



Η ώρα της διαγνωστικής...

Θυμηθείτε πως...

Ψάλλα Δ.

Κτηνίατρος, PhD, Λέκτορας,
Εργαστήριο Παθολογικής
Ανατομικής, Τμήμα Κτηνιατρικής,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Α.Π.Θ.

Η διαχείριση των ιστολογικών δειγμάτων από τον κλινικό κτηνίατρο από την λήψη τους έως το ιστοπαθολογικό εργαστήριο

> Εισαγωγή

Ο κατάλληλος χειρισμός των ιστών από την δειγματοληψία έως και την άφιξή τους στο εργαστήριο όπου θα πραγματοποιηθεί η ιστοπαθολογική εξέτάσή τους είναι σημαντικός ώστε να αποφευχθούν αυτολυτικά φαινόμενα και σφάλματα τεχνικής κατά τους χειρισμούς που θα μπορούσαν να κάνουν δυσκολότερη ή και αδύνατη τη διάγνωση. Στην ερμηνεία, επίσης, των ιστοπαθολογικών ευρημάτων συμβάλλουν, μερικές φορές καθοριστικά, οι πληροφορίες που προσκομίζονται από τον κλινικό κτηνίατρο. Σε κάθε περίπτωση, το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα επιτυγχάνεται όταν υπάρχει συνεργασία ιστοπαθολόγου και κλινικού κτηνιάτρου γεγονός που προϋποθέτει έναν κοινό κώδικα επικοινωνίας. Παρακάτω παρατίθενται πληροφορίες για τον ενδεδειγμένο τρόπο μονιμοποίησης/συντήρησης και αποστολής/μεταφοράς δειγμάτων ιστών που λαμβάνονται με σκοπό την ιστοπαθολογική εξέταση.

> Μονιμοποίηση ιστών

Για την πλήρη και καλή παρατήρηση των ιστολογικών τομών είναι απαραίτητη η κατάλληλη και πλήρης μονιμοποίηση του ιστού.

Η μονιμοποίηση είναι απαραίτητη διότι:

- **Προλαμβάνει** την αυτόλυση και την ανάπτυξη βακτηρίων.
- **Διατηρεί** την προ του θανάτου αρχιτεκτονική δομή των ιστών.
- **Επιφέρει** τη σκλήρυνση των μαλακών ιστών-ιστοτεμαχίων και έτσι γίνονται πιο εύκολοι οι περαιτέρω χειρισμοί των ιστών.

- **Διατηρεί** ή και ενισχύει τις απαιτούμενες ιδιότητες των ιστών για τη μετέπειτα εφαρμογή βιολογικών και χημικών χρώσεων.

Για την επίτευξη των παραπάνω θα πρέπει ο ιστός να τοποθετείται στο μονιμοποιητικό υγρό αμέσως μετά την λήψη του.

Η επιλογή του μονιμοποιητικού προσδιορίζεται από το σκοπό για τον οποίο ο ιστός θα υποστεί επεξεργασία και θα χρωσθεί ή θα διατηρηθεί. Το διάλυμα ουδέτερης φορμόλης (βλέπε παρακάτω) είναι το κυρίως χρησιμοποιούμενο υγρό διότι είναι συμβατό με πολλές χρωστικές.

Για την μονιμοποίηση χρησιμοποιούνται διάφορα χημικά υγρά ή φυσικοί παράγοντες όπως:

1. Αλδεΰδες π.χ. φορμαλδεϋδη, γλουταραλδεϋδη.
2. Οξειδωτικοί παράγοντες π.χ. τετροξειδίο του οσμίου, υπερμαγγανικό κάλιο.
3. Χημικά μετουσίωσης-πήξης πρωτεϊνών (πηκτικοί παράγοντες) π.χ. οξικό οξύ, μεθυλική αλκοόλη, αιθυλική αλκοόλη.
4. Φυσικοί παράγοντες π.χ. θερμότητα, μικροκύματα (φούρνος μικροκυμάτων), ψύξη.
5. Άλλοι παράγοντες π.χ. χλωριούχος υδράργυρος, πικρικό οξύ.

Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη μονιμοποίηση είναι:

- **Η συγκέντρωση H⁺**: Ικανοποιητική μονιμοποίηση pH: 6-8.
- **Η θερμοκρασία (Θ)**: κατάλληλη είναι η θερμοκρασία δωματίου (αν οι ιστοί μονιμοποιούνται για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο η θερμοκρασία προσδιορίζεται μεταξύ 0-4° C).

Διεύθυνση αλληλογραφίας:

Εργαστήριο Παθολογικής
Ανατομικής
Τμήμα Κτηνιατρικής,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Α.Π.Θ.
54124, Θεσσαλονίκη
τηλ.: 2310 999931
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο:
dpsalla@vet.auth.gr





- **Η διεισδυτικότητα:** Η διεισδυτικότητα των συνήθων μονιμοποιητικών είναι αργή ή περιορισμένη. Συνεπώς μεγάλα ιστοτεμάχια δεν μονιμοποιούνται επαρκώς ιδιαίτερα στο κέντρο της μάζας τους με επακόλουθο οι διαδικασίες της αυτόλυσης να συνεχίζονται.
- **Η ωσμωτικότητα.**
- **Η συγκέντρωση-πυκνότητα του διαλύματος:** Το συχνότερα χρησιμοποιούμενο μονιμοποιητικό υγρό, είναι το ουδέτερο διάλυμα φορμόλης σε πυκνότητα 10% (βλέπε: μονιμοποίηση "Ενέργειες στην κτηνιατρική πράξη").
- **Η χρονική διάρκεια μονιμοποίησης:** Η διάρκεια μονιμοποίησης εξαρτάται από το μέγεθος των ιστοτεμαχίων, το είδος του ιστού και το είδος του μονιμοποιητικού. Συνήθως επαρκούν 24-48 ώρες. Προσοχή: η παρατεταμένη παραμονή του ιστού στη φορμόλη προκαλεί συρρίκνωσή του και καταστροφή ορισμένων αντιγόνων.
- **Η σχέση όγκου διαλύματος υγρού / όγκο ιστού:** Ο όγκος του μονιμοποιητικού υγρού πρέπει να είναι τουλάχιστον δεκαπλάσιος του όγκου του ιστοτεμαχίου.

