



Dipartimento di Medicina Preventiva e dei Servizi
U.O.C. Anatomia Patologica

ISTRUZIONI OPERATIVE DEL PROCESSO DI ISTOLOGIA

- 1 **SCOPO**
- 2 **CAMPO DI APPLICAZIONE**.....
- 3 **RIFERIMENTI**
- 4 **RESPONSABILITA'**
- 5 **DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI**.....
- 6 **MODALITÀ DI GESTIONE**

<i>redazione</i>	<i>verifica</i>	<i>Approvazione (firma e data)</i>		<i>Rev.</i>	<i>Descrizione modifica</i>
FP	FP	SB	30-08-13	0	
FP	FP	SB	14-02-14	1	Aggiornamento
FP	FP	SB	07-04-16	2	Aggiornamento
FP	FP	SF	22-09-17	3	Aggiornamento
ADG	ADG	SF	28-02-19	4	Aggiornamento

1. SCOPO

Scopo di questa procedura sono le istruzioni operative che deve seguire tutto il personale afferente all'U.O. di Anatomia Patologica per l'esecuzione delle varie fasi caratterizzanti il processo di Istologia, al fine di tenere sotto controllo il processo di produzione.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La seguente procedura si applica nell'U.O. Anatomia Patologica della Fondazione IRCCS "Ca Granda" OMP a tutte le attività legate al processo produttivo a partire dal ricevimento dei campioni e delle richieste fino alla firma e messa a disposizione del referto, sia per pazienti ricoverati, sia per



Dipartimento di Medicina Preventiva e dei Servizi
U.O.C. Anatomia Patologica

i pazienti ambulatoriali e di strutture convenzionate.

3. RIFERIMENTI

Interni

DO.519 Documento di organizzazione.
P.01.519 Gestione del Processo di Istologia
IO.02.SITRA
P.33.F

Esterni

Circolare n° 61 N900.2/AG464/260.
Theory and Practice of Histological Techniques. J.D.Bancroft-M.Gamble. 2002 Curchill-Livingstone

4. RESPONSABILITA'

Funzione	Responsabilità
RUO	Verifica la corretta e completa applicazione delle seguenti Istruzioni Operative
Medici di Istologia	Esame macroscopico e campionamento, esame estemporaneo al criostato, diagnosi istologiche, stesura e firma referti istologici
Coordinatore tecnico	Gestione del personale tecnico ed ausiliario
Tecnici di Istologia	Accettazione e verifica, processazione, inclusione, taglio, colorazione, montaggio vetrini, archiviazione vetrini e blocchetti, gestione archivio
Personale di Segreteria	Registrazione/accettazione informatica (log-in), distribuzione referti, archiviazione referti, gestione archivio cartaceo
Ausiliari	Pulizia, smaltimento pezzi e rifiuti



Dipartimento di Medicina Preventiva e dei Servizi
U.O.C. Anatomia Patologica

5. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI

AFIP	Armed Forces Institute of Pathology
WHO	World Health Organization Classification
ISH	In Situ Hybridization

6. ISTRUZIONI OPERATIVE

6.1 TRASPORTO E CONSERVAZIONE

Per il trasporto di materiale biologico si rimanda alle Istruzioni Operative della Fondazione P.33.F Rev 2, I.O.02.SITRA Rev. 4.

I pezzi chirurgici devono essere confezionati con metodica sottovuoto entro 30 minuti dal prelievo; devono essere conservati nell'apposito frigorifero ad una temperatura media di 4° gradi, possono rimanere in frigorifero 48-72 ore, poi devono essere posizionati negli appositi contenitori termici per il trasporto, la catena del freddo viene garantita dai siberini inseriti nei contenitori unitamente alle buste.

Alternativamente i pezzi chirurgici, dopo il prelievo, devono essere conservati (fissati) in formalina tamponata al 10% e posizionato in contenitori di plastica monouso a tenuta con un rapporto tra materiale biologico e fissativo di 1:10.

Tutto il materiale biologico, dopo il prelievo deve essere conservato (fissato) in formalina tamponata al 10% e posizionato in contenitori di plastica monouso a tenuta con un rapporto tra materiale biologico e fissativo di 1:10.

Il materiale biologico per gli esami estemporanei o per colorazioni speciali (immunofluorescenza) deve essere posizionato a fresco in contenitori di plastica monouso a tenuta e deve essere consegnato al Laboratorio entro 30 minuti dal prelievo.

