PAPANICOLAU – C.R. STOCKARD, *The existence of a typical Oestrous Cycle in the Guinea Pig – with a Study of its histological and physiological Changes*, *AMERICAN JOURNAL OF ANATOMY*, 1917, 22; pp.225-283.

G.N. PAPANICOLAU, *New Cancer Diagnosis*, Proceedings of the Third Race Betterment Conference, January 2-6, 1928; pp. 528-534.

G.N. PAPANICOLAU, *The sexual cycle in the human female as revealed by vaginal smear*, *AMERICAN JOURNAL OF ANATOMY*, 1933, 52; pp.519-637.

G.N. PAPANICOLAU, *A new procedure for staining vaginal smears*, *SCIENCE*, 1942, 95; pp.438-439.

G.N. PAPANICOLAU – H. TRAUT, *Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear*, New York, 1943.

G.N. PAPANICOLAU – H. TRAUT - A.A. MARCHETTI, *Epithelia of Woman's reproductive organs*, Commonwealth Fund, New York, 1948.

G.N. PAPANICOLAU, *Atlas of exfoliative cytology*, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1954.

A revised system for reporting the results of Pap tests, *JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION (JAMA)*, 2002.

Per quanto riguarda la **microscopia in contrasto di fase** nella citologia vaginale:

G. MINIELLO, *Citogramma vaginale*, Testo-Atlante, CIC Edizioni Internazionali, Roma, 1994.

Per approfondire l'aspetto oncologico sia dell'istologia, sia della citologia:

Vincent T. DeVITA, Jr. – Samuel HELLMAN – Steven A. ROSENBERG et AL., *Cancer – Principles & Practice of Oncology*, J.B Lippincott, Philadelphia, 2^a ed., 1985.

Gianni BONADONNA – Gioacchino ROBUSTELLI DELLA CUNA, *Medicina Oncologica*, Masson, Milano, 6^a ed., 2000.

Giovanni LANZA, *Tumori e Precancerosi – Biologia e Morfotipologia*, Testo-Atlante, Piccin, Padova, 1989.

AA. VV., *Carcinogenesis – A Broad Critique*, Williams & Wilkins, Baltimora, 1967.

E.J. AMBROSE – F.J.C. ROE, *Biologia dei Tumori*, Idelson, Napoli, 1978.

Giulio TARRO, *Virologia Oncologica*, Idelson, Napoli, 1979.

Antonio CAPUTO, *I presupposti molecolari della trasformazione neoplastica*, Lombardo Editore, Roma, 1975.

Yin-Tak WOO – David Y. LAI – Joseph C. ARCOS – Mary F. ARGUS, *Chemical Induction of Cancer – Structural Bases and Biological Mechanisms*, Volume III B, *Aliphatic and Polyhalogenated Carcinogens*, Academic Press, 1985.

Albert H. OWENS, Jr. – Donald S. COFFEY – Stephen B. BAYLIN, *Tumor Cell Heterogeneity: Origins and Implications*, Academic Press, 1982.

S. WAXMAN – G.B. ROSSI – F. TAKAKU, *The Status of Differentiation – Therapy of Cancer*, Raven Press, New York, 1987.

Per l'aspetto più propriamente genetico (generale):

Benjamin LEWIN, *Il Gene VI*, Zanichelli, Bologna, 1999.

Per gli aspetti più strettamente connessi con le **metodiche di laboratorio**, vedasi:

Paolo INTROZZI (diretto da), *Trattato Italiano di Medicina Interna - Tecniche e Diagnostica di Laboratorio*, 5 voll. USES, Firenze, 3^a ed., 1978 - 1987.

Angelo BURLINA, *Medicina di Laboratorio – Principi di tecnologia*, 2 voll., C.G. Edizioni Scientifiche, Torino, 1994.

Walter TELÒ, *Esami di Laboratorio*, Minerva Medica, Saluzzo, 3^a ed., 1967.

Filippo PASQUINELLI, *Manuale per Tecnici di Laboratorio*, 2 voll., Edizioni Rosini, Firenze, 1967.

Per approfondimenti sulla **microscopia ottica**, vedasi:

Giovanni Pietro SINI, *Problemi Tecnici della Microscopia Ottica*, reperibile nel sito http://www.funsci.com/fun3_it/sini/mo/alone.pdf

Paolo CASTANO, *Microscopia Ottica e Fotomicrografia*, Tamburini Editore, Milano, 1975.

