

STRISCI E PREPARATI PER APPOSIZIONE: OSSERVARE LE CELLULE ANIMALI SENZA TAGLIO MICROTOMICO

Lorenzo Conti, Milano¹

1. INTRODUZIONE

Nella vita di un appassionato di microscopia arriva un momento nel quale, dopo avere osservato tutto l'osservabile in una goccia d'acqua di stagno ed avere versato vasetti interi di yogurt oppure massacrato infinite cipolle ed agli, si sente il bisogno di dare un'occhiata al regno animale. Non disponendo di un microtomo risulta impossibile preparare delle sezioni sottili di tessuti animali da osservare (a meno che non si decida di divenire serial killers o "ressurrezionisti"² appare improbabile che un hobbista non anatomopatologo possa disporre di tessuti umani da processare, ma oggi tutto è possibile...). L'alternativa è acquistare i vetrini già fatti, ve ne sono anche di tessuti umani, ma, accanto a pregevoli vetrini, pur presenti sul mercato, ne esistono molti veramente inguardabili. Un vetrino troppo rosso (eosina) indica un coloricidio; la povera ematossilina (che tenta invano di fare il proprio lavoro (evidenziare nuclei e sostanze acide) grida vendetta per la sua uccisione da parte della perfida eosina che, per sovra colorazione, è stata indebitamente privilegiata a danno del colorante nucleare. Uno sbilanciamento dei colori, che dovrebbero essere "standard" secondo le varie metodiche di colorazione istologica, indica al primo sguardo un vetrino di scarsa qualità. Strappi nella fetta, arricciamenti e pieghe, scarsa rappresentatività istologica/anatomica del tessuto prescelto, fette di taglio troppo spesse, difetti di fissazione, tutto è possibile nel vasto mercato della compravendita di vetrini già allestiti.

Quali le alternative?

- Comperare vetrini di alta qualità.
- Comperare un microtomo ed imparare ad usarlo.
- Esplorare altri metodi per osservare cellule eucariotiche in strato sottile.
- Osservare cellule procariotiche (batteri) in strato sottile.

Se non si dispone di un microtomo l'unica soluzione per far passare la luce attraverso un preparato e' renderlo sottile mediante una tecnica alternativa che permetta di mantenere integre le cellule. Come vedremo in seguito tale tecnica e' quella dello **striscio**, della **apposizione** e dello **schacciamento** (utile ad esempio anche nella evidenziazione della mitosi in cellule da radichette di aglio o cipolla).

Un'avvertenza: queste note sono per stomaci forti, e parlano di sangue, muco e pipì. Richiedono il coraggio di pungersi un dito e sanguinare³. Se siete di stomaco debole potete saltare direttamente alla parte delle tecniche di apposizione. Ignorate la parte della preparazione dei vetrini per spapolamento, se non amate la milza come piatto forte.

2. METODICHE DI OSSERVAZIONE DELLE CELLULE EUCARIOTICHE

Le possibilità per il microscopista dilettante di osservare cellule umane senza "tagliare" una parte di tessuto sono derivanti essenzialmente dalla preparazione di strisci di cellule esfoliate o preparati citologici di varia provenienza (organi solidi, raccolte liquide, organi con parenchima confluyente, ecc.) od ematici. In Anatomia patologica esistono altre tecniche, come ad esempio la cito-centrifugazione⁴ la centrifugazione con striscio e la citoinclusione (fissazione/inclusione con successivo taglio microtomico di parti tissutali fluide) (cell block)⁵. Le cellule degli epiteli⁶ vanno naturalmente incontro ad un'esfoliazione, per cui, finito il proprio ciclo biologico, tendono a cadere. La forfora, spiacevole effetto

collaterale dell'aver scelto lo shampoo (o il parrucchiere) sbagliato, è una dimostrazione della caducità delle cellule umane. Forfora a parte, possiamo quindi prelevare in modo non traumatico la parte superficiale di questi strati superficiali di cellule per allestire un vetrino. Anche nelle urine vanno a finire cellule epiteliali delle vie escrettrici urinarie. Il muco nasale contiene cellule dell'epitelio nasale e talvolta dell'epitelio oro-faringeo.