6.2 ACCETTAZIONE E VERIFICA

Viene effettuata dal Tecnico di turno.

Il Tecnico di turno è colui che di fatto riceve in prima persona il materiale e si accerta della congruità della richiesta e della corrispondenza tra richiesta e materiale:

- Il materiale biologico deve pervenire sempre accompagnato dalla richiesta di esame istopatologico correttamente compilata
- Il personale di turno all'accettazione verifica la corrispondenza tra i dati presenti sulla richiesta e quelli presenti sul contenitore del campione (dati anagrafici e materiale).
- Il modulo di richiesta deve contenere come dati indispensabili:
 1. dati anagrafici del paziente (cognome e nome, data di nascita, sesso)
 2. reparto di provenienza
 3. sede/i del prelievo/i
 4. nome/firma del medico prelevatore



Dipartimento di Medicina Preventiva e dei Servizi
U.O.C. Anatomia Patologica

- Sul contenitore dei campioni devono essere riportati come dati indispensabili:
 1. cognome e nome del paziente
 2. sede del prelievo
- Il personale di turno verifica la presenza del materiale all'interno dei contenitori e la loro corrispondenza rispetto a quanto indicato sulla richiesta.
- L'assenza del materiale nel contenitore comporta la non accettazione del campione, previa informazione del personale ausiliario, tecnico o medico del reparto inviante.
- L'assenza o la non congruità dei dati sul contenitore comporta la non accettazione del campione, se non previa verifica e correzione da parte del personale medico del reparto inviante.
- Per qualsiasi difficoltà insorga nella risoluzione di problemi relativi alla identificazione o congruità dei campioni, deve essere avvisato un Medico Strutturato della U.O. di Anatomia Patologica nella stessa giornata.

Quando per le motivazioni sopra elencate, il materiale biologico non viene accettato, il personale di turno all'accettazione chiama telefonicamente il medico che ha effettuato la richiesta di esame istologico, spiegandogli la problematica ed invitandolo a recarsi presso il Laboratorio di Istologia per la risoluzione. Se tale medico è impossibilitato a recarsi presso il Laboratorio di Istologia si concorda con lui la restituzione del materiale biologico e della richiesta cartacea all'UOC richiedente per la correzione e risoluzione del caso.

6.3 REGISTRAZIONE ED ACCETTAZIONE INFORMATICA (LOG-IN)

Viene effettuata dal personale amministrativo, mediante il software "armonia" (manuale dell'operatore presente in intranet della Fondazione seguendo il percorso intranet-bacheca-software applicativo-anatomia patologica-armonia):

- Il personale tecnico consegna le richieste al personale amministrativo per l'accettazione informatica.
- Il personale amministrativo registra i campioni sull'applicativo "Armonia" (sistema di refertazione) interfacciato con l'applicativo "Vantage" (sistema di tracciabilità), assegnando un numero di identificazione univoco, comprendente anno, tipo (I-istologico), numero ed eventuali lettere identificative (a, b, c, etc) per gli esami con campioni multipli.
- Il personale amministrativo stampa le etichette con codice a barre, numero istologico, nome e cognome del paziente e le etichette con QR code (sistema di tracciabilità), facendo attenzione a dare numeri istologici non consecutivi per i seguenti materiali: biopsie epatiche, biopsie osteomidollari, biopsie prostatiche, core biopsy.
- Il personale amministrativo appone le etichette con codice a barre, numero e cognome-nome del paziente sulle richieste corrispondenti.
- Il personale amministrativo riconsegna le richieste e le relative etichette per i contenitori al tecnico di turno in accettazione.
- Il Tecnico di turno in accettazione appone le etichette con QR code generate dalla segreteria sui rispettivi contenitori, controllando la corrispondenza di numero istologico, cognome-nome e campione tra etichetta, contenitore e richiesta, evitando di sovrapporre l'etichetta col numero istologico a quella apposta dal reparto sul contenitore riportante nome e cognome.



Dipartimento di Medicina Preventiva e dei Servizi
U.O.C. Anatomia Patologica

6.4 ESAME MACROSCOPICO E CAMPIONAMENTO

Viene effettuato dal personale medico di turno per i pezzi operatori e le biopsie di grandi dimensioni.

