

EMATOS VET LAB srl

Esame istologico presso Lab San Marco

Linee guida

Istopatologia

Vi segnaliamo che per ottenere una valutazione dei margini, ad es. in caso di rimozione di sospette masse tumorali, si deve richiedere tale prestazione già in fase iniziale di richiesta (ovvero richiedere "esame istopatologico con valutazione dei margini"). La valutazione dei margini impone un aumento del costo della lettura istopatologica.

Abbiamo preparato anche delle istruzioni relative all'invio di campioni multipli provenienti dallo stesso paziente (vedi sotto)

I campioni cutanei, per lo studio di malattie non neoplastiche, vanno richiesti seguendo un percorso dedicato compilare modulo (vedi sotto)

Anche la preparazione di un campione destinato all'istopatologia è un atto medico di grande importanza. Come dimenticare il famoso detto "garbage in - garbage out" ? Ovvero: se il campione è inadatto o mancano dati, difficilmente l'istopatologo potrà preparare un referto professionale e fruttuoso. Di seguito sono elencati tutti i punti fondamentali per la buona riuscita di un esame istopatologico:

1) I campioni non devono essere di grandi dimensioni. Se il tessuto d'origine è voluminoso inviarne una o più porzioni rappresentative. E' senz'altro preferibile che sia il medico veterinario che ha manipolato il pezzo chirurgico che "decida" qual'è la porzione più rappresentativa piuttosto che l'istopatologo, che dovrà scegliere a suo arbitrio, su un campione assai differente rispetto a quello originale (coartato/retrato, con alterazioni cromatiche etc.)

2) Possono essere inviati più prelievi separati, oppure anche nello stesso contenitore, a patto che siano opportunamente contraddistinti (fili, punto di sutura, ago infisso), riportando nel modulo di richiesta indicazioni precise e riferimenti per ogni campione. Si consiglia ovviamente di indicare il numero di campioni inviati.

3) Dopo il campionamento i prelievi devono essere posti il più rapidamente possibile in adeguata quantità di formalina al 10% (corrispondente ad una soluzione di formaldeide al 4%)

4) La quantità di formalina deve permettere una completa e rapida fissazione del campione (rapporto ottimale tra il volume di formalina e il campione di 9:1 e 10:1). Importante: ricordare che la formalina non può penetrare per più di 0.5 cm al giorno all'interno del campione. Ne consegue che campioni di eccessive dimensioni (o fissati con scarsa formalina) saranno solo parzialmente fissati (= esaminabili) e ampliamento

autolisati (non esaminabili). Dopo adeguata fissazione è ragionevole utilizzare barattoli da trasporto che contengano anche minime quantità di formalina.

5) Il barattolo va accuratamente chiuso per evitare perdite di liquido.

6) Il contenitore deve riportare esternamente, in modo chiaro, il cognome del proprietario e il tessuto d'origine.

7) Al atto della richiesta compilare sempre i dati richiesti. Si prega di riportare il maggior numero di indicazioni cliniche possibile. E' fondamentale un completo segnalamento dell'animale ed un'esaustiva descrizione morfologica della lesione e dei suoi tempi di evoluzione, delle modalità di campionamento. Se tali dati mancheranno o saranno riportati in modo insufficiente è probabile che il referto da noi preparato sarà generico e non ne verrà sfruttato il potenziale diagnostico.

8) Una particolare attenzione deve essere destinata alla valutazione dei margini: in molti stati proliferativi è fondamentale avere informazione sull'eventuale presenza di elementi neoplastici nel margine chirurgico. Il patologo potrà fornire questa indicazione solo se richiesta e se il medico veterinario presenterà informazioni sufficienti riguardo a cosa esaminare. In altri termini deve essere il medico veterinario a segnalare in quali punti richiede un'osservazione microscopica per la valutazione dei margini. Tali aree dovranno essere ben segnalate all'istopatologo, con punti di sutura, coloranti specifici o anche normale inchiostro di china o infine una soluzione 1:1 di acetone ed inchiostro di china. Si ricorda che i costi dell'esame istopatologico sono forzatamente superiori rispetto all'esame istopatologico "tradizionale".