Gli strisci ematici sono invece la rappresentazione "bidimensionale" di un tessuto liquido⁷, il sangue. Realizzare uno strato sottile di cellule ematiche è facile ed alla portata di tutti. Il problema è quello del reperimento di tale tessuto, se si decide di voler osservare del sangue umano. Non va dimenticato, infatti, il potenziale infettivo (soprattutto per le patologie virali trasmissibili per via ematica, epatite ed HIV per primi) del maneggiare sangue umano.

LA TECNICA DELLO STRISCIO^{8 9 10}

- Mettere una goccia di sangue di circa 4 mm di diametro ad 1-2 cm dal bordo del vetrino.
- Utilizzare un altro vetrino posto a 35-45° per spargere il sangue in avanti sul vetrino. Il vetrino "spargitore" (spreader) deve entrare in contatto con la goccia di sangue in modo da "assorbirla" per capillarità, formando un angolo diedro riempito di sangue. Muovendo il vetrino "spargitore" verso l'avanti, il sangue si sparge sul vetrino "ricevitore". La manovra va eseguita in circa un secondo, quindi non troppo velocemente. Il vetrino "spargitore" deve essere tenuto aderente al porta-oggetto "ricevitore". Meglio se il vetrino "spargitore" è di poco più stretto del vetrino su cui lo striscio verrà osservato. Si eviterà di avere i bordi dello striscio troppo aderenti al bordo del vetrino "ricevitore".
- Lo striscio va asciugato all'aria e poi fissato in metanolo 100%¹¹.
- Caratteristiche di un buon striscio: non deve coprire l'intero vetrino, non deve avere buchi e ondulazioni, l'estremità finale deve essere rettilinea, deve essere di aspetto liscio e regolare.
- La sottigliezza dello striscio dipende da: dimensione della goccia di sangue, angolo a cui si tiene il vetrino "spargitore" (maggiore è l'angolo, più sottile e breve sarà lo striscio), velocità di strisciamento.

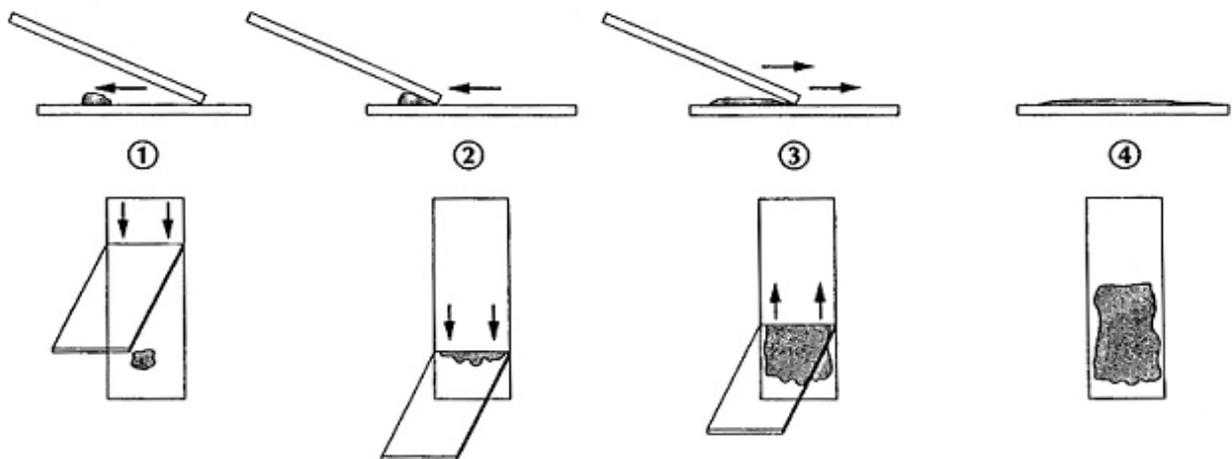


Figura 1 making good cytology smears – pull-push technique – da <http://www.cytopath.co.uk/cytologysmears.html>

Figura - Tecnica di allestimento di uno striscio citologico: il materiale aspirato o comunque raccolto viene posto sul vetrino (A), delicatamente compresso (B) e strisciato (C e D), senza un'eccessiva pressione, in modo da non alterare le cellule (modificata da Cowell, 1999).

