Tecniche istochimiche: differenze con i tessuti di mammifero.

Tecniche citologiche

Carla Calligaro carla.calligaro @uniud.it

Paola Beraldo paola.beraldo@uniud.it

Anatomicamente il **rene** è costituito da due lunghe masse scure che decorrono longitudinalmente incassate ai lati della colonna vertebrale, al di fuori della cavità peritoneale. La parte cefalica, pronefro, spesso separata più o meno nettamente dalla parte posteriore, è funzionante nell'embrione e nella larva, mentre nell'adulto è formata di tessuto emopoietico e tessuto ghiandolare di due tipi, cellule interrenali e cromaffini. La parte caudale, opistonefro, presenta una gran variabilità di forme e grandezze tra le varie specie. Vi sono due dotti escretori che, in molte specie, prima di sboccare all'esterno, posteriormente all'apertura anale, si uniscono a dare una vescica.

Anatomicamente il **rene** è costituito da due lunghe masse scure che decorrono longitudinalmente incassate ai lati della colonna vertebrale, al di fuori della cavità peritoneale. La parte cefalica, pronefro, spesso separata più o meno nettamente dalla parte posteriore, è funzionante nell'embrione e nella larva, mentre nell'adulto è formata di tessuto emopoietico e tessuto ghiandolare di due tipi, cellule interrenali e cromaffini. La parte caudale, opistonefro, presenta una gran variabilità di forme e grandezze tra le varie specie. Vi sono due dotti escretori che, in molte specie, prima di sboccare all'esterno, posteriormente all'apertura anale, si uniscono a dare una vescica.

PROCESSAZIONE con REAGENTI STANDARD (più tossici, Processatore “LX120” PABISCH)

REAGENTE	TEMPO (minuti)
ALCOOL 50	90
ALCOOL 80	90
ALCOOL 90	90
ALCOOL 90	90
ALCOOL 100	90
ALCOOL 100	90
XILENE 1	90
XILENE 2	90
XILENE 3	90
PARAFFINA 1	90
PARAFFINA 2	90
PARAFFINA 3	90

i prelievi fissati in bouin (già lavati in alcool 70 °) possono saltare il primo passaggio in alccol 50 °

PROCESSAZIONE CON SOSTITUTI DELLO XILOLO per campioni di dimensione normale (minore tossicità, processatore “TISBE”, ditta “DIAPATH”)

REAGENTE	TEMPO (minuti)
ALCOOL 50	90
OTTIX SHAPER	60
OTTIX PLUS	90
OTTIX PLUS	90
OTTIX PLUS	90
OTTIX PLUS	120
PARAFFINA 1	90
PARAFFINA 2	90
PARAFFINA 3	120

l'agitazione dei reagenti è garantita da cicli alternati pressione/vuoto
i prelievi fissati in bouin (già lavati in alcool 70°) possono saltare il primo passaggio in alccol 50 °

PROCESSAZIONE CON SOSTITUTI DELLO XILOLO per biopsie o stadi larvali di Teleostei (minore tossicità, processatore “TISBE”, ditta “DIAPATH”)

REAGENTE	TEMPO (minuti)
ALCOOL 50	10
OTTIX SHAPER	20
OTTIX PLUS	20
OTTIX PLUS	20
OTTIX PLUS	30
OTTIX PLUS	30
PARAFFINA 1	20
PARAFFINA 2	20
PARAFFINA 3	20

l'agitazione dei reagenti è garantita da cicli alternati pressione/vuoto
i prelievi fissati in bouin (già lavati in alcool 70°) possono saltare il primo passaggio in alccol 50 °

COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

COLORAZIONE EMATOSSILINA – EOSINA (E-E)

1. fase di idratazione

REAGENTE	TEMPO (minuti)
XILENE	5
XILENE	5
ALCOOL 100	2
ALCOOL 100	2
ALCOOL 95	2
ALCOOL 80	2
ALCOOL 50	2
ACQUA DISTILLATA	2

2. colorazione

REAGENTE	TEMPO (minuti)
EMATOSSILINA DI MAYER	15
Lavaggio acqua corrente	15
Lavaggio alcool 80	1
EOSINA	2
Lavaggio alcool 80	1

Se mammiferi 1 minuto.
Nel caso di campioni fissati in Bouin il tempo è di 1 minuto.