Werner NIKLOWITZ, *Metodi di preparazione adatti per l'uso della microscopia a contrasto di fase nell'istologia*, in *INFORMAZIONI ZEISS*, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., ed. italiana, Carl Zeiss S.r.l., Milano, n. 64, 1967, pp. 42-44.

Helmut NEUPERT, *Dispositivo a contrasto d'interferenza secondo Nomarski*, in *INFORMAZIONI ZEISS*, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., ed. italiana, Carl Zeiss S.r.l., Milano, n. 65, 1967, pp. 96-97.

Friedrich Karl MÖLLRING, *Nozioni basilari di Microscopia*, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., ed. italiana, 1967.

Hans DETERMANN - Friedrich LEPUSCH, *Il microscopio e le sue applicazioni*, Ernst Leitz, Wetzlar, ed. italiana, 1969.

Stefano LAMBERT GARDINI - Giuseppe Giulio COLAROSSO – Umberto SERGIACOMI, *Atlante di Immunofluorescenza*, Lombardo Editore, Roma, 1990.

Per la **microscopia elettronica**:

Silvano SCANNERINI, *Tecniche Biologiche in Microscopia Elettronica*, Libreria Editrice Universitaria Levrotto & Bella, Torino, 1968.

Per approfondire gli aspetti connessi con la **chimica**:

Vincenzo CAGLIOTI - Guido SARTORI, *Chimica Generale con elementi di Inorganica*, Editrice Studium, Roma, Ristampa, 1967.

Paolo SILVESTRONI, *Fondamenti di Chimica*, Veschi Editore, Roma, 5^a ed., 1977.

Paolo CHIORBOLI, *Fondamenti di Chimica*, UTET, Torino, 1975.

John L. KICE - Elliot N. MARWELL, *Principi di Chimica Organica*, Piccin, Padova, 1969.

Robert Thornton MORRISON - Robert Neilson BOYD, *Organic Chemistry*, Allyn and Bacon, Boston, 2^a ed., 1970.

Giulio NATTA - Marco FARINA, *Stereochimica - Molecole in 3D*, EST Mondadori, Milano, 1968.

Vincenzo CAGLIOTI - Arnaldo LIBERTI, *Stechiometria*, Stabilimento Tipo-Litografico A. Ferri, Roma, 1968.

Arnaldo LIBERTI, *Stechiometria e Calcoli Chimici*, Liguori Editore, 1992.

BIBLIOGRAFIA

Paola MICHELIN LAUSAROT - G. Angelo VAGLIO, *Fondamenti di Stechiometria*, Piccin, Padova, 1988.

Giancarlo AMANDOLA - Virginio TERRENI, *Analisi Chimica Strumentale e Tecnica*, Tamburini Editore, Milano, 3^a ed., 1973.

Alexander RICH - Norman DAVIDSON (a cura di), *Structural Chemistry and Molecular Biology*, (dedicated to Linus Pauling), Freeman, 1967.

Robert H. PERRY - Cecil H. CHILTON, *Chemical Engineer's Handbook*, International Student Edition, McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo, 5^a ed., 1973.

I.D.P. WOOTTON, *Microanalisi nella Biochimica Medica*, Il Pensiero Scientifico Editore, Roma, 1976.

Susan J. KARCHER, *Laboratorio di Biologia Molecolare*, Zanichelli, Bologna, 1998.

Keith WILSON – John WALKER (a cura di), *Metodologia Biochimica*, Raffaello Cortina Editore, Milano, 2001.

Carlo DE MARCO, *Principi di Metodologia Biochimica*, Società Editrice Universo, Roma, 6^a Rist., 1986.

J. N. DAVIDSON, *Biochimica degli Acidi Nucleici*, (trad. italiana della 7^a ed. inglese), Piccin, Padova, 1973.

Giovanni GIUDICE - Vincenzo MUTOLO, *Metodi di Analisi degli Acidi Nucleici*, Piccin, Padova, 1977.

D. CAVALLINI - A. ROSSI FANELLI, *Lezioni di Chimica Biologica*, MARVES, Roma, 1968.

Eraldo ANTONINI - Paolo CERLETTI - Carlo DE MARCO - Paolo FASELLA - Bruno MONDOVI, *Guida alle esercitazioni di Chimica Biologica*, Società Editrice Universo, Roma, 1965.