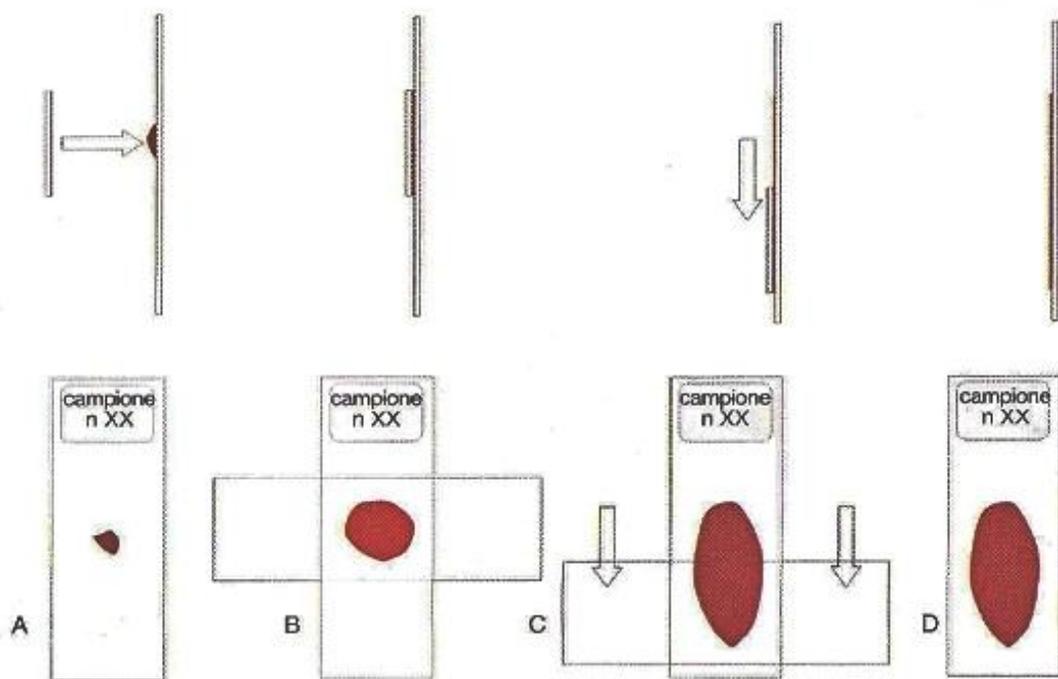


Figura 2 da: Di Candia I. – Preparazione ed allestimento dei preparati citologici.

LO STRISCIO EMATICO

Lo striscio ematico è di facile esecuzione, ma richiede del sangue non coagulato. Il dilettante di microscopia ha due possibilità; o si punge un dito¹² ed esegue lo striscio maneggiando con precauzione il **PROPRIO** sangue¹³ (non è prudente chiedere il sangue ad un amico ...) oppure utilizza il sangue di un animale. La macelleria sotto casa può fornire abbastanza materiale ricco di globuli rossi da potere realizzare numerosi vetrini.

Se ci si sente abbastanza forti da pungersi un dito (fatte salve le controindicazioni di cui si diceva in nota 2) la tecnica corretta per il prelievo ematico da puntura del dito è la seguente^{14 15}:

- Lavare le mani con sapone e acqua calda.
- Frizionare leggermente il dito per favorire l'afflusso di sangue.
- Disinfettare.
- Pungere il polpastrello o la parte laterale del dito all'ultima falange.
- Tenere la mano in basso, e spremere il dito dal palmo verso la punta. Se il sangue risulta insufficiente, aspettare un paio di secondi e spremere ancora. Non spremere vicino alla puntura.
 - Far cadere le gocce necessarie sul vetrino.
 - Disinfettare e far fermare il sangue.

Una volta deposta la goccia sul vetrino, lo striscio verrà eseguito con la tecnica descritta innanzi. I vetrini sporchi di sangue devono essere maneggiati e smaltiti come materiale potenzialmente infetto ed accuratamente disinfettati.¹⁶ Gli strisci ematici da osservare devono essere, se possibile, fissati, anche per disinfettare eventuali agenti patogeni.

- Il metanolo 100%¹⁷ e l'etanolo al 95% sono usati come fissativi per la citologia¹⁸.
- Viene anche usato il Propanolo 80% e l'isopropanolo 80%¹⁹.

Per un approfondimento dell'argomento, consiglio di leggere la bella ed esaustiva pubblicazione di Marco Brusadin dal titolo "I preparati ematologici- appunti ad uso dei microscopisti dilettanti", reperibile in <http://www.funsci.it/files/I-preparati-ematologici.pdf>.