9) I tempi di risposta attesi sono di 4-5 gg. lavorativi dal ricevimento del campione. Attualmente non è possibile un'esecuzione in tempi inferiori o "d'urgenza". Possono essere richiesti 1-2 gg. in più se per ragioni di accuratezza diagnostica si rendano necessarie delle colorazioni speciali aggiuntive (PAS, Congo-Red), blù di toluidina), oppure l'esecuzione di ulteriori sezioni all'EE.

10) Dopo il ricevimento del risultato, sono benvenuti commenti e richieste di chiarimenti, ai quali verrà data pronta risposta. Per qualsiasi comunicazione, puntualizzazione o precisazione contattate telefonicamente o per e-mail

indicazioni per l'invio di campioni multipli per l'esame istopatologico

Riportiamo di seguito un breve prospetto sui costi degli esami istopatologici nel caso in cui vengano inviati più campioni.

A- Viene addebitato il costo di un solo campione nel caso vengano inviati:

1. Fino a 3 campioni, di dimensioni non superiori ai 3 cm, provenienti da un solo paziente.
2. Biopsie, anche più numerose di 3
 - a. Provenienti dallo stesso organo di uno stesso paziente
 - b. Ottenute da uno stesso paziente mediante esame endoscopico (es. biopsie di piccole dimensioni prelevate durante l'esame endoscopico dell'apparato digerente).

B- Viene addebitato il costo di un campione

- a. Per ogni 3 biopsie provenienti da uno stesso stesso paziente e diverse da quanto indicato nel punto 2 del paragrafo A.
- b. Per ogni 3 organi esaminati provenienti dall'esame necroscopico di uno stesso paziente.

C- Nel caso in cui venga richiesta la valutazione dei margini di campioni neoplastici il costo dell'esame istopatologico è maggiorato. Questa maggiorazione è legata alla particolare preparazione a cui deve essere sottoposto il campione per una corretta valutazione.

esame dei margini nei campioni istopatologici

Uno dei principali interventi terapeutici nel caso di neoformazioni neoplastiche è la loro escissione chirurgica.

L'esame dei margini è pertanto di fondamentale importanza per determinare l'adeguatezza dell'intervento chirurgico. Come margine chirurgico si intende il tessuto asportato più lontano dalla sede della lesione e che si trovava adiacente a quanto ancora presente in vivo.

La lettura dei margini è importante per qualsiasi tipo di neoplasia e tanto più per quelle che hanno un elevato carattere infiltrativo locale, che si traduce in un alto potenziale di recidiva, come ad esempio i mastocitomi o i sarcomi dei tessuti molli (miopericitoma, fibrosarcoma etc.). Essi, infatti, presentano un comportamento localmente aggressivo, si propagano, spesso, lungo i setti del tessuto adiposo, a volte dando luogo a neoformazioni satelliti. E' importante sottolineare che la presenza di cellule neoplastiche lungo i setti non è valutabile tramite palpazione, pertanto è importante che in questi tumori, l'escissione chirurgica venga eseguita con ampi margini. In tal modo, è possibile ipotizzare la possibilità o meno di recidiva della neoplasia.

Per quanto riguarda l'asportazione di neoformazioni splancniche la valutazione dei margini ha ragione d'essere in caso di asportazioni parziali d'organo, come ad esempio nelle lobectomie polmonari o epatiche, mentre nelle splenectomie le neoformazioni ivi comprese sono da ritenersi completamente escisse. Lo stesso discorso vale per le neoformazioni mammarie. L'asportazione di una linea mammaria, infatti, è considerata una vera e propria asportazione d'organo; inoltre in tale caso verranno valutati i linfonodi presenti.

Invio del campione per la valutazione dei margini.

Al fine di rendere possibile il lavoro per il patologo è assolutamente necessario segnalare adeguatamente i margini di escissione per rendere orientabile il campione; in questo modo anche il clinico saprà con esattezza quale dei margini indicati è o meno interessato dalla lesione e potrà poi prendere i provvedimenti necessari (es. pulizia del margine chirurgico).

I margini chirurgici d'interesse possono essere segnalati in diversi modi, tra i più comuni e di semplice esecuzione si ricordano la marcatura con inchiostro di china e l'apposizione di punti di sutura.

Si ricorda che compilando la richiesta nella pagina web dedicata devono essere sempre indicati e spiegati i metodi con cui vengono inviati i margini chirurgici.