AVVERTENZA

Questa è solo una *bibliografia essenziale* per chi vuole cominciare a interessarsi seriamente all'anatomia microscopica, all'istologia, all'ematologia, alla microbiologia e/o alla citologia: dovrebbe essere arricchita di altri numerosi testi specifici (di microscopia ottica, di microscopia elettronica, di istochimica, di immunofluorescenza, di istopatologia, di citopatologia, di ematologia, ecc.).

Essa è basata su testi in mio possesso e che ho usato per studio.

Ho voluto indicare per esteso - quando ciò è stato possibile - anche il nome degli Autori come piccolo segno di gratitudine a Coloro che hanno contribuito, con la loro opera, alla mia formazione, rendendoli in tal modo - a mio avviso - "persone", quasi amici che ci seguono da vicino nelle nostre attività e non solo "autori": mi riferisco, in particolare, ai "miei" professori (di tutte le "materie" scolastiche e accademiche).

Non tutti sono citati in bibliografia, ma desidero ricordare almeno Coloro che mi hanno formato nelle discipline più direttamente connesse con la microscopia, in particolare i Professori: Aldo **Cimmino**, già mio Preside di Facoltà e Docente di microbiologia, Mario **Agno** (fisica), Antonio **Ascenzi** (anatomia patologica), Antonio **Cassone** (laboratorio di microbiologia, sezioni ultrasottili e microscopia elettronica), Cesare **Cavallero** (istopatologia), Sergio **Cerquiglini** (fisiologia umana), Potito **D'Alessandro** (citopatologia e tecniche citopatologiche), Vittorio **Erspamer** (farmacologia), Paolo **Fasella** (biochimica e biologia molecolare), Francesco **Filadoro** (esercitazioni di microbiologia), Zaccaria **Fumagalli** (anatomia umana normale), Franco **Mandelli** (ematologia), Giulio **Marinozzi** (osteo-artro-miologia ed esercitazioni di anatomia), Roberto **Mastrostefano** (Istochimica), Valerio **Monesi** (istologia), Pietro **Motta** (anatomia microscopica), Alessandro **Rossi Fanelli** (biochimica), Guido **Sartori** (chimica generale, inorganica e organica), Aldo **Spirito** (biologia generale e umana).

Il mio grato pensiero va, inoltre, a tutti Coloro che, pur non essendo stati miei docenti, con le loro opere (alle quali ho attinto a piene mani) hanno contribuito alla mia formazione.

Marco Brusadin

APPENDICE

Per allertare soprattutto i principianti circa la **pericolosità delle sostanze chimiche** di uso comune negli esperimenti di microscopia, nelle pagine seguenti ho riportato alcune “schede” tratte dal sito:

<http://www.sicurezzaincasa.it/schede/solventi.htm>

Ribadisco la **necessità inderogabile di INFORMARSI** - direttamente sul sito della Ditte produttrici - circa la **pericolosità**, la **tossicità**, l'**infiammabilità** delle *sostanze chimiche* che si intende acquistare, nonché sul **modo di manipolarle**, di **conservarle**, di **smaltirle** e di **prestare l'eventuale primo soccorso**.

APPENDICE

PRODOTTO SOSTANZA E ASPETTO	XILOLO XILENE (liquido incolore)
<i>PERICOLI</i>	
ESPLOSIVO INFIAMMABILE TOSSICO CORROSIVO	VAPORI DEL SOLVENTE CON L'ARIA ALTAMENTE Irrita pelle ed occhi, i vapori creano stati confusionali NO
<i>MISURE DI SICUREZZA</i>	
STOCCAGGIO AMBIENTE DI LAVORO MISURE DI PROTEZIONE IGIENE SMALTIMENTO RIFIUTI	Tenere in contenitori sigillati in luogo asciutto, non fumare Buona ventilazione, non fumare, NESSUNA FIAMMA LIBERA PORTARE GUANTI ED OCCHIALI Usare crema protettiva, lavarsi le mani dopo il lavoro Tramite IMPRESA SPECIALIZZATA
<i>PRONTO SOCCORSO</i>	
BRUCIATURE INALAZIONE INGESTIONE OCCHI PELLE	PORTARE ALL'APERTO E RICORRERE AL MEDICO SCIACQUARSI LA BOCCA CON ACQUA E RICORRERE AL MEDICO LAVARE ABBONDANTEMENTE CON ACQUA LAVARSI CON ACQUA E SAPONE, APPLICARE CREMA