PREPARATI PER ESFOLIAZIONE – STRISCIO BUCCALE

Quale degli appassionati di microscopia non ha desiderato eseguire un vetrino di cellule della mucosa orale da colorare con l'innocuo blu di metilene?

Tuttavia, qualche volta, i risultati non sono eccellenti, sia per un problema di colorazione che per un problema di preparazione dello striscio. Vediamo come eseguire correttamente uno striscio buccale:

- Per il prelievo è possibile utilizzare un tamponcino di cotone²⁰ (tipo cottonfioc) oppure una spatola^{21 22} od ancora la propria unghia dell'indice^{23 24} opportunamente lavata.
- Lavare la bocca per eliminare eventuali detriti.
- Asportare delicatamente dalla parete interna della guancia le cellule.
- Eseguire uno striscio su vetrino.
- Lasciare asciugare.
- Colorare con blu di metilene²⁵ 0,3% per 1 minuto.
- Lavare immergendo il vetrino in acqua sino a che non sgocciola più il blu residuo.
- Asciugare.

Una variante è quella in cui si pone una goccia di blu di metilene al centro del vetrino e poi si sparge con il batuffolo col quale si sono asportate le cellule della mucosa buccale; è sicuramente una procedura meno raffinata rispetto quella dello striscio.

Come per ogni preparato citologico, si può fissare dopo asciugatura con alcool etilico 95% o isopropilico 80%. Di solito, si ottengono buoni risultati anche semplicemente colorando senza fissazione, ma se si vuole conservare il vetrino per future osservazioni è meglio fissare.

PREPARATI PER ESFOLIAZIONE – MUCO NASALE

Normalmente, in ambito medico il prelievo di muco nasale, eseguito allo scopo di valutare la citologia delle mucosa nasale, avviene in rinoscopia²⁶. Il prelievo citologico consiste nella raccolta di cellule superficiali della mucosa nasale e ciò può essere effettuato dal medico con un tampone sterile oppure con una piccola curette (scraping) in materiale plastico monouso (Rhino-probe). Il campionamento va effettuato in rinoscopia in corrispondenza della porzione media del turbinato inferiore.²⁷

Questa è una manovra medica che l'appassionato NON deve eseguire perché richiede un'adeguata strumentazione ed una conoscenza dell'anatomia e delle possibili lesioni procurabili dalla manovra stessa.

Diverso è il prelievo di muco nasale uscito "naturalmente" dal naso durante un raffreddore. Un divertente articolo²⁸ di Joe Schuller (USA) dimostra come dal muco nasale di una persona raffreddata si possano trovare cellule cilindriche cigliate tipiche del rivestimento epiteliale del naso.

La citologia normale esfoliativa della mucosa nasale comprende:

- Cellule cilindriche cigliate (tipiche dell'epitelio delle vie respiratorie).
- Cellule mucipare (producono il muco).
- Cellule striate.
- Cellule basali.

- Sporadici leucociti neutrofili.

Un altro articolo del 1933²⁹ dettaglia la tipologia di cellule coinvolte nell'evoluzione di un normale raffreddore ed i metodi di colorazione del muco. In questo articolo viene dettagliata la metodica di prelievo del muco³⁰ che non necessita di alcuna manovra invasiva né di metodi di fissazione e colorazione:

- Soffiare il naso sopra un pezzo di carta non assorbente
- Prelevare il materiale e coprire con coprioggetto per le osservazioni intravitali (mantengono attive le ciglia delle cellule cilindriche dell'epitelio respiratorio).
Colorare intravitalmente con verde Janus per le osservazioni in vivo.
- Eseguire degli strisci fissati mediante essiccazione all'aria (o anche fissati per 3- 5 minuti in etanolo³¹).
Colorazione con Blu di Tionina per evidenziare i batteri e le fagocitosi batteriche.
Colorazione di Mallory o Wright (eosina-blu di metilene) per gli elementi cellulari (ed anche colorazione di May Grunwald Giemsa come per gli strisci ematici)³².