3. fase di disidratazione

REAGENTE	TEMPO (minuti)
ALCOOL 95	1
ALCOOL 100	2
ALCOOL 100	2
XILENE	5
XILENE	5
MONTARE CON EUKITT	

COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

COLORAZIONE GRAM MODIFICATA TWORT

1. fase di idratazione (come precedente)

2. colorazione

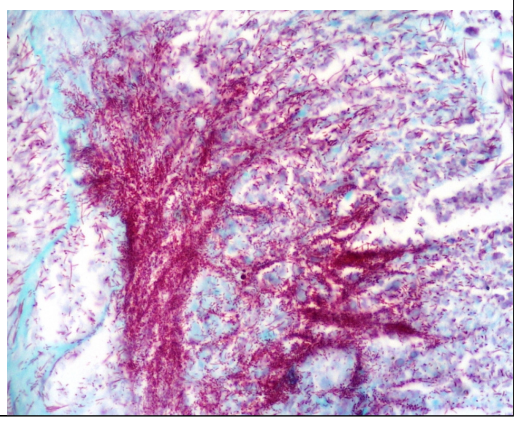
REAGENTE	TEMPO (minuti)
Lillie crystal violetto	1
Lavaggio H_2O rubinetto	breve
Lugol's iodine	1
Acetone	secondi
Lavaggio acqua distillata	secondi
Rosso neutro/verde luce	5
Lavaggio acqua distillata	secondi

Nei mammiferi i tempi sono più lunghi (3 minuti)

Nei mammiferi i tempi sono più lunghi e si usa una miscela di assoluto e acido acetico

3. fase di asciugatura in stufa a 37° (al fine di evitare la presenza di goccioline di acqua nei preparati)
4. Fase di disidratazione convenzionale ma i tempi sono più brevi.

Risultati:
Gram positivi blu
Gram negativi rosso
Collagene, citoplasma verde



Lillie's crystal violetto
Sciogliere 10g crystal violet in 100ml 95% alcool.
Sciogliere 4g ammonio ossalato in 400 ml acqua distillata
Unire le due soluzioni e agitare la miscela 3 ore.
Filtrare

Lugol
1g di Iodio
2g ioduro di potassio -
100ml di acqua distillata
Mescolare lo iodio e lo ioduro di potassio in una piccola quantità di acqua e consentire loro di sciogliersi completamente prima di aggiungere il resto dell'acqua.

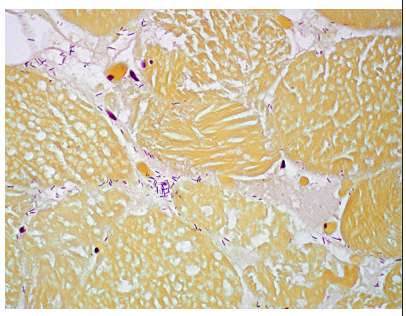
Rosso neutro/verde luce
0,2% fast green
0,2% rosso neutro in etanolo al 80%.
Soluzione di lavoro da preparare al momento dell'uso:
1 ml Fast Green
9 ml Neutral Red
30 ml acqua dist

COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

COLORAZIONE GRAM BROWN HOPPS

1. fase di idratazione
2. colorazione

REAGENTE	TEMPO (minuti)
Crystal violetto	2
Lavaggio in acqua rubinetto	veloce
Gram's iodine	5
Acqua rubinetto	10
Tamponare ma non asciugare	
Acetone	breve
Acqua rubinetto	breve
Fucsina basica	5
Lavaggio in acqua distillata	veloce
Sol. Gallego	5 (agitare)
Lavare, tamponare ma non asciugare	
Immergere 3 volte in acetone (rapido)	
Immergere 3 volte in acetone/ac picrico (rapido)	
Immergere 3 volte in acetone (rapido)	
Immergere 5 volte in acetone/xilene (rapido)	
Immergere 10 volte in xilene (rapido)	