Di seguito vengono illustrati due dei metodi più comuni ed efficaci per la marcatura dei margini e l'orientamento del campione.

Inchiostro di china

L'uso dell'inchiostro è utile poiché i margini sono così visibili sia macroscopicamente che microscopicamente, inoltre può essere utilizzato anche per segnalare le regioni della lesione di maggiore interesse;

L'inchiostro può essere applicato prima o dopo la fissazione del campione; è comunque consigliabile eseguire prima della fissazione tale operazione, dato che la fissazione in formalina può portare alterazioni strutturali del campione che possono rendere difficile l'individuazione dei margini reali.

I passaggi da seguire sono i seguenti:

- Dopo l'asportazione porre il campione su carta assorbente per farlo asciugare prima di applicare l'inchiostro.
- Usare colori diversi per i diversi margini
- Meglio evitare inchiostro blu e rosso perché potrebbero confondersi con ematossilina ed eosina
- Applicare l'inchiostro con un pennellino o un cotton fioc solo sulle regioni di interesse, non immergere il campione nell'inchiostro
- Fare asciugare l'inchiostro sul campione prima di metterlo in formalina.

Punti di sutura

I punti di sutura devono essere messi in numero diverso nei diversi margini.

Ad esempio nella scheda si dovrà scrivere: " si invia neoformazione con richiesta di valutazione dei margini che sono così indicati: un punto nel margine craniale, due punti nel margine destro, e tre punti nel margine sinistro. (il margine caudale è pertanto quello privo di punti) ".

Nell'applicare i punti si faccia attenzione a non danneggiare il tessuto.

Taglio del campione

Una volta pervenuto in laboratorio, in seguito alla registrazione del campione e nelle mani del patologo, esso verrà sottoposto al cosiddetto 'trimming' che corrisponde al sezionamento sotto cappa del campione e al suo inserimento nelle apposite biocassette.

Il taglio del campione per valutare i margini chirurgici utilizzato in medicina veterinaria è quello a croce che permette di valutare margine profondo e i 4 margini laterali del campione.

Per le masse di maggiori dimensioni vengono eseguiti dei tagli aggiuntivi paralleli ai precedenti, random, al fine di valutare un'area maggiore del campione.

In alternativa a tali metodi i margini possono essere valutati se viene asportato il 'letto' su cui poggiava la lesione in vivo. L'assenza della lesione in tale tessuto si tradurrà nell'assenza di lesione in vivo.

Tessuti speciali

Esistono delle sedi di asportazioni di lesione che non permettono la valutazione dei margini con il classico taglio a croce, come i tumori scheletrici e quelli localizzati negli organi cavi. Nel primo caso vengono eseguite delle sezioni in corrispondenza del tessuto molle e del tessuto osseo adiacente al margine chirurgico. Nel secondo, verranno eseguite sezioni trasversali dei margini di escissione chirurgici e sezioni trasversali della massa e del tessuto ad essa subito contiguo.

In caso di neoformazioni splancniche la valutazione dei margini può essere eseguita solo in caso di asportazioni parziali d'organo, come ad esempio nelle lobectomie polmonari o epatiche. In caso di splenectomie le neoformazioni ivi comprese, sono da ritenersi completamente escisse.

Le mastectomie sono considerate delle asportazioni d'organo. Se viene asportata la fila mammaria completa non è necessario eseguire una valutazione dei margini dei noduli in essa compresa; a seconda del tipo di neoplasia che verrà identificata, il clinico dovrà adottare dei provvedimenti specifici; il patologo, comunque, oltre al tessuto neoplastico e apparentemente sano della fila inviata, valuterà il tessuto linfonodale ivi compreso. In caso di nodulectomie il campione verrà trattato come qualsiasi altro nodulo cutaneo/sottocutaneo.

Infine si ricorda di specificare sempre e in modo dettagliato il metodo utilizzato per segnalare i margini di escissione chirurgica in modo tale che il patologo possa segnalare adeguatamente al chirurgo dove, se necessario, dover intervenire per eseguire una 'pulizia dei margini'.

immunoistochimica

L'esame immunoistochimico, viene effettuato per evidenziare un determinato antigene, espresso nel tessuto in esame, sfruttando un legame con un anticorpo specifico (da qui il suffisso immuno -). Si utilizzano sezioni istologiche successive e seriate direttamente dallo stesso blocchetto già utilizzato per l'esame istologico.