Anche articoli più recenti³³ della letteratura medica evidenziano la possibilità di prelevare il muco naturalmente soffiato dal paziente:

“... per raccolta di muco soffiato dal paziente su un foglio di carta paraffinata o di plastica sottile, che consenta di raccogliere il materiale espulso e trasportarlo su vetrino da microscopio. Si ha grande variabilità da campione a campione, ma si ha comunque la possibilità di determinare la presenza o l'assenza di una determinata popolazione cellulare. Si valutano solo le cellule sfaldate nel muco e talora i pazienti non riescono a produrre una quantità di materiale sufficiente ...”.

Durante un normale raffreddore la cellularità del muco nasale cambia a seconda dell'evoluzione della patologia:

1. Prime 48 ore: macrofagi e cellule epiteliali; leucociti polimorfonucleati; emazie, raramente leucociti eosinofili nei soggetti con storia di allergie.
2. Al terzo giorno i leucociti polimorfo-nucleati divengono predominanti.
3. Al quarto giorno sono presenti quasi solo polimorfo-nucleati.

L'osservazione vitale delle cellule ciliate mostra un'attività delle ciglia dovuta al distacco delle cellule, ancora vive, dalla sottomucosa. Il blu di metilene³⁴ ed il verde Janus sono coloranti intravitali.

Metodiche di colorazione³⁵ per le cellule esfoliate della mucosa nasale:

- May-Grunwald Giemsa : i vetrini fissati vengono immersi per 5 minuti in May-Grunwald, 20'-25' nel Giemsa (diluito al 10%), quindi lavati con acqua.
- Blu di toluidina: i vetrini fissati vengono immersi per 1' in Blu di toluidina 1 : 100 (pH 2.5), poi lavati con acqua.
- Ematossilina Eosina: i vetrini opportunamente preparati mediante passaggi successivi in alcol assoluto, alcol 95°, alcol 80°, vengono colorati utilizzando la colorazione EE (ematossilina di Mayer ed eosina)³⁶. La metodica è quella modificata da Jones, Stanley e Lowhagen, e Yang and Alvarez³⁷.
 - Reidratazione del vetrino con 20 immersioni (da 1 sec. ciascuna) in acqua di rubinetto.
 - Colorazione con Ematossilina di Gill - 15 immersioni.
 - Differenziazione – 20 immersioni in acqua di rubinetto.
 - Eosina Y 0,5% soluzione acquosa – 5 immersioni.
 - Acqua di rubinetto – 10 immersioni.
 - Scala degli alcoli ascendente, xilolo, montaggio in balsamo.

IL SEDIMENTO URINARIO

Centrifugando a 1200 giri un campione di urine fresche (emesse da non più di 1-2 ore) si ottiene la compattazione delle cellule e di eventuali cristalli al fondo della provetta. Le cellule ed i detriti presenti normalmente nelle urine di un soggetto sano³⁸ sono:

- Eritrociti (molto scarsi)
- Leucociti (molto scarsi)
- Cellule epiteliali squamose o pavimentose (uretra e vagina)
- Cellule epiteliali dell'urotelio (pelvi renale, uretere, vescica)
- Cilindri ialini (proteine cellulari coagulate- Tamm Horsfall - ed improntate a stampo dal lume dei tubuli renali)
- Cristalli di acido urico, ossalato di calcio, fosfato di calcio, urati amorfi, fosfati amorfi.

La colorazione (sopravvitale) del sedimento urinario evidenzia soprattutto i leucociti ed è chiamata metodica di Sternheimer-Malbin³⁹.

PREPARATI PER APPOSIZIONE⁴⁰ OD IMPRONTA

Consiste nello "stampare" come un timbro sul foglio la faccia piana di un tessuto biologico precedentemente tagliato ed asciugato sul vetrino asciutto. Le cellule adese al vetro si staccano dal tessuto e sono colorabili ed osservabili come ogni comune preparato citologico.

- Per frammenti solidi è necessario creare una faccia di taglio per avere una superficie piatta da apporre al vetrino.
- Nel caso sia molto bagnata va brevemente asciugata.
- Far aderire la faccia di taglio sul vetrino più volte e in punti diversi.
- Evitare un movimento di scivolamento durante la pressione.
- Asciugare, fissare con alcool etilico 95% per 5-6- secondi e colorare come per la normale citologia.

Ovviamente per i preparati per apposizione si troveranno sul vetrino le sole cellule che si sono staccate dal tessuto e non si avrà una immagine fedele della citoarchitettura del tessuto stesso (vasi, tralci di connettivo, ecc.)