Risultati:
Gram positivi blu
Gram negativi rosso
Fondo giallo

Crystal violetto
1 gr Crystal violetto in 100 ml acqua distillata.
Soluzione idurata (Gram's iodine)
2% di iodio e 3% ioduro di potassio in etanolo 70%
Fucsina basica (sol. base)
0,25 gr fucsina basica in 100 ml acqua distillata
All'uso, diluire la soluzione base 1:25 in acqua distillata
Gallego
1 ml formalina conc in 50 ml acqua dist, + 0,5 ml acido acetico glaciale
Acetone/acido picrico: 0,5 gr acioi picrico in 1 l acetone
Acetone/xilene 1:1

COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

COLORAZIONE GIEMSA

1. fase di idratazione
2. colorazione

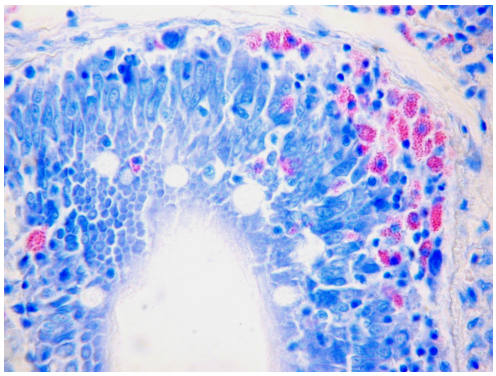
REAGENTE	TEMPO (minuti)
Giemsa	60
Acido acetico	Controllare al m.o.

Nei mammiferi i tempi sono più brevi (30min)

Decolorare il fondo controllando al microscopio ottico la giusta tonalità del rosa

3. fase di disidratazione

	TEMPO (minuti)
ALCOOL 95	secondi
ALCOOL 100	1
ALCOOL 100	1
XILENE	2
XILENE	2



Risultati:
Nuclei blu
Citoplasma rosa
Eosinofili rosso/arancio
Parassiti blu/blu scuro

Giemsa commerciale diluita 1:20 in acqua distillata
Acido acetico glaciale 150µl in 100ml di acqua distillata

COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

COLORAZIONE PAS (periodic acid Schiff)

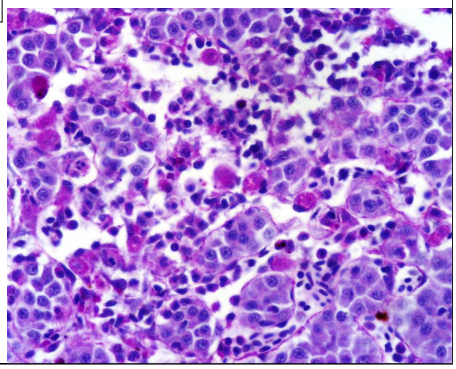
1. fase di idratazione
2. colorazione

REAGENTE	TEMPO (minuti)
Acido periodico	5
Lavaggio acqua rubinetto	5
Reattivo di Schiff (al buio)	30
Soluzione Solforosa	3x2
Acqua rubinetto	10
Ematossilina di Mayer	5
Acqua rubinetto	8

Verificare la colorazione data dal reattivo, tonolità di rosso magenta.
Nei mammiferi i tempi di permanenza nel reattivo sono minori 15-20 minuti

3. fase di disidratazione convenzionale

Risultati:
Nuclei blu
Carboidrati magenta



1% acido periodico

Reattivo di Schiff (commerciale)

Soluzione solforosa :

100 ml Na-metabisolfito 10% acq.

10 ml HCl 1N

100 ml H2O dist.

COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

COLORAZIONE ZIEHL-NEELSEN

1. fase di idratazione

2. colorazione

REAGENTE	TEMPO (minuti)
Carbol-fucsina (soluzione già pronta commerciale)	30 a temperatura amb.
Acqua distillata	breve
1% HCl in alcool al 70%	decolorare le sezioni finché non diventano rosa
Acqua rubinetto	8
Blu di metilene (sol.lav.)	secondi

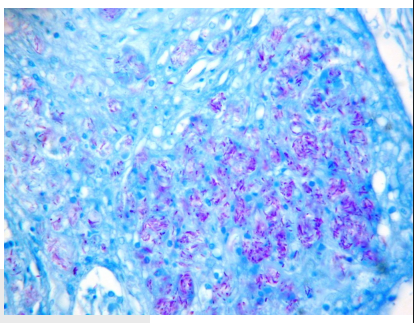
Nei mammiferi 90 minuti a 57 °C + 30 min a temp amb

Controllare al microscopio ottico

Molto veloce affinchè il blu non sovrasti la colorazione

3. fase di disidratazione

	TEMPO (minuti)
ALCOOL 95	secondi
ALCOOL 100	1
ALCOOL 100	1
XILENE	2
XILENE	2



Risultati:
Nuclei blu scuro
Batteri acido resistenti magenta

Soluzione decolorante: 1% HCl in alcool al 70%

Soluzione base: 1,4 g blu metilene in alcool 95° ; soluzione di lavoro 10ml di sol base in 90ml di acqua distillata

COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

COLORAZIONE TRICROMICA DI GOLDNER

1. fase di idratazione

Previa facoltativo mordenzatura in Buoin

2. colorazione

REAGENTE	TEMPO (minuti)
Ematossilina ferrica di Weigert	12
Tamponare con carta bibula	
Acido picrico (sol. alcolica satura)	4
Lavaggio acqua distillata	rapido
Ponceau-Fucsina	10-15
Lavaggio acqua distillata	
Acido fosfomolibdico 1%	10
Tamponare con carta bibula	
Blu di anilina al 2,5% in 2% ac. acetico	3
Lavaggio acqua distillata	rapido

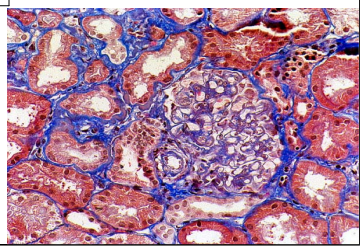
Nei mammiferi i tempi sono inferiori

Controllare al microscopio ottico che i globuli rossi siano giallo e connettivo decolorato

Controllare al microscopio ottico che il blu non sovrasti la colorazione

3. fase di disidratazione convenzionale il passaggio in alcool 95 è rapido (secondi)

Risultati:
Nuclei neri
Collagene blu
Citoplasma, fibre muscolari, cheratina rosso
Eritrociti giallo



Ematossilina ferrica di Weigert soluzione di base:
Sol A, ematossilina certificata all'1% in etanolo;
Sol B, 4 ml di cloruro ferrico al 30% uniti a 1 ml acido cloridrico conc
Al momento dell'uso mescolare A e B in parti uguali
Soluzione satura di acido picrico in alcool 80°

Ponceau-Fucsina
0,2 gr Ponceau 2R
0,1 gr fucsina acida
0,6 ml ac acetico glaciale
300 ml acqua distillata

Blu anilina al 2,5% in 2% acido acetico

COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

COLORAZIONE GROCOTT (impregnazione argentica per miceti)

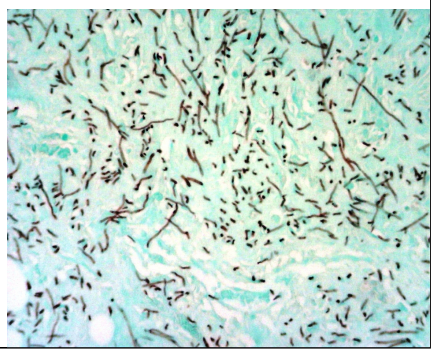
1. fase di idratazione
2. colorazione

REAGENTE	TEMPO (minuti)
Cromo triossido (sol acquosa 2%)	60
Acqua rubinetto	10
Lavaggio acqua distillata	5
Na metabisolfito (sol. acquosa 1%)	1
Acqua rubinetto+ acqua dist	5 + 5
Soluzione argentica	15 a 60°C
Acido cloroaurico	5
Lavaggio acqua distillata	3x5
Sodio tiosolfato al 5%	3
Acqua rubinetto	5
Verde luce (sol. 0.2% in acido acetico a 0.2%)	1
Lavaggio acqua distillata	secondi

Nei mammiferi i tempi sono maggiori (1h)

Controllare al microscopio ottico l'andamento dell'impregnazione quando il fondo tende a impregnarsi e diventare marrone, sopsendere.

