A.S.L. TO1

Azienda Sanitaria Locale Torino

AZIENDA SANITARIA LOCALE TO1 - SC MEDICINA LEGALE - OBITORIO CIVICO

PIANO DELLA QUALITÀ PQ05 - Funzioni di Laboratorio di Istopatologia

Edizione 3	Approvata dal Direttore della SC Medicina Legale	Emessa dal Referente Aziendale per la Qualità per la Medicina Legale

©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

Sommario

1 ELEMENTI INTRODUTTIVI 3
1.1 Descrizione e destinatari 3
1.2 Evoluzione del documento 3
1.3 Termini e definizioni attinenti la qualità 4
2 AMBITO DI APPLICAZIONE E SCOPI 5
3 RIFERIMENTI DOCUMENTALI E NORMATIVI 5
4 SEQUENZA DELLE ATTIVITÀ 6
4.1 Elementi generali 6
4.2 Premesse 6
4.3 Fissazione dei tessuti 7
4.3.1 Campionamento autoptico e "mapping" cuore, polmone ed encefalo 7
4.3.2 Riduzione dei prelievi ed utilizzo delle cellette per istopatologia 8
4.4 Campionamento dei tessuti durante l'autopsia per esame istologico 8
4.5 Procedura Campionamento Istologico 9
5 FASI OPERATIVE 10
5.1 Sequenza delle attività 10
5.2 Campionamento in sala autoptica e fissazione 11
5.3 Riduzione 11
5.4 Processazione 12
5.5 Inclusione 14
5.6 Taglio 15
5.7 Colorazione e Montaggio 16
5.7.1 Rintracciabilità reagenti 19
5.8 Studio Morfologico e Diagnosi 19
5.9 Archiviazione 19
6 RISORSE UMANE NECESSARIE 20
7 RISORSE MATERIALI UTILIZZATE 20
8 EVENTUALI INDICATORI CORRELATI 20

©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

1 ELEMENTI INTRODUTTIVI

1.1 Descrizione e destinatari

Questo Piano della Qualità contiene gli elementi necessari per l'attuazione delle Funzioni di Laboratorio di Istopatologia dell'ASL TO1.

I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1, e le modalità per la sua gestione descritte nella Procedura *PR 03-Documentazione e registrazioni del SGQ*. Di seguito vengono sintetizzati destinatari e modalità di distribuzione/diffusione, ricordando che altre forme possono essere autorizzate in ogni momento dal Direttore della SC Medicina Legale.

Destinatari	Modalità di diffusione
Personale dell'Obitorio	- Versione elettronica. Disponibilità del file nell'area condivisa del server, in funzione delle autorizzazioni all'accesso all'area stessa. - Versione cartacea. Archivio custodito dal Referente Aziendale per la Qualità per la Medicina Legale
Personale della SC Medicina Legale e di altre strutture dell'ASL TO1	- Versione elettronica. Il file (in formato .pdf) viene consegnato dal Referente Aziendale per la Qualità per la Medicina Legale
Personale non appartenente all'ASL TO1	- Versione elettronica protetta (in formato .pdf). Il file viene consegnato dal Referente Aziendale per la Qualità per la Medicina Legale dietro autorizzazione del Direttore della SC Medicina Legale

1.2 Evoluzione del documento

Edizione	Note
Edizione 0 del 19/05/2008	Prima edizione
Edizione 1 del 08/10/2010	- Aggiornamenti dei riferimenti normativi volontari (UNI EN ISO 9001:2008 e UNI EN ISO 9004:2009) - Aggiornamento logo aziendale - Eliminazione logo società di consulenza
Edizione 2 del 20/09/2011	- Ampliata la descrizione delle attività eseguite in Laboratorio Istopatologia, a seguito dell'esperienza consolidata nel 2011 a partire dall'avvio del Laboratorio
Edizione 3 del 10/09/2012	- Ulteriormente dettagliata le sequenza delle attività, in funzione della maggiore esperienza - Inserimento metodiche e rintracciabilità dei reagenti a seguito dell'OSS dell'organismo di certificazione del 16/11/2011

©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

1.3 Termini e definizioni attinenti la qualità

Termini	Definizioni	Fonti
Piano della Qualità	Un piano della qualità fa parte della documentazione del sistema di gestione per la qualità. Occorre che il piano della qualità faccia solo riferimento al sistema di gestione per la qualità documentato, mostrando come esso debba essere applicato alla specifica situazione in questione, ed identifichi e documenti come l'organizzazione soddisferà quei requisiti che sono specifici per il particolare prodotto, processo, processo o contratto. Lo scopo e il campo di applicazione del piano della qualità dovrebbe essere definito. Il piano della qualità può includere specifiche procedure, istruzioni operative e/o registrazioni.	UNI 10999:2002; § 4.8
	Nei sistemi di gestione per la qualità vengono utilizzati i seguenti tipi di documenti: (...) b) documenti che descrivono come il sistema di gestione per la qualità si applica ad uno specifico prodotto, progetto o contratto; tali documenti sono denominati "piani della qualità"	UNI EN ISO 9000:2005; § 2.7.2
Specifica	Le specifiche sono documenti che stabiliscono requisiti. Nella presente linea guida le specifiche non sono descritte in modo dettagliato, in quanto esse si riferiscono unicamente al prodotto/organizzazione.	UNI 10999: 2002; § 4.9
	Nei sistemi di gestione per la qualità vengono utilizzati i seguenti tipi di documenti: (...) c) documenti che stabiliscono dei requisiti; tali documenti sono denominati "specifiche" o "capitolati"	UNI EN ISO 9000:2005; § 2.7.2
Requisito	Esigenza o aspettativa che può essere espressa, generalmente implicita o cogente. Nota 1."Generalmente implicita" significa che è uso o prassi comune, per l'organizzazione, per i suoi clienti e per le altre parti interessate, che l'esigenza o l'aspettativa in esame sia implicita. Nota 2 Per individuare un particolare tipo di requisito, possono essere utilizzati elementi qualificativi, quali, per esempio: requisito di prodotto, requisito di gestione per la qualità, requisito del cliente. Nota 3 Un "requisito specificato" è un requisito che è precisato, per esempio, in un documento. Nota 4 I requisiti possono provenire da differenti parti interessate.	UNI EN ISO 9000:2005; § 3.1.2
Caratteristica qualitativa	Caratteristica intrinseca in un prodotto, processo, o sistema, relativa ad un requisito. Nota 1 L'aggettivo intrinseca significa presente in qualcosa, specialmente come caratteristica permanente. Nota 2.Una caratteristica assegnata ad un prodotto, processo o sistema (esempio: il prezzo di un prodotto, il proprietario dì un prodotto) non rientra tra le caratteristiche qualitative di quel prodotto, processo o sistema.	UNI EN ISO 9000:2005; § 3.5.2