Per la citologia medica la tecnica della apposizione può essere utilizzata per ogni tipo di tessuto (linfonodi, sistema nervoso centrale, fegato, mammella, rene, pancreas, tiroide, polmone, ecc.)¹ Si usano sia tessuti da biopsia che pezzi autoptici.

PREPARATI PER SCHIACCIAMENTO

Un frammento di tessuto viene schiacciato tra due portaoggetti e viene realizzato uno striscio spesso che viene poi fissato e colorato. In medicina umana e veterinaria questo metodo viene utilizzato per piccole biopsie del cervello⁴¹ ed altri organi molli e per la ricerca della Tichinella sp.² nelle carni per alimentazione umana. Appositi microscopi (trichinoscopi) con lastre di vetro spesse e obiettivi tarati per lo spessore dei portaoggetti o lastre da schiacciamento vennero prodotti dalle varie Case produttrici.³

¹ <http://www.asct.com/sites/default/files/Filomena%20-Touch%20Downs%20with%20Touch%20Preps%202014.pdf>

² <http://parasitewonders.blogspot.it/2008/12/>

³ <http://microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://microscopy-uk.org.uk/mag/artjul99/mdtricho.html>

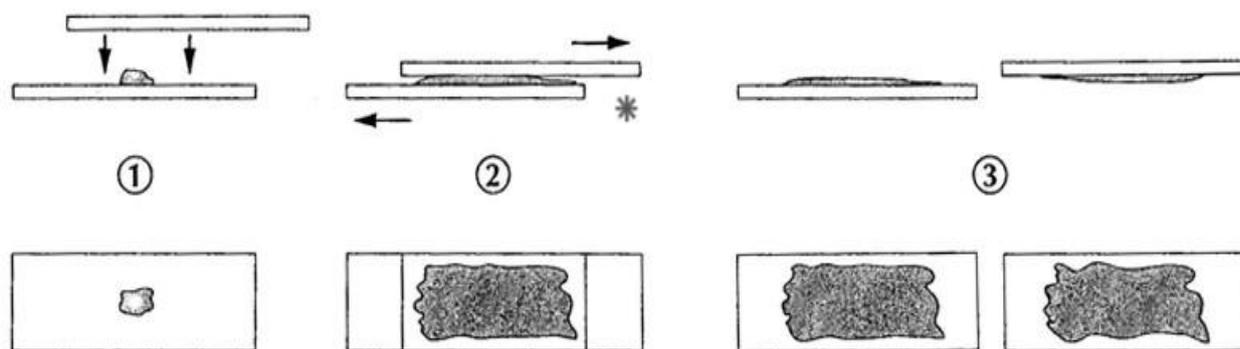


Figura 3 making good cytology smears – crush techniques – da <http://www.cytopath.co.uk/cytologysmears.html>

¹ Lorenzo Conti, Medico Chirurgo specialista in anestesia e rianimazione; avendo un lontano passato di tirocinante in un servizio di anatomia patologica ho mantenuto la passione per la microscopia ottica, preparando a casa i vetrini che amo osservare. Mettendomi nei panni del neo- microscopista sprovvisto di un microtomo, ho pensato di fornire qualche informazione sulla preparazione di vetrini animali o umani (orrore!) in casa, senza strumentazione particolare.

² Resurrezionisti – Venivano così ironicamente chiamati i ladri di cadaveri che nel '700 rifornivano le sale anatomiche private dell'Inghilterra ed Irlanda. I corpi dei detenuti giustiziati, classicamente riservati alle sale anatomiche, erano insufficienti e quindi gli anatomisti e gli studenti di medicina stipulavano contratti con la malavita per procurarsi dei cadaveri "freschi", che di solito venivano rubati dopo il seppellimento. Di questo argomento ha trattato molto bene ed estesamente la Dottoressa Lindsey Fitzharris nel proprio blog <https://thechirurgeonsapprentice.com/> - <https://thechirurgeonsapprentice.com/tag/resurrectionists/>

³ Bisogna sempre ricordarsi che il sangue può trasmettere malattie infettive gravi, quali l'epatite oppure HIV. Per i pazienti che assumono farmaci anticoagulanti o affetti da patologie della coagulazione o delle piastrine o proni ad infezioni di varia natura, la raccomandazione è di NON pungersi il dito! Un vetrino di sangue animale può perfettamente sostituire il proprio se vi è un rischio infettivo o emorragico.

