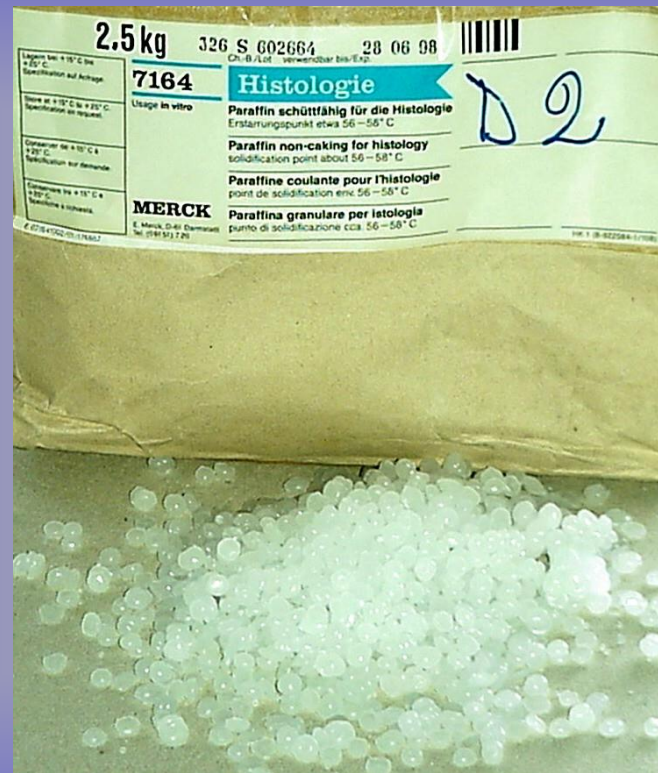


# PREPARATI INCLUSI: l'infiltrazione e l'inclusione

Poiché la consistenza della maggior parte di tessuti fissati (ad eccezione di quelli congelati che si infiltrano ma non si includono) è tale da non permettere di sezionare il frammento in sezioni fini per permettere l'osservazione in luce trasmessa il tessuto deve essere incluso, cioè inglobato in una massa di sostanza che ne permetta il taglio in fette di spessore da 4 a 10 micrometri per l'esame al microscopio ottico e di spessori fra i 20 ed i 200 nm per l'esame al TEM..

# PREPARATI INCLUSI: l'infiltrazione e l'inclusione



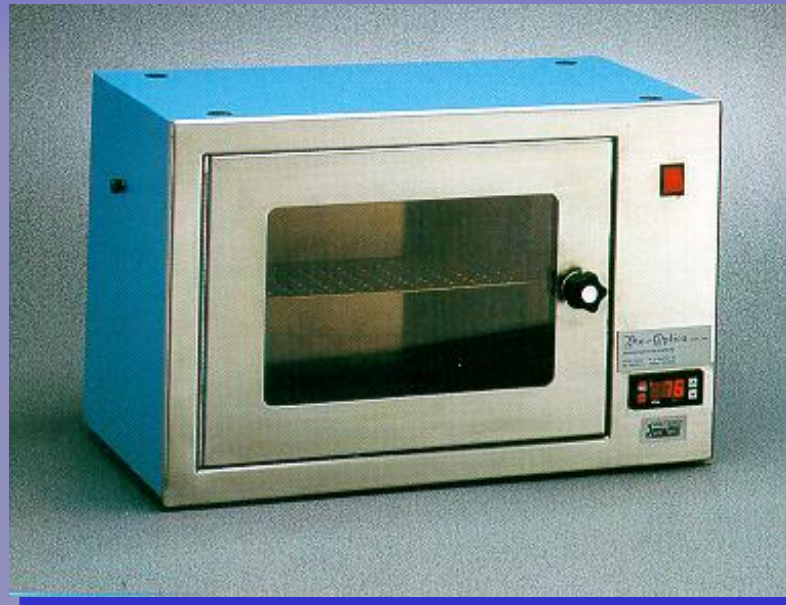
Fra i mezzi di inclusione più impiegati in microscopia ottica ci sono le **paraffine**. Sono miscele di idrocarburi saturi, raffinati, solidi e di colore biancastro scarsamente aggredibili dai chimici.