©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

2 AMBITO DI APPLICAZIONE E SCOPI

- Rispettare la normativa applicabile e le più appropriate pratiche professionali in merito all'esecuzione di accertamenti ed esami di Laboratorio di Istopatologia.

3 RIFERIMENTI DOCUMENTALI E NORMATIVI

Normativa cogente	Oggetto
Testo Unico sulla Sicurezza, 9 aprile 2008, n° 81	Normativa in tema di sicurezza sul lavoro
Decreto Legislativo 196/2003	Testo unico in tema di tutela della riservatezza e la protezione dei dati personali
DPR n. 285 del 10 settembre 1990	Regolamento di Polizia Mortuaria (RPM)
Raccomandazione n° R(99) 3 del Comitato dei Ministri agli Stati Membri relativa all'uniformazione delle regole per l'autopsia giudiziaria	Indicazioni e regole relative alle autopsie giudiziarie

In aggiunta ai requisiti normativi cogenti appena citati risultano collegati a questo Piano della Qualità i seguenti documenti e registrazioni, di origine esterna e interna, eventualmente correlati all'attuazione di altri aspetti del SGQ:

- Norma UNI 10999:2002
- Norma UNI EN ISO 9000:2005
- Norma UNI EN ISO 9001:2008
- Norma UNI EN ISO 9004:2009
- Manuale del Sistema di Gestione per la Qualità dell'Obitorio
- Procedura PR04 - Esecuzione Esami Autoptici
- Documento di Valutazione dei Rischi
- National Association of Medical Examiners, Forensic Authopsy Performance Standards, 17/10/2005
- The Royal College of Pathologists, Code of practice and performance standards for forensic pathologists, November 2004
- College of American Pathologists
- Registrazioni della pianificazione, erogazione e controllo dei servizi
- Registrazioni relative ai reclami
- Registrazioni relative alla formazione e alle competenze degli operatori.
- Manuale di Tecniche istologiche e istochimiche, A. Mazzi, ed. Piccin-Nuova Libraria, 1977.
- Nozioni di Tecniche Diagnostiche di Anatomia Patologica, M.R. Cardillo, ed . Delfino Antonio,2009
- Il Manuale di Istologia, Bani e coll., ed. Idelson- Gnocchi, 2007
- Istologia, P. Gartner e L. Hiatt, ed. Edises, 2007
- Facoltà di Medicina e Chirurgia– Università di Perugia, materiale didattico.

Tutta la documentazione citata si intende all'ultima edizione e le registrazioni all'ultima data segnalata su ciascuna registrazione.

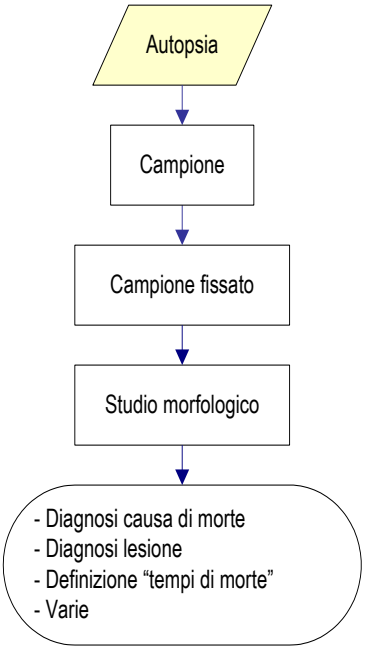
©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

4 SEQUENZA DELLE ATTIVITÀ

4.1 Elementi generali

Lo sviluppo delle attività è sintetizzato nel diagramma in Figura 1.

FIGURA 1. SVILUPPO DELLE ATTIVITÀ



4.2 Premesse

L'Istopatologia applicata alle discipline forensi è una delle tante branche dell'Anatomia Patologica classica e, sebbene non abbia la valenza percentuale dell'Istopatologia tradizionale in ambito ospedaliero, assume una sua dignità specifica -talora irrinunciabile- qualora ne venga richiesto l'ausilio (ad esempio per dirimere contenziosi nella valutazione dei casi di responsabilità professionale, o per formulare una corretta epicrisi in casi di riscontro diagnostico).

Conseguentemente è d'obbligo per ogni Medico Settore sapere come fissare, sezionare, campionare e ridurre la lesione, e diventa molto importante conoscere almeno i concetti di base dell'Istopatologia, al fine di arrivare all'assunto più importante ed irrinunciabile: ottenere buoni preparati istologici.

Per raggiungere standard accettabili e costanti è fondamentale costruire un metodo operativo efficace. Di seguito viene brevemente riassunto quello utilizzato presso l'Obitorio di Torino, che raccoglie raccomandazioni, suggerimenti e Linee Guida pubblicate da alcune tra le più importanti Associazioni e Società mondiali in campo medico: World Health Organization, ArmedForcesInstitute of Pathology, College of American Pathologists.

I punti fondamentali comprendono:
1) Scelta del contenitore idoneo
2) Scelta del fissativo
3) Campionamento dei tessuti durante le operazioni autoptiche e/o "mapping" degli organi
4) Riduzione dei prelievi dopo fissazione
5) Corretto utilizzo delle "cellette" per istopatologia ed orientamento dei prelievi.