⁴ <http://www.izsvepets.it/citologia-dei-fluidi-citocentrifugazione-citoinclusi/>

⁵ <https://www.slideshare.net/AnamKhurshid1/cell-block-in-cytology>

⁶ Epitelio: Il **tessuto epiteliale** è uno dei quattro tipi fondamentali di [tessuto](#) che compongono il corpo degli [animali](#). È costituito da [cellule](#) di forma regolare e quasi geometrica, che aderiscono le une alle altre. Le cellule che costituiscono il tessuto epiteliale svolgono funzioni di rivestimento, di [secrezione](#), di trasporto e di assorbimento. - https://it.wikipedia.org/wiki/Tessuto_epiteliale

⁷ <https://it.wikipedia.org/wiki/Sangue>

⁸ <https://www.uvm.edu/~jschall/pdfs/techniques/bloodsmears.pdf>

⁹ <https://www.slideshare.net/ankur16491/blood-smear-staining>

¹⁰ In laboratorio esistono almeno 3 metodi per eseguire uno striscio ematico; la classica tecnica del vetrino "spargitore" (spreader), descritta nel testo. Un'ulteriore tecnica, detta del copri-oggetto, in cui il sangue viene fatto aderire tra due copri oggetto messi a 90° l'uno rispetto l'altro e poi fatti avanzare in avanti sino a riempimento della superficie; una tecnica di citocentrifuga in cui una goccia di sangue viene posta sul copri oggetto che viene poi messo in citocentrifuga.

¹¹ Vedi la nota N 17

¹² Vedi la raccomandazione alla nota 3

¹³ Maneggiare il proprio sangue ci mette al riparo da infezioni incrociate provenienti da altre persone, ma non protegge gli altri dai nostri possibili virus e batteri. Ne deriva che la manovra di puntura e striscio va fatta da soli oppure con altre persone protette adeguatamente dal contatto e schizzo del sangue. I vetrini utilizzati sono poi sterilizzati dalla fissazione con alcool o altri fissativi, ma l'ago o la lancetta da puntura ed il cotone con cui ci si è disinfettati il dito vanno smaltiti come rifiuti potenzialmente infettivi. Ogni macchia o traccia di sangue va lavato e disinfettato accuratamente.

¹⁴ <http://www.portalediabete.org/il-diabete-tipo-1/terapia/206-automonitoraggio-della-glicemia->

¹⁵ http://sistinti01.rm.unicatt.it/infermieri/protocolli/Prelievo_di_sangue_capillare.pdf

<http://corsi.unibo.it/Laurea/InfermieristicaRavenna/Documents/Laboratorio%202/MODULO%20E/Proc.%204%20PRELIEVO%20DI%20SANGUE%20CAPILLARE.pdf>

¹⁶ La comune candeggina (ipoclorito di sodio) al 5,25% (diluata 1:10) appare efficace per la disinfezione di superfici contaminate da sangue –

http://www-3.unipv.it/scienzemotorie/wp-content/uploads/2016/11/6660DISINFEZIONE_STERILIZZAZIONE.pdf

¹⁷ Ricordarsi che il metanolo è tossico! Meglio utilizzare l'alcool etilico (etanolo).

¹⁸ <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-3-fixing-agents-other-than-the-common-aldehydes/>

¹⁹ Rapid Staining Techniques in Cytopathology: A Review and Comparison of Modified Protocols for Hematoxylin and Eosin, Papanicolaou and Romanowsky Stains Einar Jorundsson, DVM; John H. Lumsden, DVM, MSc; Robert M. Jacobs, DVM, PhD2 Veterinary Clinical Pathology Vol. 28 | No. 3 | 1999

²⁰ CYTOLOGIC SMEARS FROM THE MOUTH CELLULAR CHANGES IN DISEASE AND AFTER RADIATION HANNAH PETERS, M.D. This paper was presented (in part) at the Third International Congress of Clinical Pathology, Brussels, Belgium, July 1957.

²¹ <http://nch.adam.com/content.aspx?productid=117&pid=1&gid=003414>

²² <https://www.ucsfbenioffchildrens.org/tests/003414.html>

²³ <https://fankhauserblog.wordpress.com/2001/07/11/buccal-smear/>

²⁴ Nel caso si utilizzi la propria unghia, il materiale raccolto sotto il letto ungueale va deposto sul vetrino per "strizzamento" dell'unghia contro il polpastrello facendo scendere sul vetrino il contenuto.