> Ενέργειες στην κτηνιατρική πράξη

Μονιμοποίηση

1. Αν η λήψη βιοψιών γίνεται για **ιστοπαθολογική εξέταση-διάγνωση ρουτίνας**, ο ευκολότερος τρόπος μονιμοποίησης είναι η χρήση **διαλύματος φορμόλης 10%**. Δηλαδή, αραιώνουμε το εμπορικό σκεύασμα "φορμόλη" (formol ή formalin), με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:10.

Διάλυμα φορμόλης 10%

Φορμόλη (37-40% Formaldehyde)	100 ml
Απεσταγμένο νερό (Distilled water)	900ml

Διευκρινίζεται ότι ο εμπορικός και χρησιμοποιούμενος όρος "φορμόλη", αναφέρεται σε διάλυμα περίπου 37-40% αερίου φορμαλδεΐδης σε νερό με προσθετικό 10-15% μεθανόλη για πρόληψη πολυμερισμού.

Αν έχουμε την δυνατότητα επιλέγουμε να μονιμοποιήσουμε-συντηρήσουμε τον ιστό σε ουδέτερο (ρυθμιστικό) διάλυμα φορμόλης:

10% ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης (Neutral buffered formalin)

Φορμόλη (37-40% Formaldehyde)	100 ml
Απεσταγμένο νερό (Distilled water)	900ml

Μονοβασικό φωσφορικό νάτριο
(Sodium dihydrogen phosphate Dihydrate,
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 4 g

Διβασικό φωσφορικό νάτριο, άνυδρο

(di-sodium hydrogen phosphate anhydrous,
 Na_2HPO_4) 6,5 g

2. Αν η λήψη βιοψιών γίνεται για **ερευνητικούς σκοπούς** είναι επιβεβλημένο η μονιμοποίηση ή η συντήρηση των δειγμάτων να γίνεται σε **ουδέτερο (ρυθμιστικό) διάλυμα φορμόλης**. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται ώστε να αποφευχθεί η παρατεταμένη διάρκεια μονιμοποίησης η οποία οδηγεί σε συρρίκνωση του ιστού αλλά και καταστροφή ορισμένων αντιγόνων.
3. Αν τα ιστολογικά δείγματα προορίζονται για εξέταση με **ανοσοφθορισμό** αλλά και σε περιπτώσεις που της ιστοπαθολογικής εξέτασης ενδέχεται να ακολουθήσει **ανοσοϊστοχημική εξέταση** (π.χ. σε λεμφώματα για T- , B- λεμφοκύτταρα, ανίχνευση αντιγόνων ιών, δείκτες κακοήθειας κλπ.) θα πρέπει να γίνεται συνεννόηση με το ιστοπαθολογικό εργαστήριο προορισμού των δειγμάτων για τον καθορισμό του τρόπου μονιμοποίησης που πρέπει να εφαρμοσθεί αφού ως γνωστό κάποια αντιγόνα καταστρέφονται σε διαλύματα φορμόλης, ενώ πολλά αντισώματα αντιδρούν μόνο σε τομές ψύξεως (cryosections). Στις περιπτώσεις αυτές πρέπει και πάλι να αποφεύγεται η παρατεταμένη διάρκεια μονιμοποίησης η οποία οδηγεί σε καταστροφή αντιγόνων.
4. Αν η ιστοπαθολογική εξέταση πρόκειται να γίνει σε **τομές ψύξεως** ο ιστός ψύχεται σε υγρό άζωτο. Τα ιστοτεμάχια τοποθετούνται σε αλουμινόχαρτο και εμβυθίζονται για ένα λεπτό στο **υγρό άζωτο**. Στη συνέχεια και μέχρι να αποσταλούν διατηρούνται σε βαθειά κατάψυξη (Θ: -60 έως -80 °C).
5. Αν ο ιστός πρόκειται να εξεταστεί στο **ηλεκτρονικό μικροσκόπιο** επιλέγουμε να μονιμοποιήσουμε-συντηρήσουμε τον ιστό σε γλυταραλδεΐδη 4% ή παραφορμαλδεΐδη 10%. Τα παραπάνω διαλύματα διατηρούνται σε ψύξη (Θ: ~4°C).
6. Σε περιπτώσεις **"επείγουσας βιοψίας"** (διενέργεια της εξέτασης κατά τη διάρκεια του χειρουργείου) ο ιστός τεμαχίζεται σε λεπτά τεμάχια και μονιμοποιείται σε ειδικό αλκοολούχο διάλυμα π.χ. διάλυμα Clark's ή μονιμοποιητικό Carnoy's ή γίνεται μονιμοποίηση σε κατάψυξη ή σε φούρνο μικροκυμάτων.

Διάλυμα Clark (Clark's solution)

Απόλυτη αλκοόλη (Absolute alcohol)	75 ml
Κρυσταλλικό οξικό οξύ (Glacial acetic acid)	25 ml

Μονιμοποιητικό Carnoy (Carnoy's fixative)





Απόλυτη αλκοόλη (Absolute alcohol)	60 ml
Χλωροφόρμιο (Chloroform)	30 ml
Κρυσταλλικό οξικό οξύ (Glacial acetic acid)	10 ml

> Επισημάνσεις όσο αφορά στη διαχείριση των μονιμοποιητικών υγρών και την επιλογή των δοχείων ιστών

- Η μονιμοποίηση θα πρέπει να γίνεται αμέσως μετά τη λήψη του ιστού ώστε να αποφευχθούν οι αυτολυτικές αλλοιώσεις. Στις περιπτώσεις που δεν είναι δυνατή η άμεση μονιμοποίηση των ιστολογικών δειγμάτων θα πρέπει να διατηρούνται σε περιβάλλον με υγρασία (τα τυλίγουμε σε γάζα εμποτισμένη σε φυσιολογικό ορό) και να τοποθετούνται το συντομότερο δυνατό στο μονιμοποιητικό υγρό.
- Για την μονιμοποίηση και μεταφορά των δειγμάτων να μην χρησιμοποιούνται περιέκτες με στενό στόμιο καθώς οι ιστοί με τη μονιμοποίηση γίνονται σκληροί και χάνουν την ελαστικότητά τους με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η εξαγωγή τους από τον περιέκτη.
- Αν στο διάλυμα φορμόλης διαπιστώσουμε την παρουσία λευκών κροκίδων αυτό σημαίνει ότι έχει μειωθεί η ισχύς του και είναι ακατάλληλο για χρήση.
- Οι χειρισμοί μας με τα μονιμοποιητικά υγρά (αλδεύδες → φορμόλη) πρέπει να είναι προσεκτικοί λόγω της τοξικότητάς τους. Δεν πρέπει να έρχονται σε επαφή με το δέρμα ή τους βλεννογόνους μας ή να εισπνέονται. Σε περίπτωση ατυχήματος ξεπλύνουμε με άφθονο νερό και σε πιο σοβαρές καταστάσεις επικοινωνούμε με το κέντρο δηλητηριάσεων.