©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

4.3 Fissazione dei tessuti

È il primo passo per ottenere buoni risultati. Alcune avvertenze tecniche sono essenziali per permettere un esame istopatologico corretto, ed in particolare è opportuno che:

- Il campionamento autoptico sia postoin idonei contenitori che rispettino il rapporto 4:1 – 10:1 tra liquido fissativo e materiale campionato
- Vi sia apposta un'etichetta su barattolo e sul coperchio che indichi: ML, nome e cognome, data di esecuzione, tipo autopsia, medico e tipo prelievo.
- Il liquido fissativo sia adeguato alle esigenze tecniche per cui sono stati effettuati i prelievi. Così, ad esempio, per un esame istologico di "routine" la formalina sarà il fissativo di elezione, mentre se si vorranno studiare più approfonditamente alcuni tessuti o effettuare batterie di esami immunoistochimici i fissativi da utilizzare saranno altri.

La fissazione dei tessuti ha lo scopo di conservare al meglio la struttura istologica e citologica, impedendo soprattutto fenomeni di autolisi e di essiccamento. In genere i fissativi più usati agiscono sulle proteine e alcuni anche sui lipidi, mentre i glicidi, specie se a basso peso molecolare, vengono solo intrappolati tra le proteine fissate e possono diffondere nell'acqua.

L'atto preliminare della fissazione è estremamente importante e richiede particolare cura, pena la perdita irreparabile del campione. Il fissativo ideale deve essere di facile reperimento e maneggiabilità, possibilmente poco tossico, di basso costo, rapido nella penetrazione dei tessuti e nella fissazione degli stessi. Il fissativo più usato è la formalina cosiddetta al 10% (una soluzione di formalina del commercio diluita in acqua in rapporto 1:9). Alla soluzione acquosa si possono talora aggiungere alcuni tamponi atti ad assicurare la neutralità del liquido.

I fissativi correntemente usati in istopatologia possono essere diversi. Rispetto al tipo di fissazione avremo, schematicamente, **fissativi chimici semplici** come l'alcool etilico e la formalina, **fissativi chimici composti** come il liquido di Bouin (contenente formaldeide, acido picrico e acido acetico), il liquido di Serra (contenente formaldeide, alcool 90° e acido acetico), il liquido di Doubosq-Brazil (contenente formaldeide, acido picrico, alcool 90° e acido acetico) giusto per citare alcuni esempi. Se invece vogliamo utilizzare una fissazione di **tipo fisico tramite congelamento** o magari **congelamento-sostituzione** useremo azoto liquido, isopentano o anidride carbonica, i quali sono particolarmente indicati per un esame estemporaneo o per lo "storage" del materiale in attesa di indagini immunoistochimiche o immunoenzimatiche.

4.3.1 Campionamento autoptico e "mapping" cuore, polmone ed encefalo

Una volta scelti il contenitore adatto e il fissativo idoneo si può passare al campionamento. Non è in discussione il fatto che durante l'esame autoptico tutti gli organi meritino un accurato esame macroscopico e quindi va da sé che ogni lesione debba essere prelevata (non già con coriandoli o cubetti di tessuto ma piuttosto con sezioni allargate e di spessore contenuto le quali verranno riadattate dopo la fissazione). Il problema diventa apprezzabile quando macroscopicamente non vi sia evidenza di lesioni atte a giustificare il decesso, o quando ci si debba confrontare con malattie -o il sospetto di esse- che necessitino di un approccio tecnico particolare, ovvero al di fuori dell'usuale campionamento routinario. In entrambe le condizioni è buona regola generale attenersi alle indicazioni riportate in College of American Pathologists

In più è molto importante eseguire un "mapping" preciso e circostanziato degli organi esaminati specificando da quale regione, del cuore o del polmone o dell'encefalo, provengano determinati prelievi.

Nel caso poi di alcuni tumori, ad esempio quelli del tratto gastroenterico, oltre alla campionatura in toto della neoplasia è necessario prelevare anche il tessuto fibroadiposoperilesionale al fine di formulare una corretta stadiazione, anche se al momento del decesso.

In casi di malattie demielinizzanti o degenerative del Sistema Nervoso Centrale è auspicabile sezionare con tagli particolari l'encefalo dopo almeno 15 giorni di fissazione in formalina e quindi eseguire

©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

un "mapping" di aree specifiche per la dimostrazione istologica della malattia oltre che per la conferma delle correlazioni anatomo-cliniche di alcuni sintomi.

PRELIEVI POLMONE
Per limitare la possibilità di confusioni è opportuno dare forme standard ai prelievi affinché ci si possa ricondurre con precisione all'area di campionamento (Lobo Superiore Sinistro, Lobo Inferiore Sinistro, etc.), oppure raccogliere ogni prelievo in un singolo contenitore (metodo preciso ma altamente costoso dal punto di vista delle risorse). Infine, inserire fin da subito nelle cellette i prelievi effettuati è una ulteriore possibilità, accompagnata tuttavia dall'esigenza assoluta di saper effettuare sezioni precise su tessuto fresco.

4.3.2 Riduzione dei prelievi ed utilizzo delle cellette per istopatologia

I campioni di tessuto prelevati durante l'autopsia sono fissati si procederà ad effettuarne la riduzione tramite idonea strumentazione, scegliendo dei prelievi mirati nelle zone più utili alla formulazione della diagnosi. Tali prelievi, dello spessore di circa 3 mm, verranno posti nelle apposite cellette istopatologiche e lasciati ancora soggiornare in liquido fissativo per almeno 2 ore.

Le cellette sono piccoli contenitori specifici sui quali è possibile apporre dati identificativi quali cognome, numero autoptico di riferimento, un numero al quale corrisponderà un'area prestabilita di campionamento, sigle per richiesta di eventuali colorazioni speciali.