# PREPARATI INCLUSI: l'infiltrazione e l'inclusione



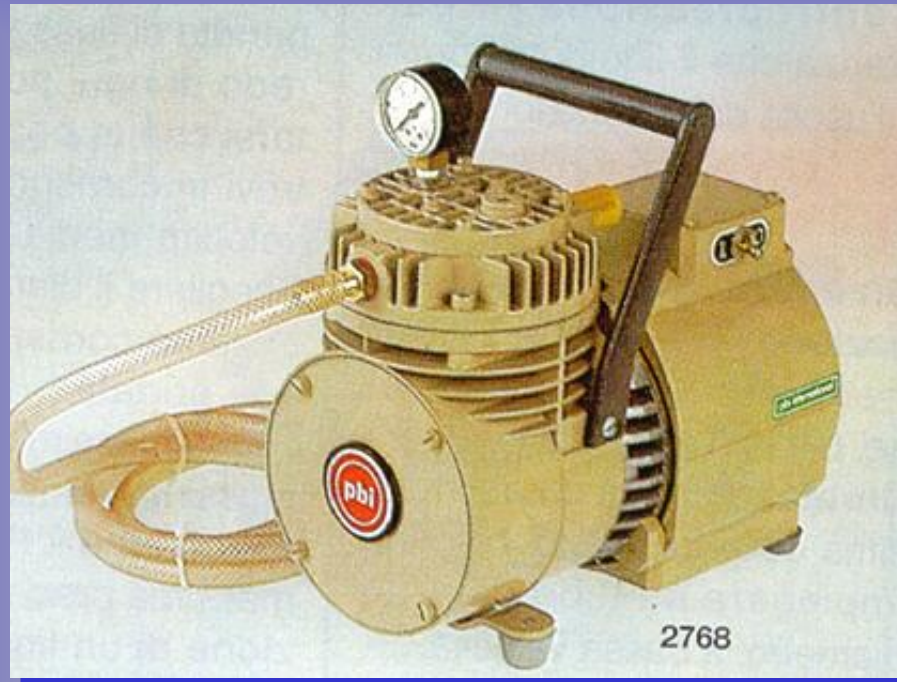
Esistono anche **miscele di polimeri plastici** di nuova concezione con precisi punti di fusione che possono variare da 35° a 70°. La scelta dipende da vari fattori anche se la migliore temperatura ambientale di sezionamento dovrebbe essere di 35° inferiore a quella di fusione delle paraffine. Fra quelle più in uso i punti di fusione si aggirano intorno ai 56° 58°.

# PREPARATI INCLUSI: l'infiltrazione e l'inclusione



I campioni durante la fase di infiltrazione subiranno 4-5 successivi bagni in paraffine mantenute allo stato liquido in stufe termostate. Il mezzo di inclusione, inizialmente liquido, dovrà progressivamente infiltrare il tessuto e sostituirsi al solvente precedentemente utilizzato nei lavaggi.

# PREPARATI INCLUSI: l'infiltrazione e l'inclusione



In alcuni casi, poiché i tempi di infiltrazione sono lunghi ed ogni residuo liquido o gassoso deve essere eliminato dal mezzo di inclusione, è utile porre i campioni in **camere sottovuoto termostatate** e collegate ad una pompa da vuoto. .

# PREPARATI INCLUSI: l'infiltrazione e l'inclusione



Dopo l'ultima sostituzione nel mezzo di infiltrazione i pezzi biologici saranno inseriti in opportuni contenitori sagomati o in piccoli recipienti di plastica dove, nel caso delle paraffine, si **solidificheranno** a temperatura ambiente

# Materiali per l'inclusione di campioni biologici da osservare in MO ed in ME

Strumento di osservazione	Mezzo di inclusione	T di infiltrazione	T di indurimento	Spessore delle sezioni
MO	Paraffina	45-60°	T ambiente	5 µm
MO	Miscele di polimeri plastici	60°	T ambiente	3 µm
TEM	Resine epossidiche T ambiente	T ambiente	T ambiente	20-200 µm
TEM	Resine idrofilliche T ambiente	-20°	-20°	20-200 µm