Per il campionamento delle piccole biopsie vedi I.O. 02.519

- Il personale medico descrive pezzo chirurgico o bioptico registrandolo con dittafofo sull'applicativo "Armonia" all'interno del caso istologico corrispondente, previamente aperto tramite lettore di codice a barre.
- Il personale medico campiona il pezzo chirurgico o bioptico seguendo linee guida internazionali (United States and Canadian academy of Pathology; www.uscap.org, College of American Pathologist; www.cap.org., Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology; www.adasp.org., World Health Organization; www.who.int/ Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia diagnostica; www.siapec.it)
- Il personale medico inserisce direttamente i reperi nel software informatico "armonia", utilizzando l'apposito dittafofo e stampa le biocassette con il numero istologico e l'eventuale lettera corrispondente a quanto presente sulla richiesta.
- Il personale medico procede all'incassettamento dei campioni effettuati e al termine, tramite lettore ottico, verifica le corrispondenze dei QR code dei contenitori e delle biocassette.
- Il personale medico pone le biocassette in ordine numerico nell'apposito contenitore con fissativo (formalina al 10%) in attesa di iniziare la processazione. Se il caso campionato non è adeguatamente fissato, i campioni effettuati devono essere posizionati nell'apposito contenitore con fissativo (formalina al 10%) per essere processati il giorno seguente.

6.5 ESAME ESTEMPORANEO INTRAOPERATORIO

Viene effettuato dal personale medico e tecnico di turno. Dopo le ore 16 solo dal personale medico di turno e nelle ore notturne (dalle 19 alle 8) e nei giorni festivi solo dal personale medico reperibile.

- Il tecnico di turno accetta il campione, procede alla registrazione informatica (log-in) nel software "armonia" ed avvisa il medico di turno. In assenza del tecnico di turno, il medico di turno accetta il campione, ma la registrazione informatica avviene il giorno seguente.
- Il tecnico di turno compila l'apposito modulo per i T.A.T.
- Il medico di turno descrive macroscopicamente il campione pervenuto ed effettua il prelievo idoneo da congelare e tagliare al criostato.
- Per il congelamento e taglio il tecnico o il medico utilizza uno di due criostati Leica CM 1900 UV, presenti in laboratorio. Per il loro corretto utilizzo vedi manuale d'istruzione Leica.
- Il tecnico di turno verifica lo stato della scale di colorazione e qualora i coloranti e gli alcoolii siano sporchi o insufficienti, cambia la scala di colorazione e lo segnala sull'apposito modulo (M.18.519)
- Il tecnico di turno colora manualmente le sezioni allestite con la seguente metodica: 1' in alcool assoluto, risciacquo in acqua di fonte, 1' in ematossilina di Harris, risciacquo in acqua di fonte corrente, 15" in eosina, risciacquo in acqua di fonte, 15" in alcool 95°, 15" in alcool assoluto, 15" in alcool assoluto, 15" in xilolo e 15" in xilolo.
- Il tecnico di turno consegna i preparati al medico di turno che dopo averli visionati accuratamente al microscopio, scrive la diagnosi sul retro del foglio di richiesta e pone la





Dipartimento di Medicina Preventiva e dei Servizi
U.O.C. Anatomia Patologica

sua sigla, quindi telefona tempestivamente in sala operatoria per comunicare verbalmente la diagnosi, seguendo le indicazioni della Fondazione per il miglioramento della comunicazione tra operatori sanitari (vedi PO.01.F).

- Il tecnico di turno mette in fissativo il residuo del materiale congelato e l'eventuale residuo del materiale biptico/operatorio inviato per l'esame estemporaneo.

6.6 GESTIONE DEGLI ESAMI IN REGIME DI URGENZA

In accordo con i medici curanti e i clinici della Fondazione o esterni, a seconda delle necessità per l'iter diagnostico-terapeutico dei pazienti, è possibile allestire preparati istologici in regime di urgenza utilizzando uno strumento di processazione rapida (Thermo Fisher Excelsior) con un ciclo di processazione della durata totale di 3 ore.

In tal modo, è possibile ottenere una diagnosi istologica definitiva in un tempo massimo di 5 ore.

6.7 PROCESSAZIONE

Viene effettuata dal personale tecnico di turno, dal Lunedì al Venerdì, mediante il processatore automatico PELORIS LEICA (vedi manuale degli strumenti). La procedura avviene durante la notte, il ciclo completo richiede 13 ore.

- Il tecnico di turno in accettazione carica il processatore alle ore 15.30-16.00 con le biocassette contenenti sia pezzi operatori, sia biopsie (programma ROUTINE).
- Il mattino successivo, il tecnico di turno in inclusione scarica il processatore e suddivide le biocassette per l'inclusione manuale da quelle per l'inclusione automatica.
- Durante la fase della processazione non è richiesta la presenza del personale tecnico, né di quello medico.