α

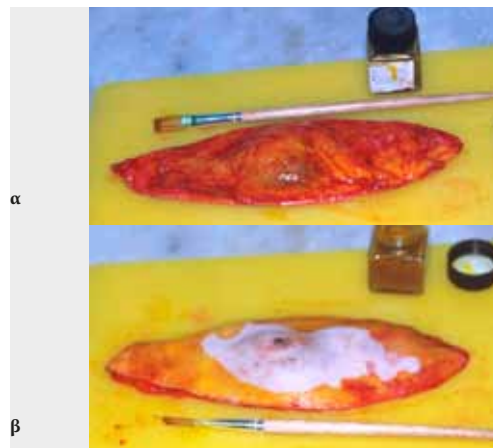


β

Εικόνα 1 (α, β). Μεγάλα ιστοτεμάχια ή ολόκληρα όργανα χαράσσονται σε βάθος ώστε να επιτυγχάνεται επαρκής μονιμοποίηση χωρίς να αλλοιώνεται η συνολική εικόνα τους.

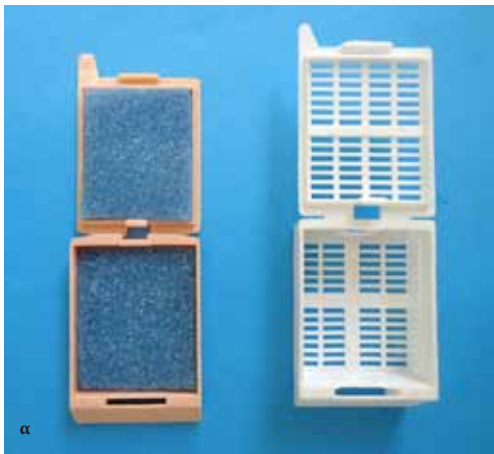
> Διαχείριση ιστών, οργάνων ή ιστοτεμαχίων

- Επειδή, όπως προαναφέρθηκε, η διεισδυτικότητα των μονιμοποιητικών υλικών είναι περιορισμένη, μεγάλα ιστοτεμάχια δεν μονιμοποιούνται επαρκώς ιδιαίτερα στο κέντρο τους, με επακόλουθο οι διαδικασίες αυτόλυσης να συνεχίζονται. Για αποτελεσματική μονιμοποίηση, τα ιστοτεμάχια πρέπει να έχουν πάχος μικρότερο από 1-2cm (ιδανικό πάχος μικρότερο του 0,5 cm). Καθώς, όμως, είναι σημαντικό ο παθολογοανατόμος να έχει τη συνολική εικόνα του ιστού που εξαιρέθηκε και να επιλέγει ο ίδιος τα ιστοτεμάχια που θα εξεταστούν, είναι προτιμότερο τα μεγάλα ιστοτεμάχια να **χαράσσονται** σε βάθος, ώστε να διευκολύνεται ο εμποτισμός τους, **χωρίς όμως να διατέμνονται πλήρως** (Εικόνα 1α, β). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στις περιπτώσεις των νεοπλασμάτων, όπου στις απαιτούμενες εξετάσεις είναι και ο **έλεγχος των χειρουργικών χειλέων** του ιστού που εξαιρέθηκε, ώστε να διερευνηθεί αν η εξαίρεση του ήταν επαρκής (ολική). Ιδανικά, στις περιπτώσεις που απαιτείται ο έλεγχος των χειρουργικών χειλέων, τα όρια της μάζας που εξαιρέθηκε θα πρέπει να χρωματίζονται με ειδική μελάνη (Εικόνα 2α, β). Έτσι, σε περίπτωση διατομής του ιστοτεμαχίου, είναι δυνατή η αναγνώριση των εξωτερικών ορίων του.
- Όταν το **μέγεθος του ιστού** που εξαιρέθηκε είναι **εξαιρετικά μεγάλο** ή πρόκειται για **ολόκληρο όργανο** (π.χ. σπλήνας, μαστός) ώστε να είναι αδύνατη η μεταφορά του χωρίς να τεμαχιστεί, είναι σημαντικό να αποστέλλεται στο ιστοπαθολογικό εργαστήριο φωτογραφία ή απλό σχηματογράφημα, στα οποία να επισημαίνονται το μέγεθος του ιστοτεμαχίου πριν τη διατομή του και το σημείο από όπου έχει λη-



Εικόνα 2 (α: κάτω επιφάνεια, β: άνω επιφάνεια). Για τον έλεγχο των χειρουργικών χειλέων, τα όρια της μάζας που εξαιρέθηκε χρωματίζονται με ειδική μελάνη. (Από το αρχείο του Αν. Καθηγητή Α. Παπάζογλου)

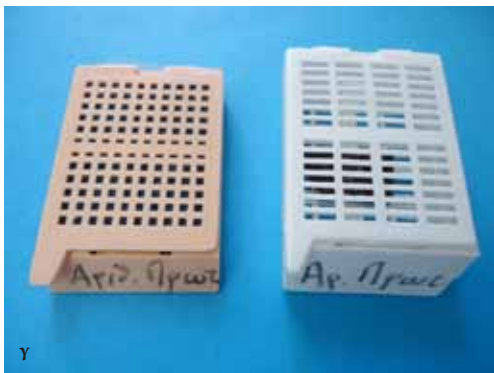




α



β



γ



δ

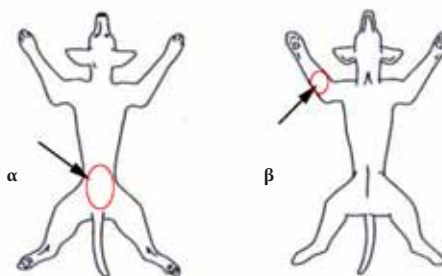
Εικόνα 3 (α, β, γ, δ). Ιστοτεμάχια πολύ μικρού μεγέθους τοποθετούνται στο μονιμοποιητικό υγρό μέσα σε ειδικές κασετίνες.