²⁵ In farmacia è possibile acquistare il blu di metilene soluzione acquosa FU all'1% (metiltioninio cloruro).

²⁶ Endoscopia nasale con fibroscopio flessibile.

²⁷ La citologia nasale nell'approccio diagnostico-terapeutico delle riniti vasomotorie in età pediatrica - Matteo Gelardi, Massimo Landi - Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica 05- 2011 pagg. 28-34

²⁸ <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artmay05/jscold.html>

²⁹ Perrin H. Long, Eleanor A. Bliss, and Harriet M. Carpenter - STUDIES UPON THE NASAL SECRETIONS - THE CELLULAR CONTENT OF THE NASAL SECRETIONS IN ACUTE DISEASE OF THE RESPIRATORY TRACT- [J Clin Invest.](#) 1933 Nov; 12(6): 1127–1134

³⁰ "...The secretions were gained by having the subject blow his nose upon a clean piece of non-absorbent brown paper and from the nasal discharge preparations were made upon glass slides covered with dried neutral red and Janus green for "supra vital" studies. Permanent preparations were made by evenly smearing the discharge upon clean glass slides and permitting it to dry in the air..."

³¹ La citologia nasale nell'approccio diagnostico-terapeutico delle riniti vasomotorie in età pediatrica Matteo Gelardi, Massimo Landi Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica 05- 2011 pagg. 28-34.

³² Idem

³³ Vittorio Ricca Giorgio Ciprandi – La citologia nasale nella pratica clinica – brochure UCB Pharma

³⁴ https://en.wikipedia.org/wiki/Supravital_staining

³⁵ Vittorio Ricca Giorgio Ciprandi – La citologia nasale nella pratica clinica – brochure UCB Pharma

³⁶ Rapid Staining Techniques in Cytopathology: A Review and Comparison of Modified Protocols for Hematoxylin and Eosin, Papanicolaou and Romanowsky Stains Einar Jorundsson, DVM; John H. Lumsden, DVM, MSc; Robert M. Jacobs, DVM, PhD2 Veterinary Clinical Pathology Vol. 28 | No. 3 | 1999

³⁷ Dipping rather than passive immersion enhances staining and reduces the time needed in each solution. One slow dip equals one dip per second. The number of dips into each solution may be adjusted according to user preference.

³⁸ <https://www.sipmel.it/it/riviste/articolopdf.php/257>

³⁹ SOLUTION 1

crystal violet 3 g

ammonium oxalate 0.8 g

95% ethanol 20 mL

distilled water 80 mL

SOLUTION 2:

safranin O 1 g

95% ethanol 40 mL

distilled water 400 mL

Mix, then filter, 3 parts of solution 1 and 97 parts of solution 2. The mixture keeps for three months, filtering every two weeks (the stock solutions keep indefinitely).

⁴⁰ Kamatchi V, Babu NA, Sankari SL, Rajesh E. - Imprint cytology - [J Pharm Bioallied Sci.](#) 2015 Apr; 7(Suppl 1): S207–S208.

⁴¹ PERIKALA V. KUMAR, M.D., M.I.A.C., ANDA. MONABBATI, M.D - CRUSH PREPARATION CYTOLOGIC FINDINGS OF CNS TUMORS: A STUDY OF 199 CASES - Medical Journal of the Islamic Republic of Iran Volume 12 Number 2 Summer 1377 August 1998 - [Aparna R. Dikondwar](#), [Aarti A. Dani](#), [Saroj A. Gaikwad](#), [Shilpa P. Tathe](#), [Archana A. Randale](#), [Sanjay M. Chawhan](#), and [Dinkar T. Kumbhalkar](#) - Utility and challenges in intraoperative consultation of spinal lesions by crush smear cytology - [Asian J Neurosurg.](#) 2016 Apr-Jun; 11(2): 129–13 - [Acta Cytol.](#) 2006 Nov-Dec;50(6):608-16. - [Iqbal M¹](#), [Shah A](#), [Wani MA](#), [Kirmani A](#), [Ramzan A](#). Cytopathology of the central nervous system. Part I. Utility of crush smear cytology in intraoperative diagnosis of central nervous system lesions.