6.8 INCLUSIONE

E' una procedura effettuata dal personale tecnico di turno, prevalentemente automatizzata, ma una parte viene effettuata manualmente. Si svolge dal Lunedì al Sabato, durante la mattina. Gli strumenti utilizzati sono l'inclusore automatico (TISSUE-TEK-AUTOTEC SAKURA) e quello manuale (EMBEDDING CENTER DPH800 DIAPATH). La procedura di solito termina verso le ore 13.00.

- Il tecnico di turno in inclusione, al mattino, preleva le biocassette dal processatore e le conta.
- Le biocassette che devono essere incluse automaticamente vengono caricate nell'inclusore SAKURA, che viene fatto partire.
- Le restanti biocassette, quelle da includere manualmente (biopsie renali, epatiche, prostatiche, osteomi doliari, mammarie e citoinclusi), vengono poste nella cassetta di raccolta, nella postazione dell'inclusore (DIAPATH).
- Le biocassette vengono prese una ad una per la verifica, tramite lettore ottico, del QR code e poste sul banco di lavoro.
- Il tecnico di turno prende una vaschetta di metallo della dimensione adeguata al campione da includere, gli mette la paraffina e successivamente, con le pinze elettriche, prende il pezzo e lo depone all'interno della vaschetta di metallo; infine, chiude la vaschetta con la relativa biocassetta.



Dipartimento di Medicina Preventiva e dei Servizi
U.O.C. Anatomia Patologica

- Una volta ripetuta questa operazione per tutte le biocassette presenti nella vasca di raccolta, depone le cassette incluse, in ordine numerico, nel raccogliatore sul tavolo alle spalle della postazione dell'inclusione.

6.9 TAGLIO

E' una procedura ancora totalmente manuale. Viene svolta tutti i giorni dal tecnico di turno dalle ore 7.45 alle 16.00.

- Il tecnico di turno prende le biocassette nel raccogliatore e le depone sulla piastra di raffreddamento accanto al microtomo.
- Seleziona, tramite lettore ottico, dal software "Vantage" il numero del caso e verifica la presenza di tutte le biocassette da tagliare del caso stesso.
- Il tecnico di turno, tramite il lettore ottico dell'applicativo "Vantage", stampa le etichette da apporre sul vetrino corrispondente a ciascuna biocassetta.
- Prende la cassetta e la mette sul microtomo per iniziare la procedura che prevede una fase di sgrossamento ed una di taglio della sezione completa.
- Quando la sezione è tagliata, viene presa e posta sul vetrino corrispondente.
- La procedura del taglio di sezioni per colorazioni immunoistochimiche è effettuata dal tecnico di turno solo tramite la richiesta via software informatico "Armonia" effettuata dal personale medico.
- Terminato il taglio, i vetrini vengono messi nel termostato ad asciugare.

6.10 TAGLIO PER ESAMI DI PATOLOGIA MOLECOLARE

E' una procedura ancora totalmente manuale. Viene svolta tutti i giorni dal tecnico di turno dalle ore 7.45 alle 16.00.

- La procedura del taglio di sezioni per esami di Patologia Molecolare è effettuata dal tecnico di turno su richiesta via software informatico "Armonia" effettuata dal Dirigente Biologo Responsabile.
- Una volta verificato il tutto, depone le biocassette sulla piastra di raffreddamento accanto al microtomo.
- Il tecnico pulisce il microtomo e le pinze con Etanolo al 70% e indossa guanti in vinile/lattice per evitare contaminazioni.
- Il tecnico prende la cassetta e la mette sul microtomo per iniziare la procedura.
- Quando la sezione (spessore 10 micron) è tagliata, viene presa arrotolata e posizionata nella provetta conica da 1,5 ml corrispondente.
- Per la metodica FISH, quando la sezione (spessore 3 micron) è tagliata, viene presa e posta sul vetrino corrispondente.

6.11 COLORAZIONE E MONTAGGIO VETRINI

E' una procedura completamente automatizzata (coloratore automatico ST 5020 LEICA, montatore automatico CV 5030 LEICA), effettuata dal personale tecnico di turno durante l'orario di servizio, dalle 7.45 alle 16.00. Le colorazioni effettuate sono la "ematossilina eosina" (EE) e il GIEMSA (biopsie gastriche e osteomidollari).