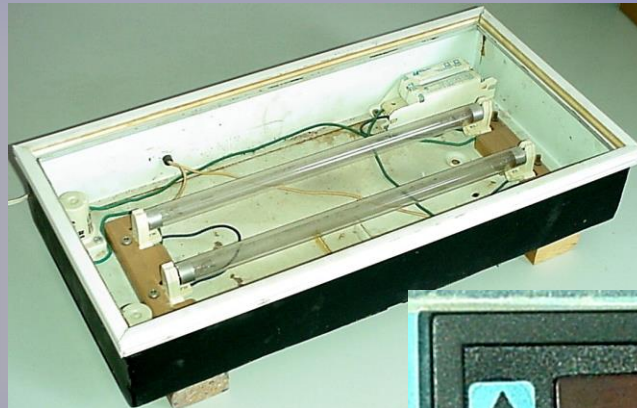
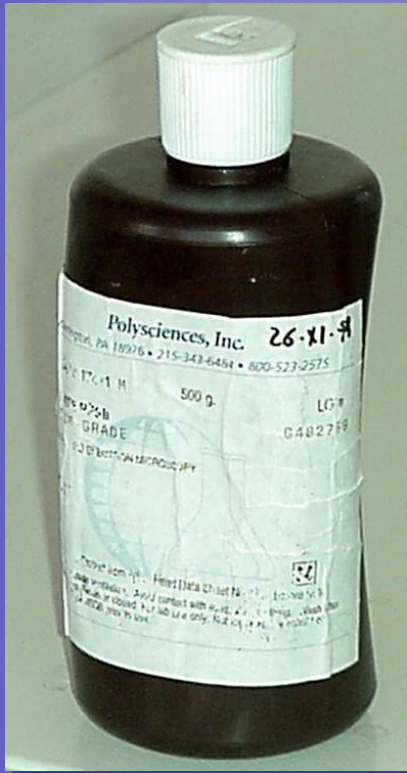
# PREPARATI INCLUSI: l'infiltrazione e l'inclusione



Nel caso di **resine plastiche termoindurenti** catalizzate il tessuto entro la massa fluida verrà posto per tempi e temperature variabili a polimerizzarsi in stufe.



# PREPARATI INCLUSI: l'infiltrazione e l'inclusione



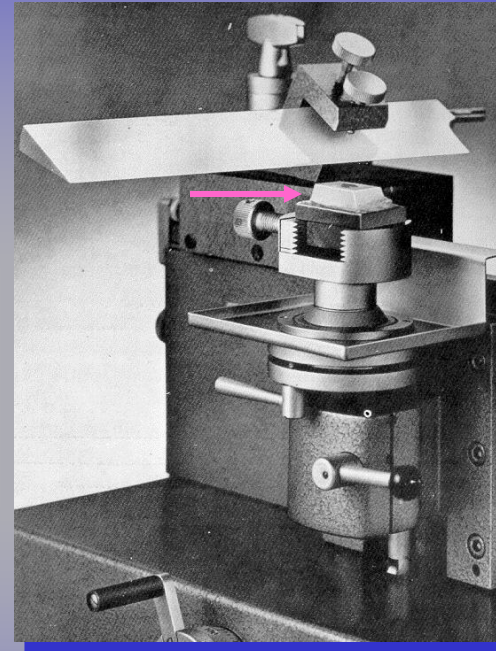
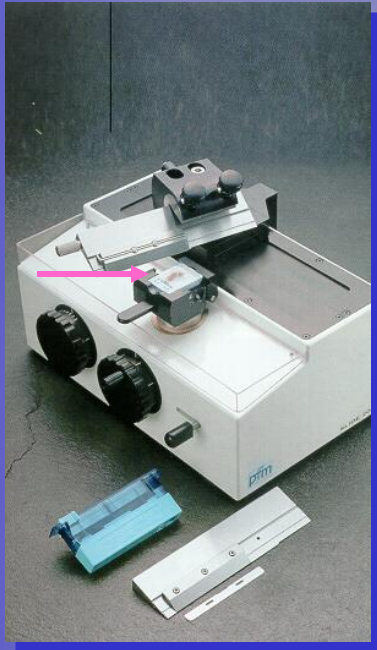
Nel caso di **resine idrofiliche** usate per l'inclusione di pezzi da destinarsi alla microscopia elettronica per indagini immunocitochimiche i procedimenti di indurimento si effettueranno a **basse temperature** con o senza l'ausilio di **catalisi a raggi UV**.