4.4 Campionamento dei tessuti durante l'autopsia per esame istologico

Nel campionamento occorre poter distinguere i vari frammenti di tessuti prelevati ponendo:

1) I singoli frammenti in singoli contenitori, con indicazione della sede di prelievo (caso estremamente raro)
2) Oppure tagliandoli secondo forme prestabilite, come più sotto indicato
3) Oppure inserendo, quando possibile, già nelle cellette in plastica il tessuto da analizzare.

Si devono campionare **tutte le lesioni macroscopicamente evidenti di qualsivoglia organo- soprattutto quando queste possano giustificare il decesso,** e in subordine sostituire,**all'occorrenza**, i seguenti tessuti:

a) **Cuore**: parete anteriore ventricolo sinistro, setto interventricolare e ventricolo dx
b) **Polmone**: lobo superiore destro (a forma quadrata), lobo medio (a forma triangolare), lobo inferiore destro (forma rettangolare); lobo superiore sinistro (a forma quadrata con un angolo inciso), lobo inferiore sinistro (a forma rettangolare con un angolo inciso). I prelievi devono essere eseguiti sempre in campi medi.
c) **Fegato**: un prelievo lobo destro (quadrato), un prelievo del lobo sinistro (triangolare).
d) **Rene**: un prelievo.
e) **Encefalo** (se necessita l'indagine del contenuto della scatola cranica): un prelievo corticale, un prelievo dei nuclei della base.
f) **Milza**: un prelievo.

- **In caso di "morte improvvisa"**, e cioè senza nessun segno macroscopico evidente all'esame autoptico e in assenza in anamnesi di dati clinici rilevanti, occorre effettuare anche:
  - Prelievo del cuore in toto **(inderogabile)**
  - Prelievo dei glomi carotidei**(opzionale)**
  - Prelievo del ganglio stellato (qualora sia possibile reperirlo) bilateralmente **(opzionale)**.

©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

- **In caso di tumore pleurico o peritoneale e di malattie professionali quali silicosi e asbestosi occorre prelevare i due polmoni in toto**, che dopo i prelievi routinari verranno consegnati all'Osservatorio Regionale per le Malattie Professionali, se richiesto, dopo opportuna segnalazione del caso.

- **In caso di morte traumatica** il campionamento riguarderà la o le lesioni che avranno causato la morte con più probabilità, più ogni altra lesione macroscopicamente evidente.

- **In caso di cadavere in avanzato stato di decomposizione** (stadio enfisematoso o successivi) **si possono non effettuare prelievi**. Tuttavia in casi di **aterosclerosi coronarica significativa** è meglio campionare il cuore in quanto si possono ancora evidenziare miocardiosclerosi e/o pregressi infarti miocardici.

NOTA BENE

1) *Il campionamento e l'allestimento dei preparati deve essere effettuato entro 30 (trenta) giorni dall'esecuzione dell'autopsia per permettere la definizione del caso entro i 60 giorni previsti dalle Procedure interne*
2) *La refertazione dei preparati istologici ovvero la loro revisione deve essere eseguita inderogabilmente in presenza del medico settore.*

4.5 Procedura Campionamento Istologico

Prima di iniziare il campionamento bisogna vestirsi secondo quanto prescritto per la protezione dei rischi per la salute e sicurezza, coerentemente a tutte le prescrizioni applicabili dell'ASL TO1 a Salute e Sicurezza e alle procedure/protocolli collegati.In particolare è necessario indossare camice monouso, occhiali protettivi, guanti antitaglio e guanti in lattice. A questo punto le attività da eseguire sono, in sequenza:

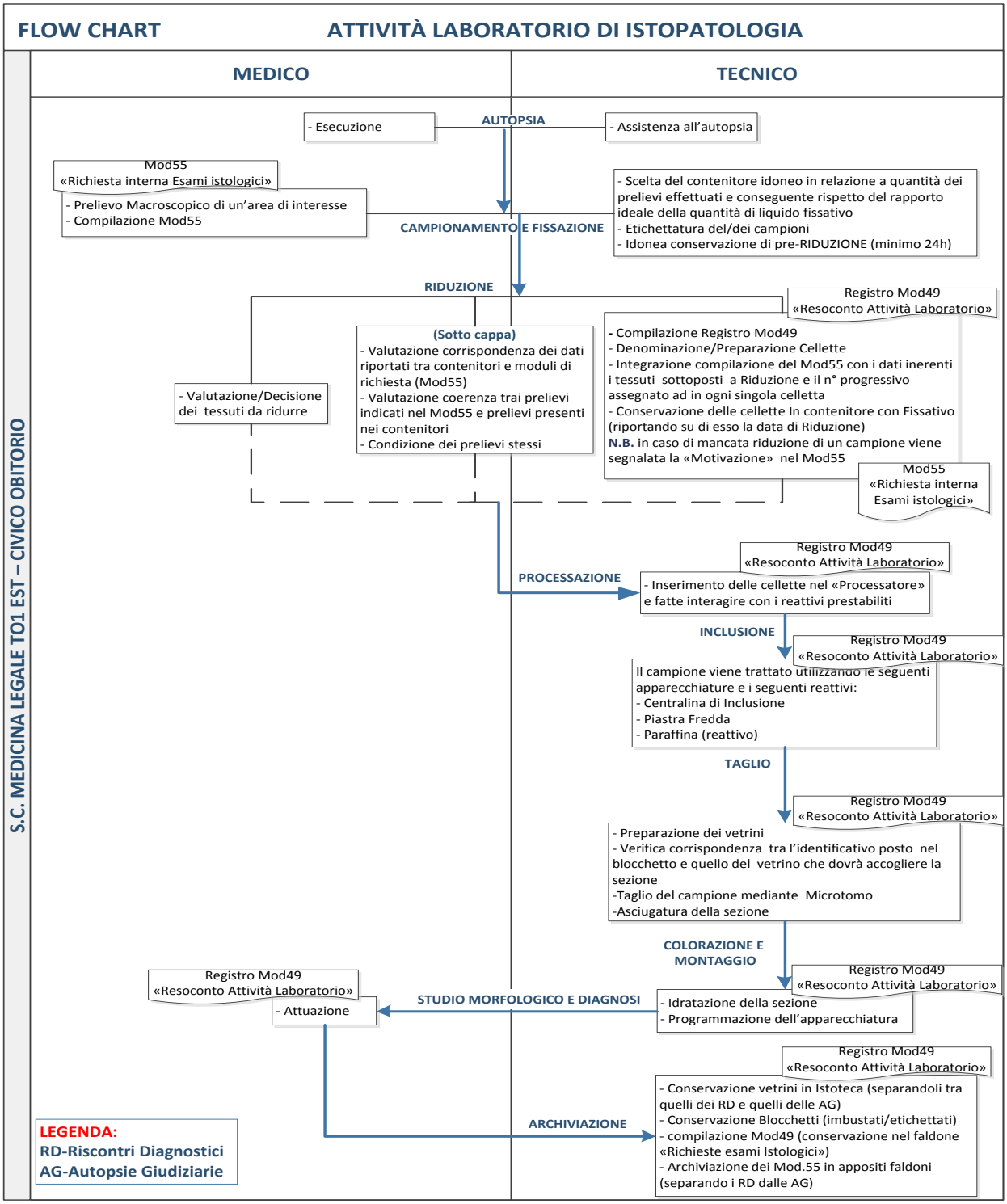
a) Accendere la cappa aspirante
b) Preparare lo strumentario necessario al campionamento e riporlo all'interno della cappa: bisturi, pinze, cellette, matita, garze, piano d'appoggio
c) Preparare il contenitore dei prelievi effettuati durante l'autopsia e riporlo sotto la cappa aspirante
d) Preparare un contenitore adeguato contenente formalina al 10% dove accogliere i campionamenti effettuati (e già riposti nelle apposite cellette) su cui indicare nome del defunto e numero di autopsia)
e) Preparare il foglio di richiesta esami istologici da inviare al laboratorio, che deve riportare il nome del medico settore/campionatore, i dati anagrafici del defunto, la data dell'autopsia e specificare se essa sia stata un Riscontro Diagnostico o una Autopsia Giudiziaria; il numero di campionamenti effettuati e le colorazioni o le reazione immunoistochimiche richieste
f) Preparare le cellette di inclusione in plastica apposite, le quali accoglieranno la sezione da sottoporre ad esame istologico; bisognerà segnare nome del numero di autopsia, numero progressivo del campionamento (es. 1, 2, 3 etc.)
g) Trascrivere su foglio a parte a cosa corrisponde la sezione inclusa con lo specifico numero progressivo: es 1 = cuore VSX parete anteriore 1/3 sup., 2= polmone LSD etc.
h) Se il caso lo richiede fotografare le lesioni che si ritengono più significative
i) Eseguire praticamente le sezioni.

5 FASI OPERATIVE

5.1 Sequenza delle attività

Lo sviluppo delle attività è sintetizzato nella flow-chart in Figura 2.

FIGURA 2. SVILUPPO DELLE ATTIVITÀ



©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

Nella pratica attuale le attività presso il Civico Obitorio di Torino- Laboratorio di Istopatologia- si suddividono e si articolano come segue.

5.2 Campionamento in sala autoptica e fissazione

A cura del medico legale.

- Prelievo macroscopico di un'area di interesse per l'indagine istologica.
- Compilazione de modulo "Mod55_RichiestaInternaEsamiIstologici_Edizione1"

A cura del tecnico.

- Scelta del contenitore idoneo
- Etichettatura del campione indicando i seguenti dati:

N° ML	
COGNOME E NOME DEFUNTO	
DATA ESECUZIONE RISCONTRO	TIPO DI RISCONTRO
COGNOME MEDICO	TIPO PRELIEVO

Terminate queste operazioni il campione viene riposto nell'apposito armadio poiché non può essere ridotto prima che siano trascorse minimo 24 ore.

5.3 Riduzione

Responsabile: medico, sempre in presenza dei tecnici di laboratorio.

Prima di iniziare il campionamento bisogna vestirsi secondo quanto prescritto per la protezione dei rischi per la salute e sicurezza, coerentemente a tutte le prescrizioni applicabili dell'ASL TO1 a Salute e Sicurezza correggere e alle procedure/protocolli collegati. In particolare è necessario indossare camice monouso, occhiali protettivi, guanti antitaglio e guanti in lattice. A questo punto le attività da eseguire sono, in sequenza:

j) Accendere la cappa aspirante
k) Preparare lo strumentario necessario al campionamento e riporlo all'interno della cappa: bisturi, pinze, cellette, matita, garze, piano d'appoggio
l) Preparare il contenitore dei prelievi effettuati durante l'autopsia e riporlo sotto la cappa aspirante
m) Preparare un contenitore adeguato contenente formalina al 10% dove accogliere i campionamenti effettuati (e già riposti nelle apposite cellette) su cui indicare nome del defunto e numero di autopsia)
n) Preparare la documentazione necessaria
o) Se il caso lo richiede fotografare le lesioni che si ritengono più significative
p) Eseguire praticamente le sezioni.

A cura del medico legale e del tecnico.
La riduzione viene eseguita una volta raggiunti almeno i 13 – 15 casi di campionamento; quindi la tempistica è notevolmente influenzata dal numero delle salme giunte in Obitorio sui quali vengono eseguite autopsie ed è pertinente fare una indagine istologica.

Tecnico
Compila il registro "Mod49_ResocontoAttivitàLaboratorio_Edizione0" indicando il n° ML e il numero dei blocchetti prodotti.

©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

Vengono preparate le cellette (foto 4.4.a)nelle quali verranno accolti i tessuti che subiranno la riduzione. Ogni celletta viene preventivamente nominata nella parte anteriore con lo stesso n° di ML riportato sull'etichetta del campione e sul modulo di richiesta esami (Mod55_RichiestaInternaEsamiIstologici) e nelle parti laterali con un n° progressivo partendo dal n° 1.