3. fase di disidratazione convenzionale, previa asciugatura in stufa a 37°C



Ife fungine nere
Fondo verde

Argento-esamina soluzione base

5 ml 5% argento nitrato + 100 ml of 3% soluz acquosa esamina. (Conservare al buio a 4° C per 1 – 2 mesi)

Soluzione di lavoro: a 25 ml della soluzione base, aggiungere 2 ml di acido borico 5% (stoccato a 37° C) e 25 ml H_2O distillata.

Preriscaldare a 60 ° .

Acido cloroaurico

soluzione acquosa 0,2% di acido cloroaurico

5% sodio tiosolfato

0.2% verde luce in 0.2% acido acetico

COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

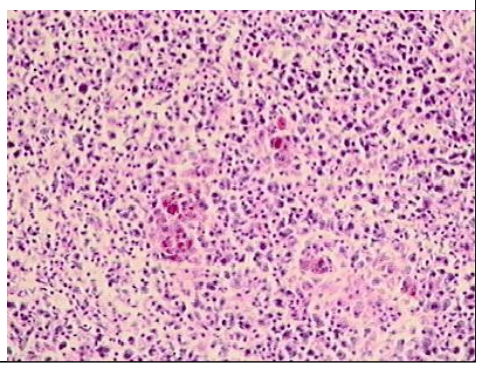
COLORAZIONE MACCHIAVELLO

1. fase di idratazione
2. colorazione

REAGENTE	TEMPO (minuti)
Fucsina basica	30
Acqua distillata	2
Acido citrico	30 sec - 1
Acqua rubinetto	veloce
Blu metilene	30 secondi
Acqua distillata	veloce

3. fase di disidratazione convenzionale

Rickettsiae e alcuni inclusi virali rosse
Fondo blu



COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

COLORAZIONE BLU TOLUIDINA

1. fase di idratazione

2. colorazione

REAGENTE	TEMPO (minuti)
Blu toluidina 0.01%	10
Acqua distillata	1

Nei mammiferi i la concentrazione del colorante è 0.1%.
Per il pesce è meglio avere il pH acido (3/4)

3. fase di disidratazione convenzionale

	TEMPO (minuti)
ALCOOL 95	1
ALCOOL 100	1
ALCOOL 100	1
XILENE	2
XILENE	2

Nuclei blu scuro
Fondo azzurro
Metacromasia

COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

COLORAZIONE CLEVELAND WOLF (cellule acidofile)

Fissazione in formaldeide 4%, se soluzione di Bouin i tempi molti più brevi

1. fase di idratazione

2. colorazione

REAGENTE	TEMPO (minuti)
Eritrosina	5-10
Acqua distillata	3x2
Orange G/acido Fosfotungstico	rapido
Blu anilina (pH4)	3-5
Tamponare in carta bibula	

20 secondi se Bouin

20 secondi se Bouin

3. fase di disidratazione convenzionale

REAGENTE	TEMPO (minuti)
ALCOOL 95	rapido
ALCOOL 100	rapido
ALCOOL 100	rapido
XILENE	3
XILENE	3