# PREPARATI INCLUSI: il sezionamento e gli strumenti di sezionamento



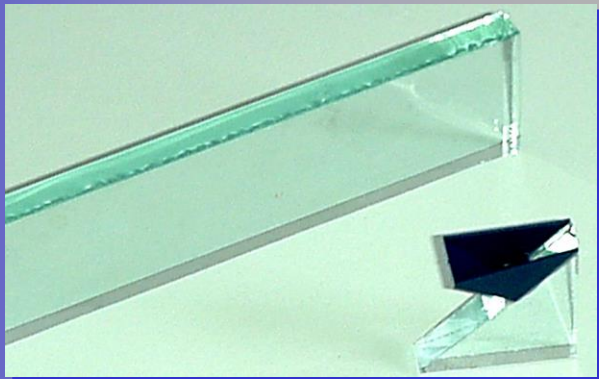
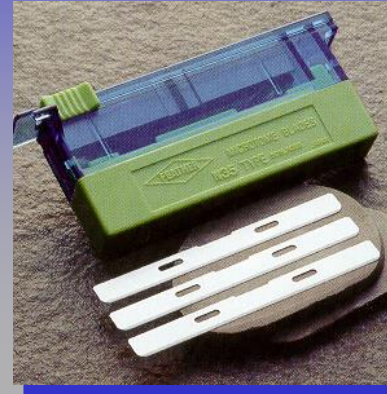
Per l'osservazione in luce trasmessa (ed analogamente per quella ultrastrutturale) è necessario allestire sezioni fini del tessuto incluso attraverso le quali il fascio di fotoni o di elettroni può essere filtrato selettivamente. Lo spessore di queste sezioni è di regola inferiore od uguale al diametro massimo delle cellule; ciò consente di non ottenere la sovrapposizione di più piani cellulari e di un volume eccessivo di citoplasma che porterebbero ad un'interferenza di immagini in piani differenti. Gli strumenti utilizzati sono i **microtomi**, gli **ultramicrotomi** ed i **vibratomi**.

# PREPARATI INCLUSI: il microtomo a slitta



Il blocchetto di tessuto incluso viene fissato entro un supporto collegato ad un meccanismo in cui è possibile lo spostamento micrometrico rispetto ad una lama di metallo.

# PREPARATI INCLUSI: il sezionamento



Per sezioni di paraffina o gelatina si usano lame di metallo anche usa e getta  
Mentre per le sezioni in resine plastiche si usano lame in diamante o cristallo.