Medico (sotto cappa) e tecnico
Si confrontano i dati riportati sull'etichetta del contenitore con i dati del modulo di richiesta esami istologici (Mod55). Successivamente si valutano:
- la coerenza tra i prelievi indicati sul Mod55 e quelli realmente presenti nel contenitore,
- le indicazioni sullo stato della salma e cliniche fornite dal medico che ha eseguito l'autopsia,
- le condizioni dei prelievi stessi.

In base a queste considerazioni, il medico stabilisce quali tessuti ridurre e quali no. L'elenco dei tessuti, l'organo di provenienza sui quali si è deciso di indagare e il n° (progressivo posto sul laterale) della celletta a cui vengono assegnati viene indicato sul retro del modulo di richiesta esami istologici (Mod55). In attesa del passaggio successivo le cellette vengono raccolte in un barattolo contenente fissativo e sul contenitore di origine viene indicata la data di riduzione e conservato negli appositi armadi. Nel caso in cui un campione non venga ridotto viene segnalato sul Mod 55 la motivazione, sul Mod 49 e sul barattolo la mancata riduzione.

FOTO 1, 2, 3. CELLETTE

5.4 Processazione

Responsabili: tecnici di laboratorio.

Il pezzo una volta campionato e fissato deve acquisire caratteristiche di PLASTICITÀ e DUREZZA tali da renderlo sezionabile al microtomo. Benché la fissazione provochi l'indurimento del pezzo, questa da sola non basta a garantire le caratteristiche suddette.

Affinché, inoltre, il prelievo sia adeguatamente sezionato, colorato e conservato nel tempo è indispensabile che venga imbibito (permeato) in una sostanza chimicamente inerte (PARAFFINA).

La processazione, quindi, consiste in una serie di passaggi che servono ad eliminare il contenuto acquoso per poter includere il campione in paraffina, essendo quest'ultima una sostanza NON idrosolubile e NON solubile in alcool.

A cura del tecnico. Tutte le cellette vengono quindi inserite nel processatore (foto 4) ed, in maniera automatizzata, tramite dei programmi preimpostati, i tessuti vengono disidratati, diafanizzati e permeati (imbibiti) attraverso lo stazionamento per frazioni di tempo prestabilite in una serie di reattivi:
- disidratati: in una scala ascendente di alcool;
- diafanizzati: con un solvente(in genere xilolo) per permettere l'eliminazione di residui alcolici non miscibili in paraffina e per chiarificare il pezzo;

©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

- permeati (imbibiti) in paraffina liquida (temperatura variabile tra i 54°C ed i 60°C).

FOTO 4. PROCESSATORE

Sullo strumento sono impostati il programma "Routine" e il programma "Week end" che prevedono:

			Routine	WeeK End
Etanolo 70	1h		Fase di ritardo	
Etanolo 70	1h			
Etanolo 90	1h			
Etanolo 90	1h			
Etanolo 100	1h			
Etanolo 100	1h			
Etanolo 100	1h			
Xilene	1h			
Xilene	1h			
Xilene	1h	Temperatura 50° C		
Paraffina	1h	Temperatura 60° C		
Paraffina	1h	Temperatura 60° C		
Paraffina	1h	Temperatura 60° C		Fase di ritardo

Per una durata complessiva di 13 ore e 34 minuti per entrambi i cicli.

Al termine di ogni processazione lo strumento richiede e propone una serie di lavaggi:

- Lavaggio prolungato della durata 1h 06min che prevede:clearing xilene 9 cicli; clearing ethanol 6 cicli; detergent 3 cicli; cleaning water 3cicli; il tutto a 65 °C.
- Lavaggio normale della durata 55 minuti che prevede: clearing xilene 9 cicli; clearing ethanol 6 cicli; clearing water 2cicli; il tutto a 65 °C.
- Lavaggio rapido della durata 45 minuti che prevede: clearing xilene 7 cicli a 65°C

Lo strumento è impostato in maniera da conteggiare il numero di cicli effettuati da ogni cambio reagenti e pertanto segnala quando è necessario sostituire i reattivi esauriti.

Il filtro a carbone attivo viene cambiato ogni 120 giorni.

©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

5.5 Inclusione

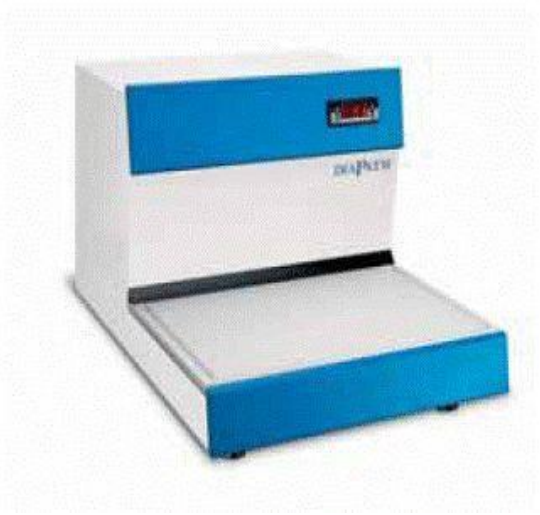
Responsabili: tecnici di laboratorio.

Tecnico

Dal processatore ci si sposta alla centralina di inclusione, attrezzatura costituita da una parte riscaldata (foto 5), mantenuta alla temperatura di fusione della paraffina(56-58 °C), costituita da un serbatoio e un rubinetto che serve per far colare la paraffina attorno al pezzo per la costruzione del blocchetto e da una parte fredda (foto 6) mantenuta a circa 0/1°C che serve per far solidificare la paraffina ed ottenere il blocchetto pronto al taglio.

FOTO 5. CENTRALINA INCLUSIONE E SERBATOIO

FOTO 6. PIASTRA FREDDA



Dalle cellette si estrae il pezzo e lo si posiziona su di una formella delle dimensioni adeguate; colando un po' di paraffina sulla base della stessa si orienta il campione secondo le disposizioni del medico e lo si fa aderire raffreddandolo un po' alla base(foto 7).