Nuclei blu scuro
Fondo azzurro
Metacromasia

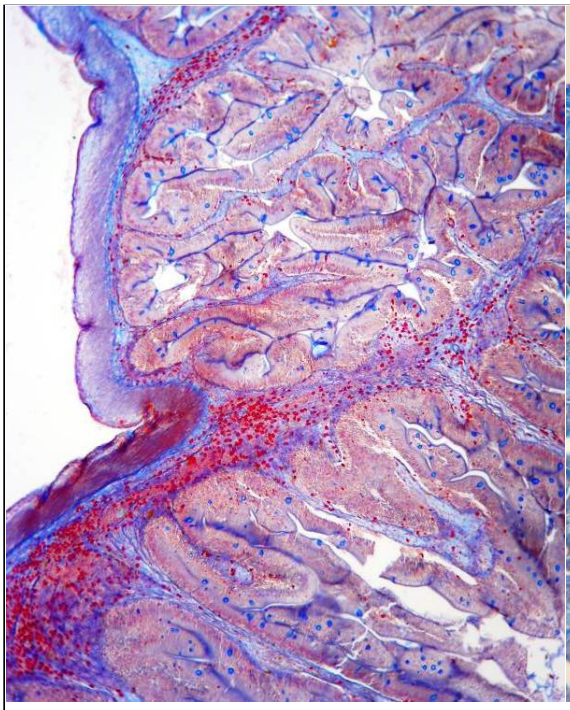
1% soluzione acquosa eritrosina

2% Orange G in 1% acido fosfotungstico

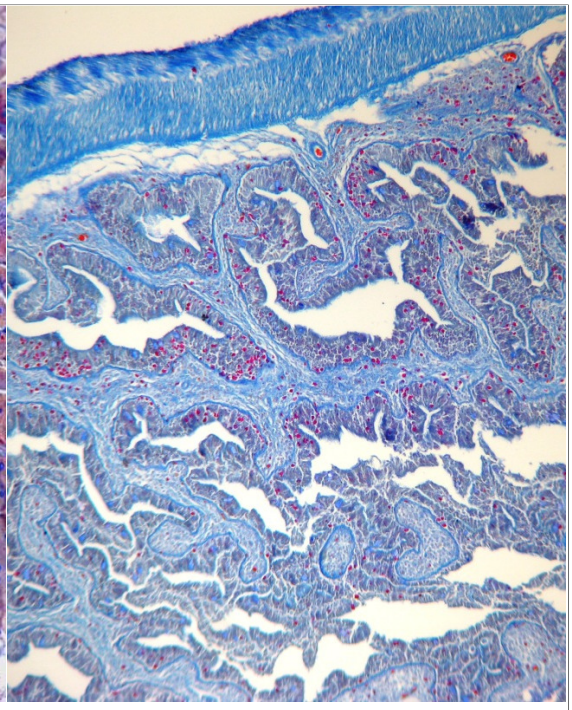
1% blu anilina in acqua

Le soluzioni devono essere preparate di fresco.

Il pH del blu di anilina non deve superare il 4.