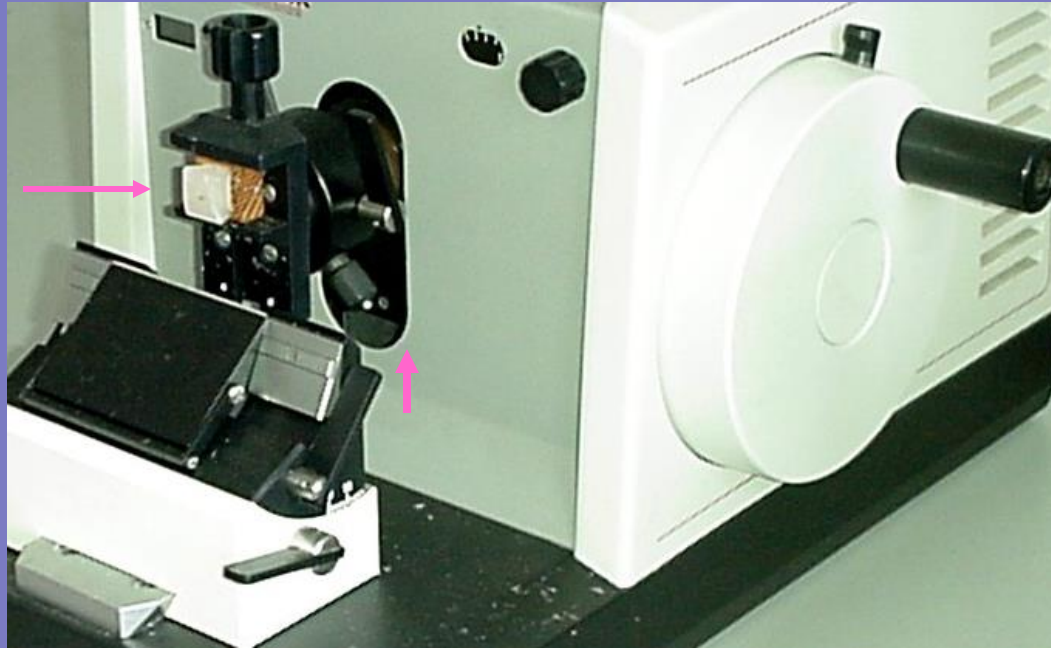
# PREPARATI INCLUSI: il microtomo rotativo





Entrambi i microtomi, a slitta o rotativi, sono costituiti da:

- 1) un gruppo portacampione
- 2) il portalamalame
- 3) corpo di supporto

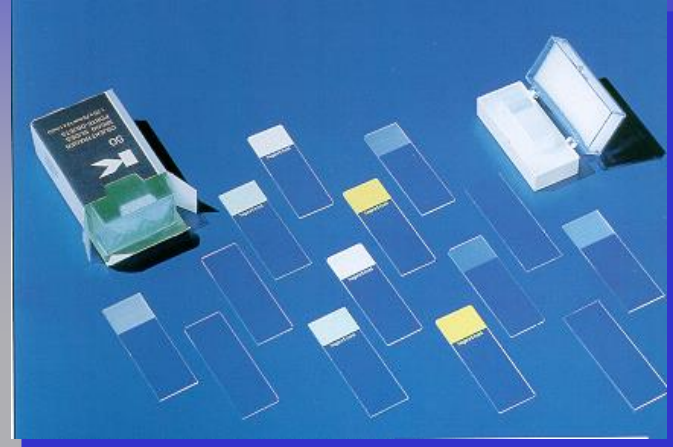
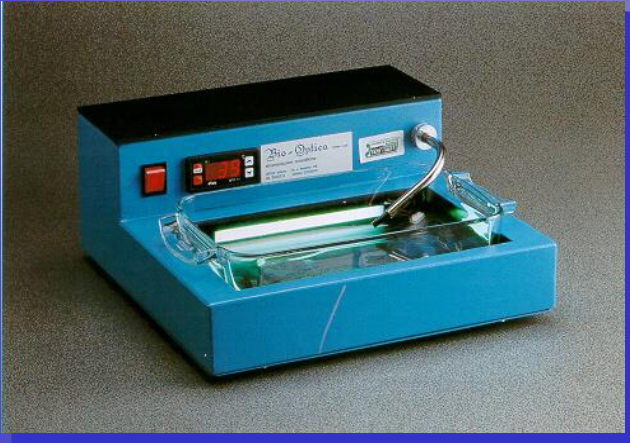
# PREPARATI INCLUSI: il microtomo rotativo



Per il sezionamento si sfruttano due movimenti:

- 1)  uno di avvicinamento del campione alla lama e corrisponde allo **spessore** della sezione che varia da 0,25 a 50 micron.
- 2)  il secondo, perpendicolare alla direzione di avvicinamento, corrisponde al movimento di **taglio**.