APPENDICE

PRODOTTO SOSTANZA E ASPETTO	ACETONE ACETONE, PROPANONE O DIMETILKETONE (liquidi chiari di odore dolciastro)
<i>PERICOLI</i>	
ESPLOSIVO INFIAMMABILE TOSSICO CORROSIVO	VAPORI DEL SOLVENTE CON L'ARIA ALTAMENTE Irrita pelle ed occhi, i vapori creano stati confusionali NO
<i>MISURE DI SICUREZZA</i>	
STOCCAGGIO AMBIENTE DI LAVORO MISURE DI PROTEZIONE IGIENE SMALTIMENTO RIFIUTI	Tenere in contenitori sigillati in luogo asciutto, non fumare Buona ventilazione, non fumare, NESSUNA FIAMMA LIBERA Portare guanti ed occhiali Usare crema protettiva, lavarsi le mani dopo il lavoro Tramite IMPRESA SPECIALIZZATA
<i>PRONTO SOCCORSO</i>	
BRUCIATURE INALAZIONE INGESTIONE OCCHI PELLE	PORTARE ALL'APERTO E RICORRERE AL MEDICO SCIACQUARSI LA BOCCA CON ACQUA E RICORRERE AL MEDICO LAVARE ABBONDANTEMENTE CON ACQUA LAVARSI CON ACQUA E SAPONE, APPLICARE CREMA

APPENDICE

PRODOTTO SOSTANZA E ASPETTO	ALCOLI ALCOOL ETILICO O ETANOLO (liquido incolore di odore gradevole)
<i>PERICOLI</i>	
ESPLOSIVO INFIAMMABILE TOSSICO CORROSIVO	VAPORI DEL SOLVENTE CON L'ARIA ALTAMENTE Irrita pelle ed occhi, i vapori creano stati confusionali NO
<i>MISURE DI SICUREZZA</i>	
STOCCAGGIO AMBIENTE DI LAVORO MISURE DI PROTEZIONE IGIENE SMALTIMENTO RIFIUTI	Tenere in contenitori sigillati in luogo asciutto, non fumare Buona ventilazione, non fumare, NESSUNA FIAMMA LIBERA Portare guanti ed occhiali Usare crema protettiva, lavarsi le mani dopo il lavoro Tramite IMPRESA SPECIALIZZATA
<i>PRONTO SOCCORSO</i>	
BRUCIATURE INALAZIONE INGESTIONE OCCHI PELLE	PORTARE ALL'APERTO E RICORRERE AL MEDICO SCIACQUARSI LA BOCCA CON ACQUA E RICORRERE AL MEDICO LAVARE ABBONDANTEMENTE CON ACQUA LAVARSI CON ACQUA E SAPONE, APPLICARE CREMA

APPENDICE

PRODOTTO SOSTANZA E ASPETTO	OLIO DI PARAFFINA Liquido oleoso giallastro
<i>PERICOLI</i>	
ESPLOSIVO	VAPORI DEL SOLVENTE CON L'ARIA
INFIAMMABILE	SI
TOSSICO	Irrita pelle ed occhi, i vapori creano stati confusionali
CORROSIVO	NO
<i>MISURE DI SICUREZZA</i>	
STOCCAGGIO	Tenere in contenitori sigillati in luogo asciutto, non fumare
AMBIENTE DI LAVORO	Buona ventilazione, non fumare, NESSUNA FIAMMA LIBERA
MISURE DI PROTEZIONE	Portare guanti ed occhiali
IGIENE	Usare crema protettiva, lavarsi le mani dopo il lavoro
SMALTIMENTO RIFIUTI	Tramite IMPRESA SPECIALIZZATA
<i>PRONTO SOCCORSO</i>	
BRUCIATURE	PORTARE ALL'APERTO E RICORRERE AL MEDICO SCIACQUARSI LA BOCCA CON ACQUA E RICORRERE AL MEDICO
INALAZIONE	
INGESTIONE	
OCCHI	LAVARE ABBONDANTEMENTE CON ACQUA
PELLE	LAVARSI CON ACQUA E SAPONE, APPLICARE CREMA