- φθεί το δείγμα που αποστέλλεται.
- Όταν το **μέγεθος του ιστού** που εξαιρέθηκε είναι **εξαιρετικά μικρό** (μυελός των οστών, διαδερμική βιοψία ήπατος, βιοψίες νεφρού, ενδοσκοπικές βιοψίες ρινικού ή γαστρικού βλεννογόνου, κλπ.) συστήνεται τα ιστοτεμάχια να τοποθετούνται στο μονιμοποιητικό υγρό τυλιγμένα σε διηθητικό χαρτί ή σε ειδικές για το σκοπό αυτό κασετίνες (Εικόνα 3α, β, γ, δ).
- Αν τα ιστοτεμάχια που αφαιρέθηκαν καλύπτονται από μεγάλη ποσότητα αίματος συστήνεται να ξεπλένονται με φυσιολογικό ορό πριν τοποθετηθούν στο μονιμοποιητικό υγρό καθώς η παρουσία του αίματος καθυστερεί τη διαδικασία της μονιμοποίησης. Εναλλακτικά συστήνεται η απόρριψη της φορμόλης μετά από 24 ώρες και η τοποθέτηση νέας.
- Ειδικά για τις βιοψίες δέρματος, είναι σημαντικό να αποστέλλεται στο ιστοπαθολογικό εργαστήριο ένα απλό σχηματογράφημα στο οποίο να επισημαίνονται τα σημεία από όπου έχουν ληφθεί τα δείγματα καθώς και οι περιοχές στις οποίες εντοπίζονται οι αλλοιώσεις (Εικόνα 4α,β).

> Ειδικές περιπτώσεις ιστών

Οστά

Η **μονιμοποίηση των οστών** γίνεται σε διάλυμα



Εικόνα 4 (α, β). Υπόδειγμα σχηματογραφήματος στο οποίο επισημαίνονται τα σημεία από όπου έχουν ληφθεί τα δείγματα (βέλη) καθώς και οι περιοχές στις οποίες εντοπίζονται οι αλλοιώσεις (κύκλοι).





φορμόλης, όπως και για τους υπόλοιπους ιστούς. Η διαδικασία αφαλάτωσης επακολουθεί της μονιμοποίησης και γίνεται στο ιστοπαθολογικό εργαστήριο 2 περίπου ημέρες μετά την μονιμοποίηση σε φορμόλη.

Σε περιπτώσεις **ακρωτηριασμού** που ζητείται η ιστοπαθολογική εξέταση του οστού, αφαιρούνται το δέρμα και τα μαλακά μέρη που το περιβάλλουν και επιλέγεται το ιστοτεμάχιο του οστού που επιθυμούμε να εξεταστεί. Αν αυτό δεν είναι δυνατό να γίνει άμεσα στο χειρουργείο, διατηρούμε το ακρωτηριασμένο άκρο σε ψύξη (4 °C) μέχρι να πραγματοποιηθεί η αφαίρεση των γύρω ιστών.

Μήτρα

Στις περιπτώσεις ωοθυκυστερεκτομής στις οποίες αποστέλλεται για παθολογοανατομική εξέταση ολόκληρη η **μήτρα**, διατένουμε τα δύο κέρατα μόνο στην πλάγια επιφάνειά τους, ώστε να παραμένουν ενωμένα στο σώμα της, και στη συνέχεια, εάν πρόκειται για μήτρα μεγάλου ζώου, χαράσσουμε εγκάρσια τα κέρατα ανά 1-1,5 cm.

Έντερο

Τα προς εξέταση ιστοτεμάχια του εντέρου μπορεί να είναι τεμάχια που ελήφθησαν ενδοσκοπικά ή να αποτελούν τμήματα του εντέρου που προήλθαν από εντεροτομή ή εντερεκτομή. Οι **βιοψίες του εντέρου** που ελήφθησαν ενδοσκοπικά, οι οποίες είναι συνήθως μεγέθους κεφαλής καρφίτσας, πρέπει να τοποθετούνται μεταξύ φύλλων διηθητικού χαρτιού ή σε ειδικές κασετίνες και ευθύς αμέσως στο μονιμοποιητικό υγρό. Όσο αφορά σε τμήματα του εντέρου που έχουν ληφθεί μετά από **εντερεκτομή**, δύο τρόποι προτείνονται για τη διαχείρισή τους: 1) Στο τμήμα του εντέρου που έχει αποκοπεί απομακρύνουμε το περιεχόμενο δι-οχετεύοντας προσεκτικά φυσιολογικό ορό με μια σύριγγα χωρίς βελόνα. Στη συνέχεια γεμίζουμε το έντερο με φορμόλη και το τοποθετούμε σε δοχείο φορμόλης. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η σύμπτωση των τοιχωμάτων του και η καταστροφή των λαχνών. Μετά τη μονιμοποίηση γίνονται τομές του εντέρου είτε επιμήκεις είτε εγκάρσιες. 2) Το τμήμα του εντέρου που έχει αποκοπεί διανοίγεται με ψαλίδι κατά μήκος της πρόσφυσης του μεσεντερίου. Το ανοικτό πλέον τμήμα του εντέρου ξεπλένεται προσεκτικά ώστε να απομακρυνθεί το περιεχόμενό του και καθηλώνεται σε τεμάχιο φελλού με το βλεννογόνο προς τα επάνω (Εικόνα 5) και στη συνέχεια τοποθετείται στο μονιμοποιητικό υγρό. Με αυτόν τον τρόπο το τμήμα του εντέρου παραμένει επίπεδο. Σε αντίθετη περίπτωση συσπάται ο μυϊκός χιτώνας και το έντερο αναδιπλώνεται.



Εικόνα 5. Ιστοτεμάχιο εντέρου: μετά την εντερεκτομή το τμήμα του εντέρου διανοίγεται και καθηλώνεται σε τεμάχιο φελλού.

Μύες

Η καθήλωση ιστού σε τεμάχιο φελλού ή σε γλωσσοπίεστρο είναι επιβεβλημένη και στην περίπτωση βιοψίας μύος, διότι η σύσπασή του επικάλυπτε τυχόν υπάρχουσες αλλοιώσεις. Η καθήλωση πρέπει να γίνεται κατά την κατεύθυνση των μυϊκών ινών (Εικόνα 6). Εναλλακτικά, εμβαπτίζεται το ιστοτεμάχιο σε φυσιολογικό ορό για 15-30 λεπτά, ώστε να μειωθούν τα αποθέματα γλυκογόνου και μετά τοποθετείται στη φορμόλη.