In pratica viene selezionato un anticorpo specifico, detto anticorpo primario che, posto sulla sezione

istologica ad un'opportuna diluizione, si lega agli antigeni tissutali da visualizzare. Tale legame, viene poi visualizzato mediante successive reazioni enzimatiche, normalmente di per ossidasi particolari o di fosfatasi alcalina, che permettono di fare precipitare un colorante, detto cromogeno, sul sito di legame tra l'anticorpo primario ed l'antigene tissutale, rendendolo visibile.

Questa tecnica, nel flusso diagnostico, risulta spesso essenziale perché, tramite il legame antigene - anticorpo, si possono visualizzare le diverse componenti della cellula in esame tanto che, con un pannello adeguato, si può ottenere un fenotipo cellulare abbastanza preciso da poter classificare l'origine della cellula stessa.

Di seguito riportiamo i pannelli di anticorpi più comunemente utilizzati in sede diagnostica:

Neoplasia indifferenziata maligna

In questo caso, il quadro istologico è tale per cui non è possibile definire con certezza la cellula (epiteliale vs mesenchimale) di origine della neoplasia. In verità, tale caso, è assai raro. Più comunemente, la necessità di indagare la cellula di origine della neoplasia, si ha quando tra le differenziali è posta anche la diagnosi di melanoma amelanotico molto indifferenziato: quest'ultima neoplasia è infatti molto pleomorfa e non così raramente responsabile di dubbi diagnostici.

citocheratina AE1/AE3 – Vimentina – Melan A – S100 (verrà sostituito con PNL2)

Neoplasia epiteliale

Nel caso del carcinoma, il tessuto di origine è chiaro (epitelio), ma talora, nei carcinomi originanti a livello cutaneo, si pone la necessità di evidenziare la citocheratina maggiormente espressa da parte delle cellule neoplastiche, in modo da poter definire l'origine follicolare pilifera rispetto a ghiandolare (normalmente, in corso di carcinoma con elevata componente solida a cellule basali). Il medesimo pannello può essere sfruttato anche nel caso di carcinomi, a prominente componente solida, che coinvolgano gli organi del cavo addominale o toracico, come per esempio i tumori epatici, pancreatici o, talora originanti nello spazio retro peritoneale.

Citocheratina AE1/AE3 – Citocheratina 7– citocheratina 8/18

Neoplasie neuroendocrine e neuroepiteliali

le neoplasie di origine neuroendocrina o endocrina, presentano talora, soprattutto quando sono comprese in organi interni, difficoltà diagnostiche nei riguardi dei carcinomi a piccole cellule, soprattutto.

In questo caso il pannello immunistochimico proposto è:

citocheratina AE1/AE3, cromogranina A, NSE, sinaptofisina

Neoplasia a cellule rotonde

In questo caso non è definibile, sulla solo base istologica, la cellula neoplastica di origine, per cui vi è la necessità di differenziare la possibile origine linfoide o istiocitaria della neoplasia

CD3-CD20-Lisozima-CD45RA

Neoplasia di origine linfoide

In questo caso la diagnosi è ristretta ad una forma linfomatosa, tuttavia, su base morfologica, non è possibile sempre stabilire se un linfoma sia di tipo T o B

CD3-CD20

Mastocitoma

Negli ultimi anni, questa neoplasia, specialmente nella specie canina è stato oggetto di numerose indagini, tanto che ne è stata proposta, di recente, una nuova classificazione (Kiupel et al.).

immunoistochimicamente, le indagini che si possono effettuare per il mastocitoma, riguardano

l'espressione di triptasi, [il pattern di espressione di CD 117 \(c-kit\)](#) e l'espressione di [Ki67 \[vedi la pagina dedicata alla valutazione di questa proteina nucleare, novita' 2013\]](#).