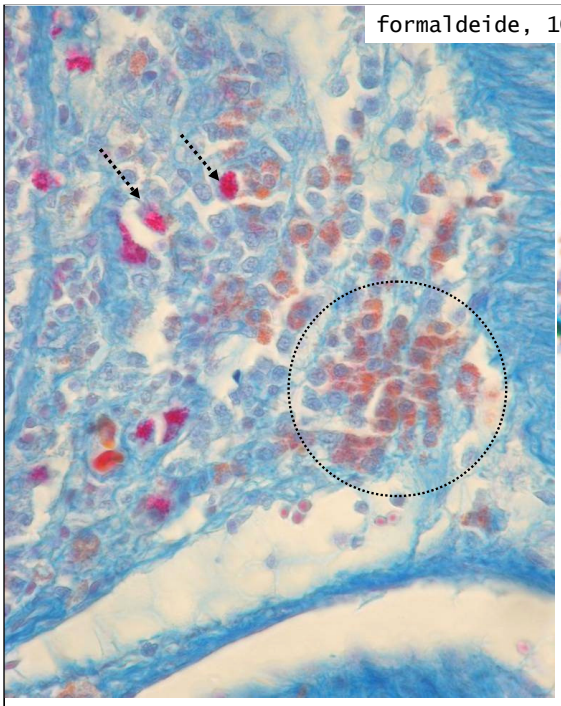
Bouin, 100x Cleveland

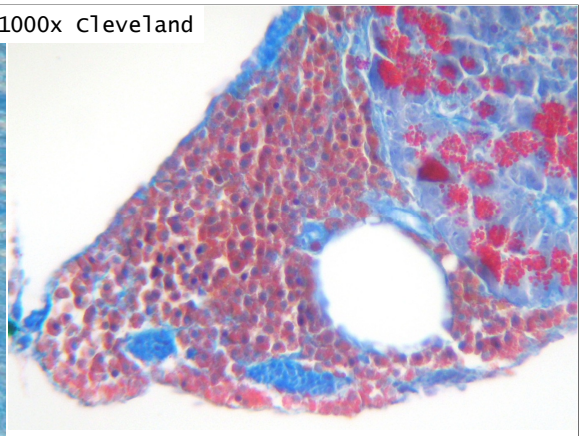


formaldeide, 100x Cleveland

Mastocti/EGC, distribuzione diffusa nella sottomucosa e lamina propria, epitelale

formaldeide, 1000x Cleveland





due morfotipi cellulari differenti

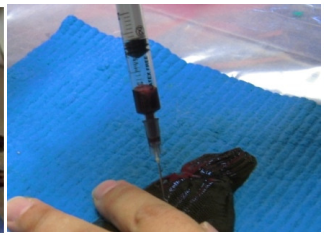
ricognizione esteriore indiretta e diretta in vivo
(sedazione e immobilizzazione del pesce)

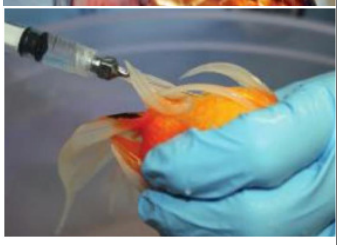
La prima ricognizione, idealmente, dovrebbe essere condotta nell'ambiente di provenienza del pesce, ma, non essendo sempre possibile, può essere sufficiente osservalo nel contenitore in cui viene trasportato. I dettagli del suo comportamento nella colonna d'acqua, l'orientamento e il comportamento natatorio e la reazioni a stimoli esterni devono essere indicatori per la diagnosi, come eventuali altre anomalie comportamentali: scatti improvvisi sul fondo della vasca, frequenza della struttura opercolare....

TECNICHE DIAGNOSTICHE E RICERCA PER LE MALATTIE DEI PESCI

esami a fresco non letali

raschiato cutaneo e branchiale
biopsia branchie e pinne
coprologico o lavaggio cloacale
biopsia e agoaspirato di masse
prelievo di sangue
citologia





altri esami non letali

diagnosi per immagini

La prima ricognizione, idealmente, dovrebbe essere condotta nell'ambiente di provenienza del pesce, ma, non essendo sempre possibile, può essere sufficiente osservalo nel contenitore in cui viene trasportato. I dettagli del suo comportamento nella colonna d'acqua, l'orientamento e il comportamento natatorio e la reazioni a stimoli esterni devono essere indicatori per la diagnosi, come eventuali altre anomalie comportamentali: scatti improvvisi sul fondo della vasca, frequenza della struttura opercolare....