Όρχεις

Όταν η ιστοπαθολογική εξέταση των **όρχεων** γίνεται για ερευνητικούς σκοπούς ή και σε περιπτώσεις που επιδιώκεται η εκτίμηση των χαρακτηριστικών των σπερματικών κυττάρων (π.χ. αζωοσπερμία/ολιγοσπερμία) επιλέγουμε να μονιμοποιήσουμε τον ιστό σε διάλυμα *Bouin* (*Bouin's solution*).

Διάλυμα Bouin (Bouin's solution)

Κορεσμένο υδατικό διάλυμα πικρικού οξέως (Saturated aqueous picric acid solution)	75ml
Φορμόλη (37-40% Φορμαλδεύδη)	25ml
Κρυσταλλικό οξικό οξύ (Glacial acetic acid)	5ml

Το διάλυμα Bouin έχει μεγάλη διεισδυτικότητα και αφήνει τον ιστό μαλακό.



Εικόνα 6. Ιστοτεμάχιο μύος: οι βιοψίες μύων καθηλώνονται σε τεμάχια φελλού κατά την κατεύθυνση των μυϊκών ινών.





> Διαχείριση ιστών και οργάνων νεκρού ζώου

Σε περιπτώσεις όπου η λήψη οργάνων και ιστών, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ιστοπαθολογική εξέταση, γίνεται από νεκρό ζώο ο τρόπος διαχείρισής τους είναι ο ίδιος όπως περιγράφηκε μέχρι τώρα. Παρακάτω περιγράφεται ο τρόπος διαχείρισης του εγκεφάλου.

Εγκέφαλος

Ο νευρικός ιστός εμφανίζει πολύ σύντομα μεταθανάτιες αυτολυτικές μεταβολές, οι οποίες είναι δύσκολο να διακριθούν από πρόσφατες αλλοιώσεις εκφύλισης. Έτσι για καλύτερα αποτελέσματα θα πρέπει ο εγκέφαλος να τοποθετείται σε μονιμοποιητικό υγρό ευθύς αμέσως μετά την εξαίρεσή του από το κρανίο. Η τελευταία μάλιστα ενέργεια πρέπει να προηγείται οποιασδήποτε άλλης εξέτασης οργάνων σε περιπτώσεις που υπάρχει ιστορικό αλλοιώσεων του εγκεφάλου. Η αλατούχος φορμόλη είναι το μονιμοποιητικό επιλογής στην προκειμένη περίπτωση επειδή ο ιστός παραμένει μαλακός εξωτερικά και έτσι αυξάνεται η διεισδυτικότητα της φορμόλης. Μετά από 24 ώρες απορρίπτεται η φορμόλη, ο εγκέφαλος τεμαχίζεται εγκάρσιως σε τμήματα πάχους 1 cm περίπου και τοποθετείται σε νέα φορμόλη για τελική μονιμοποίηση.

10% διάλυμα αλατούχου φορμόλης

Φορμόλη (37-40% Formaldehyde)	100 ml
Χλωριούχο νάτριο (Sodium chloride, NaCl)	90 gr
Νερό βρύσης (Tap water)	900ml

> Παραπεμπτικό για ιστοπαθολογική εξέταση

Στο παραπεμπτικό πρέπει να αναφέρονται:

- Τα στοιχεία του ζώου (ηλικία, φύλο, φυλή).
- Το ιστορικό (εκτός από τη συμπτωματολογία να αναφέρεται και αν έχει γίνει θεραπεία και τι είδους καθώς αυτή ενδέχεται να επηρεάζει την ιστοπαθολογική εικόνα).
- Η κλινική διάγνωση ή διαφορική διάγνωση.
- Αποτελέσματα άλλων εξετάσεων (π.χ. ακτινολογικός, υπερηχοτομογραφικός έλεγχος και ιδιαίτερα αποτελέσματα κυτταρολογικών εξετάσεων ή προηγούμενων ιστοπαθολογικών εξετάσεων). Η παροχή αυτών των πληροφοριών, συμβάλει στη σωστή διάγνωση και επομένως στην καλύτερη προστασία της υγείας του ζώου.
- Ο τρόπος λήψης του δείγματος (ολική εκτομή, μερική εκτομή, λήψη βιοψίας, αναρρόφηση κτλ.) και εάν αποστέλλεται ολόκληρο το ιστο-

τεμάχιο που αφαιρέθηκε ή μόνο τμήμα αυτού. Αν η λήψη των βιοψιών έχει γίνει ενδοσκοπικά ή σε περιπτώσεις που έχει χρησιμοποιηθεί διαθερμία, αυτό πρέπει να επισημαίνεται ώστε να μην παρερμηνευτούν τυχόν βλάβες του ιστού που προκλήθηκαν από τους χειρισμούς.

- Η ημερομηνία λήψης-μονιμοποίησης των ιστολογικών δειγμάτων.

> Αποστολή

- Τα δοχεία με τους ιστούς σε διαλύματα φορμόλης πρέπει να τοποθετούνται σε κιβώτιο με επαρκή ποσότητα απορροφητικού υλικού (π.χ. χαρτί) ώστε να αντιμετωπιστούν τυχόν διαρροές. Το ίδιο ισχύει και για τα διαλύματα γλουταραλδεϋδης και παραφορμαλδεϋδης. Στην περίπτωση που, της αποστολής των δειγμάτων έχει προηγηθεί παραμονή τους για τουλάχιστον 24-48 h σε μονιμοποιητικό υγρό δεκαπλάσιου όγκου, είναι δυνατό τα δείγματα να τοποθετηθούν σε περιέκτη και με μικρότερη ποσότητα μονιμοποιητικού υγρού ώστε να διευκολυνθεί η μεταφορά και να αποφευχθούν διαρροές του υγρού. Η αποστολή του υλικού γίνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Οι ιστοί που έχουν καταψυχθεί τοποθετούνται σε πλαστικό περιέκτη που έχει προψυχθεί και στη συνέχεια σε κιβώτιο από φελιζόλ που περιέχει επαρκή ποσότητα ξηρού πάγου. Επισημαίνεται ότι μεταφέρεται υλικό σε ξηρό πάγο.
- Οι περισσότερες εταιρείες μεταφοράς αναλαμβάνουν την αποστολή των δειγμάτων. Σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτείται η σύνταξη βεβαίωσης ότι το βιολογικό υλικό που μεταφέρεται δεν είναι μολυσματικό και επικίνδυνο για τη δημόσια υγεία, κάτι που όντως ισχύει για ιστούς σε διαλύματα φορμόλης.