Il profilo isto/immunoistochimico per il mastocitoma comprende la triptasi mastocitaria, il [CD117 \(c-Kit\)](#) e il [Ki67](#)

Sarcoma vs Melanoma

il melanoma specialmente se amelanotico spesso presenta caratteristiche citomorfologiche ed architetturali sovrapponibili a molte neoplasie mesenchimali, per cui si rende necessaria un approfondimento immunoistochimico tramite anticorpi specifici quali Melan A, PNL2 o S100 e vimentina.

Sarcomi sottocutanei

I sarcomi sottocutanei sono, tra i tumori di origine mesenchimale, quelli che più frequentemente presentano pleomorfismo nonché caratteristiche morfologiche in parte sovrapponibili e che quindi devono essere differenziate mediante immunoistochimica. Tra queste si pongono spesso problemi differenziali, nel cane, tra i tumori della parete vascolare e delle guaine dei nervi periferici. In particolare i primi appaiono spesso esprimere proteine contrattili tipici della muscolatura liscia, come Actina muscolare liscia, mentre i secondi reagiscono assai di frequente ad S 100 e, più raramente, ma più specificamente, con GFAP. In questo

caso il pannello proposto è il seguente:

Vimentina, Actina, GFAP, S100

Sarcomi di origine endoteliale

Sebbene raramente, nel corso del flusso diagnostico istologico, i tumori vascolari possono presentare alcuni aspetti morfologici tali da rendere dubbia la diagnosi. Questo è il caso, ad esempio, delle neoplasie vascolari, dermiche o, al contrario, normalmente originanti profondamente, nella muscolatura scheletrica, che presentano aspetto epitelioide, cioè con cellule fittamente stipate, in modo tale da mimare quasi un tessuto solido. In tali casi si rende necessaria una loro differenziazione tramite colorazione immunoistochimica.

In particolare, normalmente, alcuni aspetti di angiosarcomi dermici, devono far considerare come seconda diagnosi differenziale quella di una forma istiocitaria o melanocitaria. In tali casi il pannello proposto è:

- emangiosarcoma- neoplasia istiocitaria-neoplasia melanocitaria

vimentina, CD 31, lisozima

Gli angiosarcomi al contrario localizzati nella muscolatura, spesso presentano come problema differenziale quello di un sarcoma dei tessuti molli della fascia o muscolari. In tale caso il pannello proposto è:

- emangiosarcoma- rhabdomiosarcoma

vimentina, CD 31, desmina, actina sarcomerica

Sarcomi muscolari

Le neoplasie di origine muscolare spesso presentano morfologia simile, soprattutto quando queste sono maggiormente indifferenziate. In questi casi è utile differenziare l'origine delle cellule neoplastiche tra muscolari lisce e muscolari striate. Le cellule muscolari hanno un fenotipo simile tra loro, sia per quanto riguarda la muscolatura liscia che striata, tuttavia, alcune proteine sono espresse solo nel muscolo striato, ed altre, come la actina (proteina contrattile coinvolta nell'attività della cellula muscolare), presentano differenti isoforme nelle due diverse cellule muscolari. La differenziazione fenotipica delle cellule muscolari, può quindi essere basata su un pannello di anticorpi in grado di riconoscere le diverse isoforme delle proteine contrattili, oppure determinare la presenza di proteine tipiche del muscolo striato.

Il pannello suggerito, nei presenti casi è

Actina muscolare liscia, Actina sarcomerica, Desmina.

Leiomioma – Tumore gastrointestinale stromale (GIST)

In molti casi, le neoplasie di origine muscolari lisce (leiomioma), che originano a livello dell'apparato gastrointestinale, nel cane, presentano morfologia simile ad un'altra neoplasia, che si sviluppa nell'ambito

della parete enterica: il tumore gastrointestinale stromale. Questa neoplasia a cellule fusate, origina da elementi cellulari sparsi nello stroma della sottomucosa: le cellule di Cajal. Queste cellule hanno un particolare fenotipo, che comprende l'espressione di S100 e, soprattutto, c-kit. L'utilizzo di anticorpi in grado di marcare tali molecole permette, quindi la differenziazione tra GIST e leiomiosarcoma.