Dipartimento di Medicina Preventiva e dei Servizi
U.O.C. Anatomia Patologica

- Il tecnico di turno preleva i vetrini dal termostato, suddividendo quelli che devono essere colorati con EE, da quelli con GIEMSA.
- I porta vetrini corrispondenti vengono distinti da clip di colore rosso per le EE, azzurro per il GIEMSA.
- Successivamente i vetrini vengono portati nel coloratore automatico per essere colorati e montati.
- Finita la procedura, il tecnico mette i vetrini nel vassoio e controlla, tramite lettore ottico, la corrispondenza tra numero di vetrini effettivi ed il caso istologico, poi consegna il tutto al medico a cui i casi sono stati associati.

6.12 TECNICHE SPECIALI

E' una procedura effettuata dal personale tecnico di turno per studiare il fenotipo di cellule e tessuti in modo complementare all'attività diagnostica istologica, mediante differenti metodologie. Le indagini effettuate sono immunoistochimica, colorazioni speciali (Istochimica), Immunofluorescenza, Istoenzimatica ed ibridizzazione in situ. Gli strumenti utilizzati sono per le immunoistochimiche ed immunofluorescenza OMNIS della ditta DAKO, per le colorazioni speciali il NEXES SPECIAL STAIN e per ibridizzazione in situ l'incubatore SPOT LIGHT CISH HYBRIDIZER. (Vedi manuale degli strumenti).

- Il tecnico di turno preleva i vetrini che precedentemente erano stati messi nel termostato e li porta nel laboratorio tecniche speciali.
- Controlla sulla lista delle colorazioni richieste dal personale medico sull'applicativo "Armonia".
- Prepara le etichette da apporre sui vetrini.
- I vetrini vengono inseriti negli strumenti appositi e vengono caricati i relativi reattivi per le colorazioni.
- L'ISH viene richiesta dal medico interno ed è una procedura completamente manuale.
- Il tecnico di turno segue le istruzioni fornite dalla ditta (DAKO).
- Infine, viene effettuata la consegna al medico.

6.12 DISTRIBUZIONE E ARCHIVIAZIONE REFERTI

- Il personale amministrativo esegue tutti i giorni la distribuzione dei referti dopo aver associato copia degli stessi alla richiesta del reparto. I referti originali vengono messi nelle varie buste corrispondenti ai reparti e ambulatori dove gli esami sono stati effettuati e sono sistemate in uno scatolone in attesa del prelevamento da parte del personale adibito al trasporto della Fondazione.
- Dal 1-6-2013 i referti sono firmati digitalmente, pertanto possono essere visualizzati e stampati dai Reparti tramite software "order-entry".
- L'archiviazione viene effettuata dal personale amministrativo. Le richieste con allegata copia della diagnosi vengono suddivise in centinaia, in ordine cronologico, e archiviate in scatole di cartone con l'indicazione dell'anno e dell'intervallo di codici identificativi inclusi. Le scatole vengono conservate nel locale Archivio situato nel Pad. Bosisio per un anno, quindi trasferite nei locali deposito/archivio di via Pace, 9.
- Il referto informatico con firma digitale viene conservato perennemente nel software "armonia" di Dedalus S.p.A.





Dipartimento di Medicina Preventiva e dei Servizi
U.O.C. Anatomia Patologica

6.13 CONSERVAZIONE MATERIALE BIOLOGICO DIAGNOSTICO

I preparati istologici e le rispettive inclusioni in paraffina sono conservate a tempo illimitato, la circolare del Ministero della Sanità n° 61 del 19-12-1986 N 900.2/AG464/260 prevede la conservazione per un tempo minimo di 20 anni.

I preparati istologici sono conservati per i primi 5 anni nel seminterrato del Pad. Bosisio, poi trasferiti nei locali deposito/archivio di Via Pace 9.

Le inclusioni in paraffina sono conservate per i primi 3 anni nel seminterrato e solaio del Pad. Bosisio, poi trasferiti nei locali deposito/archivio di Via Pace 9.

6.14 COMPORTAMENTO DA TENERSI IN CASO DI GUASTO DELLA STRUMENTAZIONE

In caso di necessità o di guasto di uno degli strumenti di processazione/inclusione/taglio/colorazione del materiale biologico inviato per esame istologico, l'UOC si può rivolgere ad un ente esterno per completare l'allestimento dei preparati istologici previa autorizzazione della Direzione Sanitaria di Presidio e compilazione dell'apposito modulo M.26.519.