> Προτεινόμενη βιβλιογραφία

1. Kamstock DA, Ehrhart EJ, Getzy DM, Bacon NJ, Rassnick KM, Moroff SD, Liu SM, Straw RC, McKnight CA, Amorim RL, Bienzle D, Cassali GD, Cullen JM, Dennis MM, Esplin DG, Foster RA, Goldschmidt MH, Gruber AD, Hellmén E, Howerth EW, Labelle P, Lenz SD, Lipscomb TP, Locke E, McGill LD, Miller MA, Mouser PJ, O'Toole D, Pool RR, Powers BE, Ramos-Vara JA, Roccabianca P, Ross AD, Sailasuta A, Sarli G, Scase TJ, Schulman FY, Shoieb AM, Singh K, Sledge D, Smedley RC, Smith KC, Spangler WL, Stefcik B, Stromberg PC, Valli VE, Yager J, Kiupel M; American College of Veterinary Pathologists' Oncology Committee. Recommended guidelines for submission, trimming, margin evaluation, and reporting of tumor biopsy specimens in veterinary surgical pathology. *Vet Pathol* 2011, 48: 19-31.
2. Bancroft J, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 5th edn. Churchill Livingstone.

> Ευχαριστίες

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Β. Ψύχα για τις συμβουλές, τις προτάσεις του καθώς και την επίβλεψη του όλου κειμένου.





Time for diagnostics...

Remember how...

Psalla D.

DVM, PhD, Lecturer, Laboratory of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Sciences, A.U.Th.

Tissue handling by the practitioner; from collection to submission of the sample to the histopathology lab

> Introduction

Proper handling of tissue samples from their collection to their submission to the histopathology lab is crucial, so that autolysis (self-digestion) and technical errors, that would render the diagnosis difficult or even impossible, can be avoided. Furthermore, the information provided by the practitioner sometimes contributes decisively to the interpretation of the histopathological findings. In any case, the best possible result is achieved when there is collaboration between the practitioner and the histopathologist, implying a common frame of reference in communication. Below is detailed information about the appropriate fixation/preservation and submission/shipping of tissue samples that are obtained for histopathological examination.

> Tissue fixation

Appropriate and adequate fixation of the tissues is required for an efficient histological observation.

Fixation is essential because:

- It **prevents** autolysis and bacterial decomposition.
- It **stabilizes** tissue architecture of the original living state.
- It **hardens** the soft tissues, facilitating further processing.
- It **maintains** or even enhances the properties of tissue that are required for subsequent biological and chemical staining.

In order to achieve the above, the tissue should

be placed in the fixative immediately after its collection.

The choice of fixative is determined by the purpose for which the tissue will be processed and stained or preserved. Neutral formalin solution (see below) is the most commonly used fixative because it allows further staining of tissue with a variety of reagents.

Fixation requires the use of chemical or physical agents such as:

1. Aldehydes e.g. formaldehyde, glutaraldehyde.
2. Oxidizing agents e.g. osmium tetroxide, potassium permanganate.
3. Chemical protein denaturing agents (coagulants) e.g. acetic acid, methanol, ethanol.
4. Physical agents e.g. heating, microwaving, freezing.
5. Other agents e.g. mercuric chloride, picric acid.

Factors affecting fixation:

- **Hydrogen ion concentration:** Optimum fixation pH: 6-8.
- **Temperature (T):** fixation at room temperature is sufficient (for electron microscopy the appropriate temperature for fixation is 0-4°C).
- **Penetrance:** The penetrance of common fixatives is slow or limited. If specimens are very large the fixative cannot penetrate and reach the center of the sample. As a result autolysis may occur in the center of thick tissues.
- **Osmolarity.**
- **Concentration of fixative:** The most

Correspondence:

Laboratory of Pathology
Faculty of Veterinary Medicine,
School of Health Sciences, A.U.Th.
54124, Thessaloniki
tel.: +30 2310 999931
E-mail address:
dpsalla@vet.auth.gr





commonly used fixative is neutral formalin 10%. (see: fixation “in practice”).

- **Duration of fixation:** The fixation time required depends upon the size of the sample, the nature of the tissue and the type of the fixative. Standard fixation time is 24-48 hours. Caution: over fixation of tissue in formalin causes its shrinkage and impairs tissue reactivity.
- **Volume ratio of fixative to tissue:** The fixative volume should be at least ten times the tissue volume.

> In practice

Fixation

1. When the tissue is collected for **routine histological evaluation**, the most commonly used fixative is formalin 10%. To achieve the above concentration the commercial product “formol” or “formalin” has to be diluted with distilled water in 1:10.

10% formalin solution

Formol (37-40% Formaldehyde)	100 ml
------------------------------	--------

Distilled water	900ml
-----------------	-------

It is noted that the commercially used term “formol” refers to a solution of about 37-40% formaldehyde gas in water with the addition of 10-15% methanol stabilizer to suppress polymerization.

If possible, it is best to use neutral buffered formalin for the fixation of the sample.

10% Neutral buffered formalin

Formol (37-40% Formaldehyde)	100ml
------------------------------	-------

Distilled water	900ml
-----------------	-------

Sodium dihydrogen phosphate Dihydrate (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	4 g
---------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Di-sodium hydrogen phosphate anhydrous (Na ₂ HPO ₄)	6,5 g
----------------------------------------------------------------------------	-------

2. When biopsy is performed for **research purposes**, it is imperative that the tissue is fixed and maintained in **neutral buffered formalin solution**. It is critical to avoid prolonged fixation, because this would cause shrinkage of the tissue and destruction of certain antigens.
3. When the tissue is collected for **immunofluorescence** or in case that **immunohistochemical examination** may be performed after the histopathological evaluation (e.g. in case of T- or B-cell lymphoma, detection of viral antigens or indicators of malignancy etc), the practitioner

should contact the histopathology lab for determination of the fixation agent, since some antigens are destroyed in formalin-fixed tissues, while others can be detected only in cryosections. In such cases, it is again critical to avoid prolonged fixation because it impairs tissue reactivity.