Il pannello immunohistochimico suggerito, in questo caso è: actina muscolare liscia, S100, [c-Kit](#)

Si ricorda che l'esame immunohistochimico viene eseguito mediante sezioni istologiche successive e seriate direttamente dallo stesso blocchetto già utilizzato per l'esame istologico

dermatoistopatologia

Biopsia cutanea ed esame istopatologico

Al fine di aumentare l'utilità diagnostica delle biopsie cutanee è stato preparato un apposito [modulo di richiesta](#), vedi sotto. Nel modulo sono presenti sezioni relative ai segni clinici cutanei (presenza/assenza di prurito, tipo e distribuzione delle lesioni), alle terapie eseguite e, se formulate, alle diagnosi differenziali. Si richiede inoltre di specificare il numero, le sedi e le tecniche dei prelievi (con punch/bisturi/altro).

A questo modulo di richiesta segue un modulo di refertazione specifico per la dermatopatologia. Nel modulo vengono riassunti i dati anamnestici principali presenti nella richiesta e vengono descritti i campioni ricevuti (Descrizione macroscopica). Dopo la descrizione delle lesioni (Descrizione microscopica) si riassumono le lesioni osservate (Diagnosi morfologica) ed infine vengono aggiunte alcune informazioni (Commenti) relative alla diagnosi o alle diagnosi differenziali, intese come le cause più probabili delle lesioni osservate.

Nella sezione Commenti può essere suggerita l'esecuzione di ulteriori indagini utili per restringere il numero delle diagnosi differenziali ed arrivare quindi alla diagnosi definitiva. Entro breve, queste indagini potranno essere richieste nell'Area Riservata, dove ne verrà indicato il costo. Frequentemente si tratta di [indagini istochimiche](#), rappresentate da colorazioni speciali utili a visualizzare microrganismi quali batteri (Gram), inclusi micobatteri (Ziehl-Neelsen), o miceti (Grocott). Inoltre può essere suggerita l'esecuzione di indagini immunohistochimiche o biomolecolari, queste ultime al fine di ricercare la presenza di microrganismi ([Biologia molecolare per malattie infettive](#)). Meno frequentemente può essere consigliata l'esecuzione di prove microbiologiche (esame micologico e/o batteriologico) su campioni freschi. A questo scopo si suggerisce di consultare la sezione [Raccolta e conservazione esami microbiologici](#).

Si ricorda che la refertazione in dermatopatologia richiede almeno 7 giorni lavorativi dalla consegna del campione al laboratorio.

istochimica

Le colorazioni istochimiche si basano sulla capacità di particolari reagenti presenti nei tessuti di legarsi selettivamente a determinate sostanze in base alla loro affinità reciproca.

Grazie ai metodi istochimici è possibile evidenziare la presenza di agenti eziologici, definire la natura di matrici/sostanze extra o intracellulari e stabilire, ad esempio, il grado di fibrosi tissutale.

Si ricorda che le colorazioni istochimiche ed immunoistochimiche vengono effettuate a partire dai blocchetti in paraffina ottenuti dai campioni biotici fissati in formalina. Vi preghiamo di tenere conto che le indagini di IHC sono complesse e le refertazioni vengono prodotte dal Laboratorio entro 15 gg. dalla richiesta.

Segue un elenco delle sostanze rilevate dalle colorazioni speciali disponibili e delle loro applicazioni in caso di patologie specifiche o sedi d'organo particolari:

- Granuli mastocitari (Blu di Toluidina)
- Pigmento melanico (Fontana)
- Pigmento Biliare (Fouchet Van Gieson)
- Sostanza mixoide/mucina (Alcian Blu)
- Rame (Wilson disease stain)
- Ferro- ferrico (Perl's)
- Mielina e fosfolipidi (Luxol fast blue)
- Tessuto connettivo (Tricromica di Masson)
- Fibre elastiche (Weigert Van Gieson)
- Funghi (Grocott)
- Batteri (Gram)
- Micobatteri (Ziehl Neelsen)
- Spirochete (Warthin Starry)
- Sostanza amiloide (Rosso Congo)
- Pannello per flogosi granulomatose/pio granulomatose (ricerca funghi, micobatteri e batteri)(Grocott, Ziehl Neelsen, Gram)
- Pannello per biopsie renali (PAS, PASM, AFOG-tricromica di Masson): stabilire tipo di glomerulonefrite e grado di fibrosi interstiziale
- Pannello per biopsie epatiche in caso di glicogenosi vs lipofuscinosi (PAS e PAS diastasi)