# PREPARATI INCLUSI: raccolta e distensione delle fette

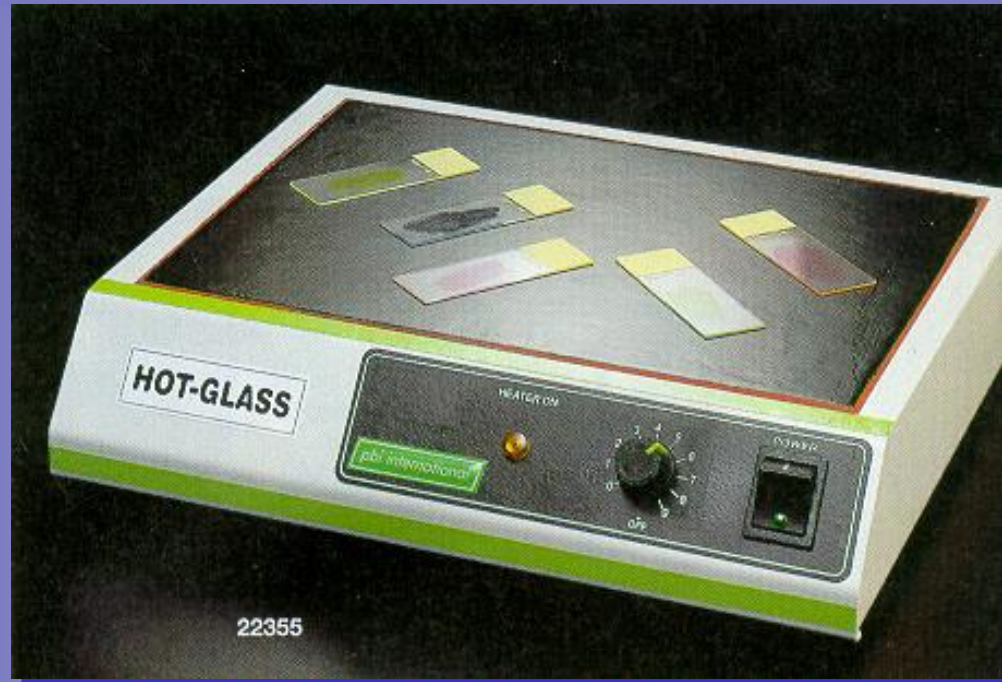


Le sezioni ottenute con i microtomi possono essere trattate con due diverse modalità:

A) o volanti, se di spessore tale da permetterne una manipolazione senza che se ne provochi la rottura per trasferirle nella soluzione di colorazione.

B) o trasferite in acqua calda distillata a 40° 45° e dopo distensione raccolte su vetrini.

# PREPARATI INCLUSI: distensione delle fette



I vetrini su cui è stato posto il campione incluso saranno posti su piastre riscaldate a  $37^{\circ}$   $38^{\circ}$ . In seguito all'evaporazione dell'acqua il preparato aderirà alla superficie.



# PREPARATI INCLUSI: asportazione del mezzo di inclusione



Seguiranno successive manualità attraverso solventi che allontanano il mezzo di inclusione.

In seguito a passaggi seriali in alcoli a concentrazioni decrescenti il campione arriverà sino all'acqua prima della colorazione prescelta.

# PREPARATI: il microtomo congelatore



Per il taglio dei pezzi fissati con congelamento viene utilizzato un particolare microtomo che differisce dai comuni microtomi in quanto il campione da sezionare e la lama di taglio vengono entrambi raffreddati in una camera termostata a valori variabili da  $-18^{\circ}$  -  $25^{\circ}$  in modo da mantenere una maggiore consistenza del campione .

# PREPARATI: il microtomo congelatore



Il campione congelato viene posto su un portacampione, anch'esso refrigerato, adeso ad esso con una colla termosensibile. Il campione passerà verticalmente sul filo di lama con inclinazioni variabili. Nella fase di risalita il braccio portacampione si retrarrà per consentire il passaggio del campione.

# PREPARATI: la raccolta a secco



Le sezioni così ottenute andranno direttamente raccolte per adesione su vetrini trattati o meno con adesivi.