4. If the histopathological examination will be performed in **frozen sections**, the tissue must be frozen in liquid nitrogen. For this purpose, the tissue is wrapped in aluminum foil and immersed in **liquid nitrogen** for one minute. Then it must be kept frozen (T: -60 to -80 °C) until it is admitted to the laboratory.
5. If the tissue is going to be examined using **electron microscopy**, it should be fixed and maintained in glutaraldehyde 4% or paraformaldehyde 10%. The above solutions are stored under refrigeration (T: ~4°C).
6. In cases of “**emergency biopsy**” (performance of the examination intra-operatively) the tissue is sliced into thin pieces and is fixed in special alcohol solution e.g. Clark’s solution or Carnoy’s fixative or it is fixed by freeze fixation or microwave heating.

Clark’s solution

Absolute alcohol	75 ml
------------------	-------

Glacial acetic acid	25 ml
---------------------	-------

Carnoy’s fixative

Absolute alcohol	60 ml
------------------	-------

Chloroform	30 ml
------------	-------

Glacial acetic acid	10 ml
---------------------	-------

> Comments regarding the management of the fixative solutions and the choice of the tissue containers

- Tissues must be fixed immediately after collection, in order to avoid autolysis. When immediate fixation is not possible, tissues should be preserved in humid conditions (wrapped in gauze soaked with saline) and placed as soon as possible in the fixative.
- Containers used for fixation and shipping of samples must be wide-mouthed because fixation makes tissues firm and inelastic and thus impossible to be taken out of a narrow container after they are fixed.
- If the formalin solution develops white flocs, this means it has lost its efficiency and should be discarded.
- Fixatives (aldehydes → formol) should be



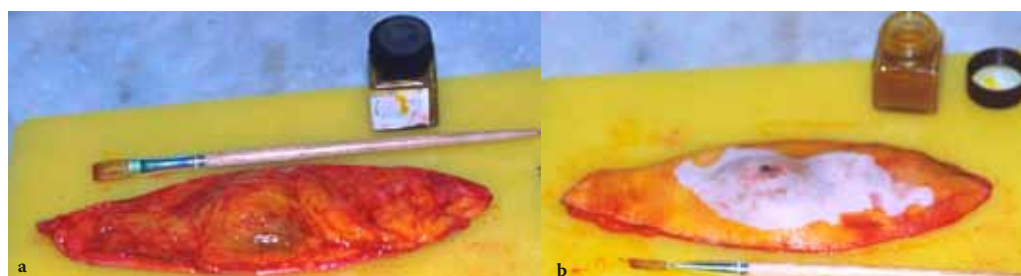


Picture 1 (a, b). Large tissue samples or whole organs are deeply incised to achieve full fixation without altering their appearance.

handled with caution because they are toxic. They should not be inhaled and skin and mucous-contact should be avoided. In case of an accident the affected area should be rinsed with water and in more severe cases emergency help should be sought by contacting the poison control center.

> Tissue handling

- As previously mentioned, the penetrance of fixatives is limited. Thus, fixation, especially in the center of large specimens could be inadequate and as a result autolysis could continue. For proper fixation, specimens should be less than 1-2 cm thick (ideally less than 0.5 cm thick). However, it is important that the pathologist has an overall view of the whole tissue that has been removed, so that he can choose himself the tissue samples that will be examined; thus, it is preferable for large samples to be deeply **incised** to facilitate
- penetration, **without being completely dissected** (Picture 1a, b). This is particularly important in the cases of neoplasms, in which the pathologist, by **examining the surgical margins** of the tissue, has to determine if the neoplasm has been completely excised. Ideally, in cases that surgical margins examination is required, tumor resection margins should be stained with special ink (Picture 2a, b). Thus, in case of tissue dissection, recognition of margins is possible.
- When **the specimen is extremely large** or involves a **whole organ** (e.g. spleen, mammary gland) it might have to be dissected before its shipment. In such cases, it is important that a photo or a drawing showing tissue original size and anatomical site is sent along with the sample.
- When the **specimen is extremely small** (bone marrow, transcutaneous liver biopsy, kidney biopsy, endoscopic biopsies of the nasal or gastric mucosa etc) it is recommended that it



Picture 2 (a: bottom surface, b: upper surface). For the examination of the surgical margins, tumor resection margins should be stained with special ink. (From Associate Professor's L.Papazoglou archive)

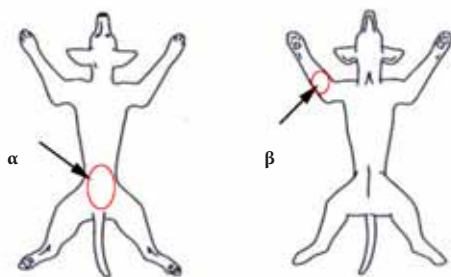




Picture 3 (a, b, c, d). Very small specimens are placed in the fixative within biopsy cassettes.

is placed in the fixative wrapped in filter paper or within biopsy cassettes (Picture 3a, b, c, d).

- If the tissue samples are covered with blood, it is recommended that they are rinsed with saline before being placed in the fixative, because blood delays fixation. Alternatively, it is recommended that the formalin is discarded and replaced after 24 hours.
- Skin biopsies should be shipped along with an image showing the exact anatomical site they have been removed from and the location of the lesions (Picture 4a, b).



Picture 4 (a, b). Sample of a drawing which indicates the anatomical sites the samples have been removed from (arrows) and the location of the lesions (circles).

> Tissues that require special handling

Bones

Formalin is used for **bone fixation**, as in other tissues. After approximately two days in formalin bones are demineralized in the histopathology lab.

For the histological examination of bone tissue from an **amputated** limb, skin and surrounding soft tissues should be removed before the sample is collected. If this dissection cannot be carried out right away in the operating room, the amputated limb should be stored under refrigeration (4 °C) until the removal of the surrounding tissues.

Uterus

In cases of ovariohysterectomy the whole **uterus** is shipped for histological evaluation. The two horns must be incised only on the lateral surface so that they remain attached to the body of uterus. The uterus of large animals should be incised per 1-1,5cm.





> Thanks

I would like to express my special Acknowledgements to Dr. V. Psychas, Associate Professor, for his advice, suggestions and the supervision of the text.