FOTO 7.FASE DELL'INCLUSIONE

©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

Successivamente, si posiziona aggiungendo ancora della paraffina, la parte inferiore della celletta che ha ospitato il prelievo sino ad ora che è contrassegnata con il n° di ML ed il n° progressivo. Si pone il tutto a solidificare sopra la piastra di raffreddamento. A questo punto si è ottenuto il blocchetto pronto per il taglio al microtomo (foto 8 e 9).

FOTO 8

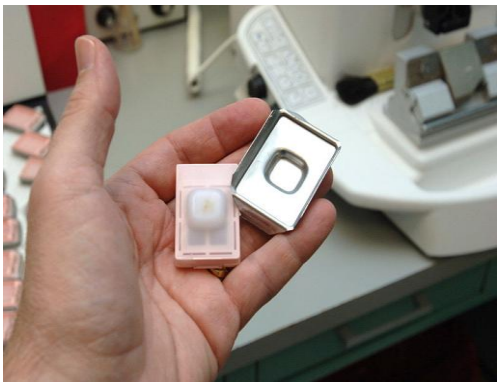


FOTO 9

5.6 Taglio

Responsabili: tecnici di laboratorio.

A cura del tecnico. Il microtomo è un apparecchio che consente di tagliare i tessuti in sezioni sottilissime, di 3 - 5 □di spessore, ciò permette al microscopio di osservare una sezione cellulare lineare, senza cioè sovrapposizioni di più strati di cellule che impedirebbero una corretta analisi.

Si prepara un numero di vetrini identificati con il n° di ML e il numero progressivo del caso in esame. Si posiziona il primo blocchetto sul microtomo e dopo una prima fase di "sgrossatura" (cioè rimozione grossolana della paraffina superficiale e livellatura del pezzo) si procede al taglio dello spessore richiesto (foto 10 e 11).

Foto 10. Fasi del taglio al microtomo

Foto 11. Fasi del taglio al microtomo

©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

Individuata la sezione migliore (per spessore e integrità) con l'ausilio di pennelli la si pone su un bagno riscaldato (foto 12) per permetterne la distensione e la raccolta sul vetrino.

Foto 12. Bagno riscaldato

La sezione viene fatta asciugare per migliorarne l'aderenza ed è pronta per essere colorata. Nel passaggio tra un blocchetto ed un altro si verifica la congruenza tra l'identificativo del blocchetto e del vetrino che dovrà accogliere la sezione.

5.7 Colorazione e Montaggio

Responsabili: tecnici di laboratorio.

Colorazione: avviene attraverso l'utilizzo di coloranti che permettono di mettere in evidenza le diverse strutture biologiche sfruttando le affinità tra questi e i tessuti. I meccanismi con cui le sostanze coloranti colorano i tessuti biologici si basano principalmente su tre tipologie:

- COLORAZIONI CHIMICHE. La reazione tra colorante e tessuto avviene seguendo le leggi dei legami chimici.
- COLORAZIONI FISICHE. La colorazione avviene per mezzo di meccanismi fisici ed è indipendente dalla presenza di gruppi attivi nel colorante o nel tessuto.
- COLORAZIONI FISICO-CHIMICHE. Sono generalmente le colorazioni più usate per mettere in evidenza le sostanze di natura proteica; queste ultime, infatti, si comportano indifferentemente come acide o basiche a seconda del PH del mezzo (anfoteri). In particolare, se il PH del mezzo è superiore al punto isoelettrico della proteina questa si comporta come acido e quindi tende a formare sali con i coloranti basici (basofilia), se invece il PH del mezzo è inferiore al punto isoelettrico della proteina essa si comporterà come una base reagendo con il colorante acido (acidofilia).

Vengono allestite colorazioni di tipo manuale che vengono effettuate tramite l'uso di appositi kit, e di tipo automatizzato mediante un coloratore. Il montaggio avviene tramite l'utilizzo dell'apposito strumento o manualmente.

A cura del tecnico.

La colorazione e il montaggio del vetrino sono automatizzate. La procedura prevede l'idratazione della sezione con una serie di passaggi a ritroso nei liquidi di disidratazione (detta anche sparaffinatura), ovvero xilolo, alcoli e acqua. Questi passaggi servono per rendere la sezione affine ai coloranti che sono principalmente idrofili.

In base alle colorazioni di maggior interesse ed utilizzo, si programma lo strumento impostando l'ordine di sequenza dei seguenti passaggi:

- asciugatura, tempi e temperatura;
- reidratazione, reattivi e tempo di permanenza;
- coloranti e tempo di permanenza;

- disidratazione, reattivi e tempo di permanenza;
- montaggio.

FOTO 13. COLORATORE AUTOMATICO E MONTAVETRINI

Attualmente le colorazioni e i processi attuati in laboratorio sono i seguenti:
Sul coloratore automatico sono programmate:

- Sparaffinatura

Reattivo	Tempi
❖ Asciugatura	❖ 1 minuti
❖ Xilene	❖ 6 minuti
❖ Xilene	❖ 6 minuti
❖ Alcool 100%	❖ 5 minuti
❖ Alcool 95%	❖ 3 minuti
❖ Alcool 70%	❖ 3 minuti
❖ Acqua distillata	❖ 2 minuto

- Ematossilina

Reattivo	Tempi
❖ Asciugatura	❖ 10 minuti
❖ Xilene	❖ 5 minuti
❖ Xilene	❖ 5 minuti
❖ Alcool 100%	❖ 3 minuti
❖ Alcool 95%	❖ 3 minuti
❖ Alcool 70%	❖ 3 minuti
❖ Acqua distillata	❖ 1 minuto
❖ Ematossilina di Mayers	❖ 6 minuti

©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

Reattivo	Tempi
❖ Acqua distillata	❖ 1 minuto
❖ Lavaggio	❖ 5 minuti
❖ Eosina	❖ 6 minuti
❖ Lavaggio	❖ 1 minuto
❖ Alcool 70%	❖ 2 minuti
❖ Alcool 95%	❖ 2 minuti
❖ Alcool 100%	❖ 2 minuti
❖ Xilene	❖ 5 minuti
❖ Xilene	❖ 5 minuti