TECNICHE DIAGNOSTICHE E RICERCA PER LE MALATTIE DEI PESCI

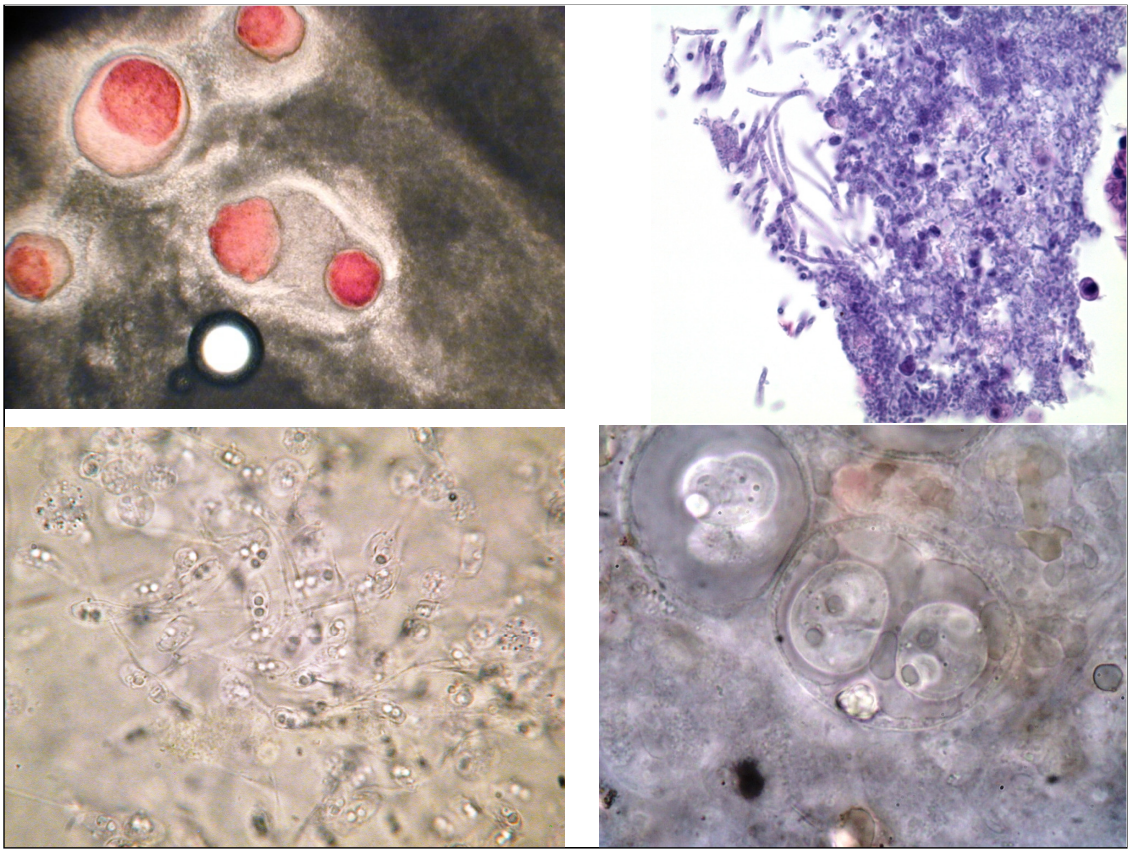
eutanasia

(metodi chimici con dose letale di MS-222, clove oil, benzocaina; metodi fisici: botta in testa, ghiaccio fondente, taglio della testa o della colonna vertebrale)

esami postmortem

- esami a fresco
- citologia (strisci o impronte)
- esami microbiologici
- prelievo per istologia
- microscopia elettronica

La prima ricognizione, idealmente, dovrebbe essere condotta nell'ambiente di provenienza del pesce, ma, non essendo sempre possibile, può essere sufficiente osservalo nel contenitore in cui viene trasportato. I dettagli del suo comportamento nella colonna d'acqua, l'orientamento e il comportamento natatorio e la reazioni a stimoli esterni devono essere indicatori per la diagnosi, come eventuali altre anomalie comportamentali: scatti improvvisi sul fondo della vasca, frequenza della struttura opercolare....



COLORAZIONI CITOLOGICHE

COLORAZIONE GIEMSA

Fissare il preparato in alcool 95 per 3'

REAGENTE	TEMPO (minuti)
Giemsa	30
Lavaggio	3 cambi da 2'

Disidratazione

REAGENTE	TEMPO (minuti)
Asciugare all'aria	
ALCOOL 100	30''
XILENE	5
XILENE	5

Risultati:
tessuti colorati con varie tonalità dal blu al violetto (metacromasia)

COLORAZIONI CITOLOGICHE

COLORAZIONE MAY GRUNWALD – GIEMSA

Fissare il preparato in alcool 95 per 3'

REAGENTE	TEMPO (minuti)
May Grunwald	5
Diluire con H_2O (1:1) e proseguire altri 10	
Lavaggio	breve
Giemsa	15
Lavaggio acqua distillata	3 x 2

Reagenti
May Grunwald pronto all'uso
Giemsa commerciale diluito (1 goccia di reagente ogni ml di acqua distillata)

Disidratazione

REAGENTE	TEMPO (minuti)
Asciugare all'aria	
ALCOOL 100	30 secondi
XILENE	2
XILENE	2