# PREPARATI: il vibratomo



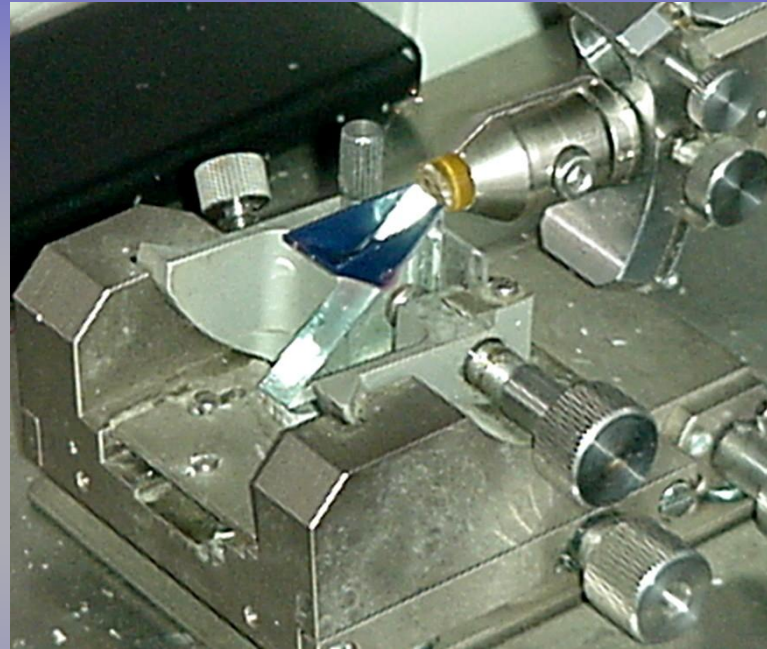
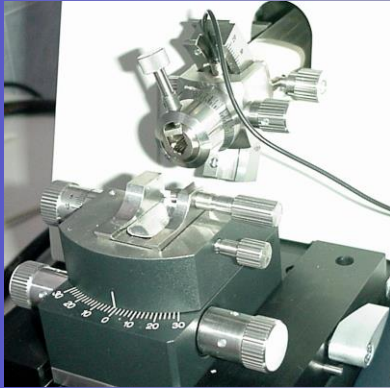
Similarmente al microtomo congelatore il vibratomo seziona campioni non inclusi; poiché il materiale di elezione è tessuto compatto come quello nervoso non andrà congelato ma sarà sezionato con spessori di 20 50 micrometri.

# PREPARATI INCLUSI: l'ultramicrotomo



Per l'osservazione ultrastrutturale i campioni inclusi in resine epossidiche o acriliche dovranno essere sezionati con un ultramicrotomo a spessori variabili dai 20 ai 200 nm. Esso è dotato di uno stereomicroscopio per ingrandire opportunamente i preparati da sezionare che sono normalmente assai piccoli.

# PREPARATI INCLUSI: l'ultramicrotomo e le lame



Le sezioni ultrafini ottenute con gli ultramicrotomi non possono essere maneggiate per la loro estrema fragilità e per le ridotte dimensioni; inoltre non possono essere poste su un supporto di vetro che arresterebbe il fascio elettronico. La sezione è ottenuta sfruttando il filo di una **lama di cristallo o diamante** che seziona il campione contenuto in una dura resina acrilica o epossidica.