- Disidratazione

Reattivo	Tempi
❖ Alcool 70%	❖ 2.30 minuti
❖ Alcool 95%	❖ 2.30 minuti
❖ Alcool 100%	❖ 2.30 minuti
❖ Xilene	❖ 2.30 minuti
❖ Xilene	❖ 2.30 minuti

Con l'ausilio di kit si eseguono le seguenti colorazioni manuali :

- Masson tricromica Con blu di anilina

Questa metodiche viene utilizzata con l'ausilio del kit della ditta Bio-Optica che prevede:

Reattivi	Tempi
❖ Ematossilina ferrica sec.weiger sol B	❖ 10 minuti
❖ Ematossilina ferrica sec.weiger sol A	❖ 10 minuti
❖ Acido picrico soluzione alcolica	❖ 4 minuti
❖ Ponceau B soluzione	❖ 4 minuti
❖ Acido fosfomolibdico soluzione	❖ 10 minuti
❖ Blu anilina sec. masson	❖ 5 minuti

Metodica di colorazione:

1. Portare la sezione all'acqua distillata
2. Porre sulla sezione 6 gocce del **reattivo A**, aggiungervi 6 gocce del **reattivo B**:lasciare agire 10 minuti
3. Senza lavare, sgocciolare il vetrino e porre sulla sezione 10 gocce della **soluzione C**:lasciare agire 4 minuti
4. Lavare rapidamente (3-4 secondi) in acqua distillata lasciando la sezione di colore giallo e porre sul vetrino 10 gocce della **soluzione D**:lasciare agire 4 minuti
5. Lavare in acqua distillata e porre sulla sezione 10 gocce della soluzione E: lasciare agire 10 minuti
6. Lavare in acqua distillata e disidratare rapidamente attraverso la serie ascendente degli alcol sostando per 1 minuto nell'ultimo assoluto: xilene e balsamo

- Van Gieson tricromica sec. Weigert

  Questa metodica viene utilizzata con l'ausilio del kit della ditta DIAPATH che prevede:

Reattivi	Tempi
❖ Ematossilina Weigert Sol A	❖ 10 minuti
❖ Ematossilina Weigert Sol B	❖ 10 minuti
❖ Picrofucsina	❖ 10 minuti

Metodica di colorazione:

Sgocciolare i reagenti direttamente sul campione in modo da coprire completamente la sezione. Per evitare l'eccessiva asciugatura della sezione si suggerisce di utilizzare una camera umida.

1. Paraffinare le sezioni e portarle fino all'acqua distillata
2. Coprire le sezioni con 5 gocce **reagente A** e 5 gocce **reagente B** per 10 minuti
3. Lavare con acqua corrente per 10 minuti
4. **Reagente C** per 10 minuti
5. **Disidratare rapidamente , xilolo o sostituto. Montaggio in balsamo.**

Le metodiche descritte sono in uso dal 18/01/2011.

5.7.1 Rintracciabilità reagenti

Dal 17.11.2011 è in uso il RegistroMagazzinoLaboratorio_Edizione0 Mod 57, sul quale vengono registrati i reattivi ordinati, segnalando tra le caratteristiche, in particolar modo il n° di lotto e la data di scadenza. Interfacciando il sopracitato modulo con il Registro Manutenzione Coloratore (Mod 56 in uso dal 30.01.2012 per tenere traccia della frequenza del cambio reagenti del coloratore) e con il Mod 49 ResocontoAttivitàLaboratorio, si è in grado di conoscere per ogni reagente il lotto utilizzato per i processi di sparaffinatura, colorazione di ematossilina-eosina e disidratazione di un dato gruppo di campioni.

5.8 Studio Morfologico e Diagnosi

A cura del medico.

5.9 Archiviazione

Responsabili: tecnici di laboratorio.

A cura del tecnico

Quando il medico riconsegna il caso, si pongono i vetrini nell'apposita istoteca separando quelli dei Riscontri Diagnostici (RD) da quelli delle Autopsie Giudiziarie (AG). I blocchetti, invece, vengono raccolti caso per caso, inbustati, etichettati e conservati dividendoli annualmente in ordine di ML.

Si compila il Mod 49 con la data di archiviazione nella colonna corrispondente. Questi modelli vengono conservati nel faldone "Richieste esami istologici" in quanto devono essere facilmente accessibili nel caso in cui sia necessario recuperare dati e /o fare ulteriori accertamenti anche su casi di anni precedenti.

I Mod 55 vengono raccolti in appositi faldoni seguendo il n° di ML e separando gli RD dalle AG (Archivio Esami Istologici RD annuale e Archivio Esami Istologici AG pluriennale)

©I contenuti del documento sono di proprietà della SC Medicina Legale dell'ASL TO1

6 RISORSE UMANE NECESSARIE

I ruoli coinvolti nell'esecuzione delle attività descritte nel Piano della Qualità sono:
- Medico Settore/campionatore
- Personale Tecnico del Laboratorio
- Anatomo Patologo.

Tutti i ruoli indicati, oltre alle qualifiche eventualmente necessarie e previste dalla normativa applicabile, deve possedere approfondita conoscenza, ciascuno per la propria area di competenza, delle procedure e dei documenti di pianificazione delle attività formalizzati dal SGQ.

7 RISORSE MATERIALI UTILIZZATE

Tipo di risorsa	Eventuali note
Strumenti e apparecchiature di Sala Settoria	===
Strumenti e apparecchiature di Laboratorio	===

8 EVENTUALI INDICATORI CORRELATI

Dettaglio indicatori	Modalità di calcolo e incaricati	Eventuale standard
Tempi di effettuazione della campionatura	Tecnico di Laboratorio	100%, entro 60 giorni dall'esecuzione dell'autopsia, comunque dipendente dalla quantità di campioni da far proseguire nell'indagine istologica