Picture 5. Tissue sample from the intestine: after enterectomy the sample is opened and pinned down on a cork board.

Intestine

Samples from the intestine include biopsies obtained endoscopically or parts of the intestine excised during enterotomy or enterectomy. **Endoscopically** obtained **intestinal biopsy samples**, which have usually the size of a pin head, should be placed without delay in the fixative wrapped with filter paper or within biopsy cassettes. Two ways of handling are recommended for parts of intestine removed by **enterectomy**: 1) The excised part of the intestine is rinsed with saline which is carefully injected into the lumen using a syringe without needle. Following, the intestine is filled with formalin and placed for fixation. This way, collapse of the intestinal wall and damage of villi are avoided. The intestine can be sectioned longitudinally or transversely after the fixation. 2) The excised part of the intestine is incised along the mesenteric side. Following, it is rinsed thoroughly to remove the intestinal content and it is pinned down on a cork board with the mucosa facing upwards (Picture 5). Then it is placed in the fixative. This way, the intestine remains flat. Otherwise, contraction of the muscle layer would lead to intestinal folding.

Muscles

It is imperative that muscle biopsies are pinned down on a cork board or tongue depressor, otherwise muscle contractions will mask any existing lesions. Pinning down must be performed along the longitudinal axis of the muscle fibers (Picture 6). Alternatively, the tissue, before being placed in formalin, must be placed in normal saline for 15-30 minutes, so that the glycogen reserves are reduced.

Testis

When histological examination of **testes** is performed for research purposes or when sperm cells structure must be evaluated (e.g. in azospermia/oligospermia) the fixative of choice is Bouin's solution.

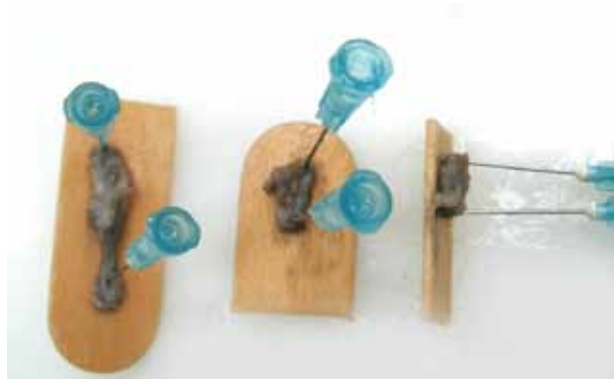
Bouin's solution

Saturated aqueous picric acid solution	75ml
Formol (37-40% formaldehyde)	25ml
Glacial acetic acid	5ml

Bouin's solution penetrates rapidly and does not cause hardening of the tissue.

> Handling of tissue and organs of dead animals

When organs and tissues intended for histopathological evaluation have been collected from deceased animals, they are handled the same way as previously described. The following describes the proper handling of brain samples.



Picture 6. Tissue sample from muscle: biopsies are pinned down in parallel to the long axis of the muscle fibers.





Brain

Post-mortem the nervous tissue exhibits very soon autolytic changes, which cannot be easily distinguished from early degenerative lesions. To obtain best possible results, the brain should be placed in the fixative immediately after its removal from the skull. When there is a history of brain lesions, removal of the brain from the skull should precede any examination of other organs. In such cases formalin saline solution is the fixative of choice because it prevents hardening of the tissue externally, increasing the penetrance of formalin. After 24 hours the formalin solution is discarded, the brain is transversely dissected into 1cm thick slices and placed in fresh formalin for full fixation.

10% Formalin saline solution

Formol (37-40% Formaldehyde)	100 ml
Sodium chloride (NaCl)	90 gr
Tap water	900ml

> Referral form for histopathological examination

The form must contain:

- The animal signalment (age, gender, breed).
- The animal history (besides clinical signs, previous treatment should be indicated, because it may affect the histological features).
- Clinical or differential diagnosis.
- Other tests results (e.g. radiological, ultrasonographic evaluation and particularly results from cytological or previous histological examinations). This information contributes to accurate diagnosis and protection of the animal's health.
- The way of sampling (total or partial resection, biopsy, aspiration etc.) and whether the whole tissue that has been removed is being shipped or only a part of it. It should be noted whether the biopsy has been obtained through endoscopy or if diathermy has been used, so that any tissue damage caused by manipulations will not be misinterpreted.
- Date of obtaining/fixation of the histological samples.

> Shipment

- Sample containers with formalin should be placed in a box containing enough absorbent material (e.g. paper) in order to absorb potential leakage. The same applies when glutaraldehyde or paraformaldehyde solutions are used. If tissues have already been fixed for 24-48 hours prior to their shipment (with a minimum of fixative to tissue ratio 10:1), they can then be placed in a smaller container with less amount of fixative to facilitate their transportation and avoid any spillage. The samples are transported at ambient temperature.
- Frozen tissues are placed in a pre-cooled plastic container. The packaged specimen is shipped in a styrofoam box containing dry ice. The shipping container must be labeled with a "dry ice" indication.
- Most delivery companies are willing to undertake shipment of the samples. Tissues in formalin are not infective and dangerous for public health. In some cases, a declaration stating the above should accompany the transported biological material.

> Suggested reading

1. Kamstock DA, Ehrhart EJ, Getzy DM, Bacon NJ, Rassnick KM, Moroff SD, Liu SM, Straw RC, McKnight CA, Amorim RL, Bizenle D, Cassali GD, Cullen JM, Dennis MM, Esplin DG, Foster RA, Goldschmidt MH, Gruber AD, Hellmén E, Howerth EW, Labelle P, Lenz SD, Lipscomb TP, Locke E, McGill LD, Miller MA, Mouser PJ, O'Toole D, Pool RR, Powers BE, Ramos-Vara JA, Roccabianca P, Ross AD, Sailasuta A, Sarli G, Scase TJ, Schulman FY, Shoieb AM, Singh K, Sledge D, Smedley RC, Smith KC, Spangler WL, Steficek B, Stromberg PC, Valli VE, Yager J, Kiupel M; American College of Veterinary Pathologists' Oncology Committee. Recommended guidelines for submission, trimming, margin evaluation, and reporting of tumor biopsy specimens in veterinary surgical pathology. *Vet Pathol* 2011, 48: 19-31.
2. Bancroft J, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 5th edn. Churchill Livingstone: Edinburg, 2002.