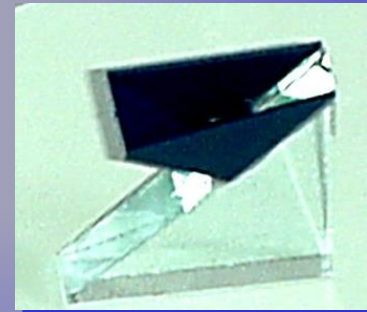
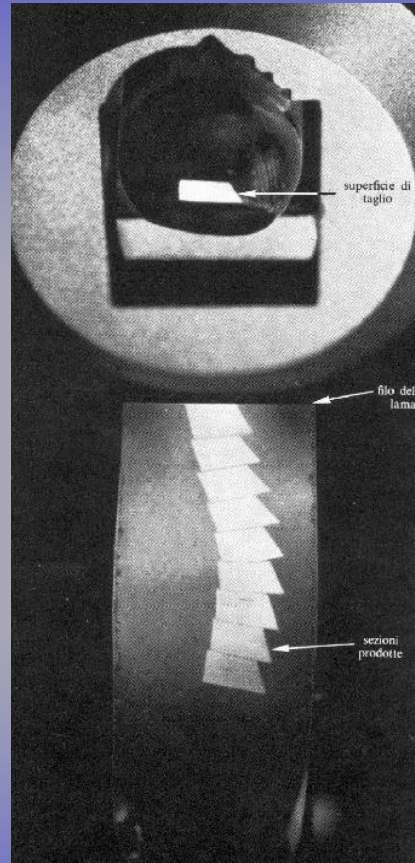
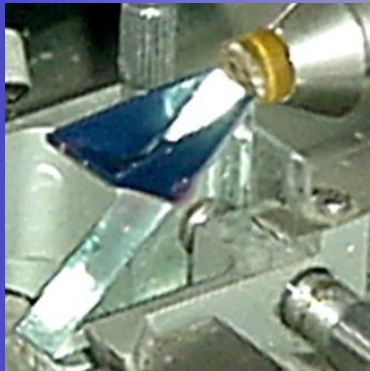
# PREPARATI INCLUSI: il knifemaker



La preparazione delle lame di vetro richiede l'utilizzo del **knifemaker**, un particolare "taglialame" che consente di ottenere lame con inclinazioni strettamente legate al tipo di tessuto da trattare.

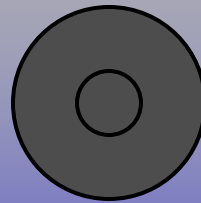
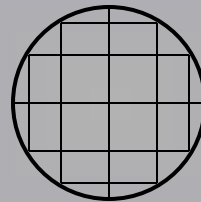
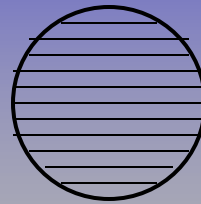
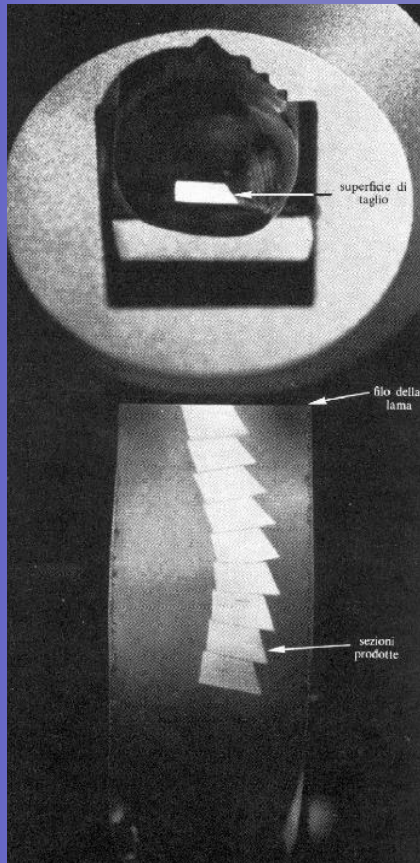


# PREPARATI INCLUSI: la raccolta delle sezioni



Le sezioni sono raccolte in una **vaschetta adesiva** o **parte integrante della lama** e colma d'acqua. Sul liquido galleggerà la fettina (o un nastro di fettine) dopo essere stata tagliata e prima di essere raccolta su retine metalliche.

# PREPARATI INCLUSI: l'ultracriomicrotomo e le grids



Le retine metalliche o **grids** possono essere di rame o, in caso di indagini immunocitochimiche, di nickel o oro. La loro forma e la compattezza delle **bar** varia a seconda del tipo di osservazione e si misura in **mesch**.