



Corso di Laurea in Tecniche di laboratorio biomedico C sede ASL di Latina



Corso integrato
TECNOLOGIE AVANZATE NELLA DIAGNOSTICA DI LABORATORIO
III° anno I° semestre

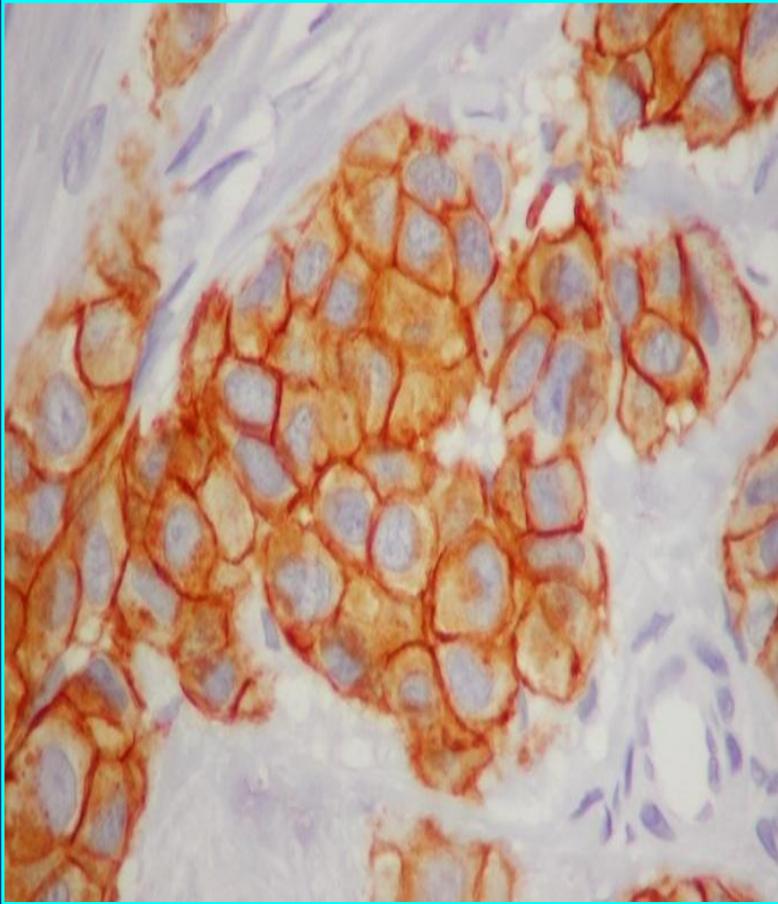
DIAGNOSTICA MOLECOLARE SU TESSUTO

Metodiche in situ

Dott. Claudio Di Cristofano

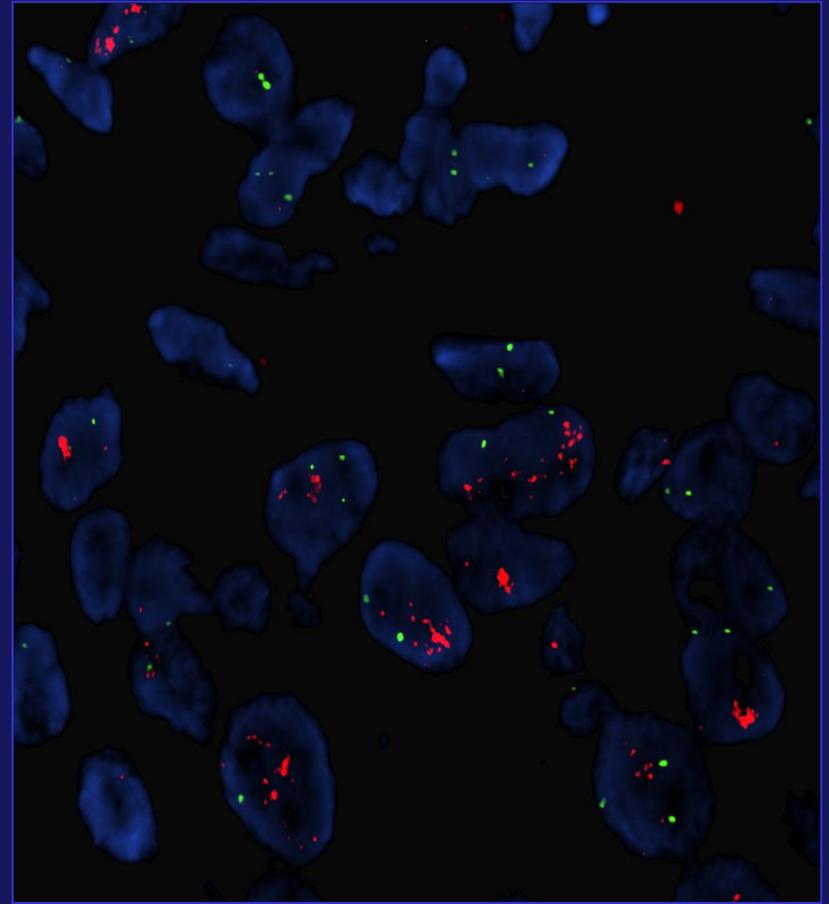
*Dipartimento di Medicina Sperimentale, Anatomia Patologica
Sapienza, Università di Roma - Polo Pontino
I.C.O.T., Latina*

IHC



Proteomica

FISH



Genomica

FISH

(Fluorescent In Situ Hybridization)

**E' una tecnica che combina
la microscopia a fluorescenza
con metodiche molecolari di
ibridazione *in situ***

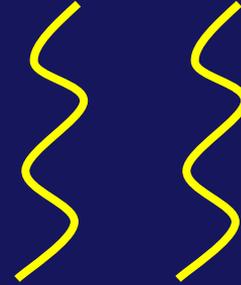
FISH



Sonda DNA
fluorescente



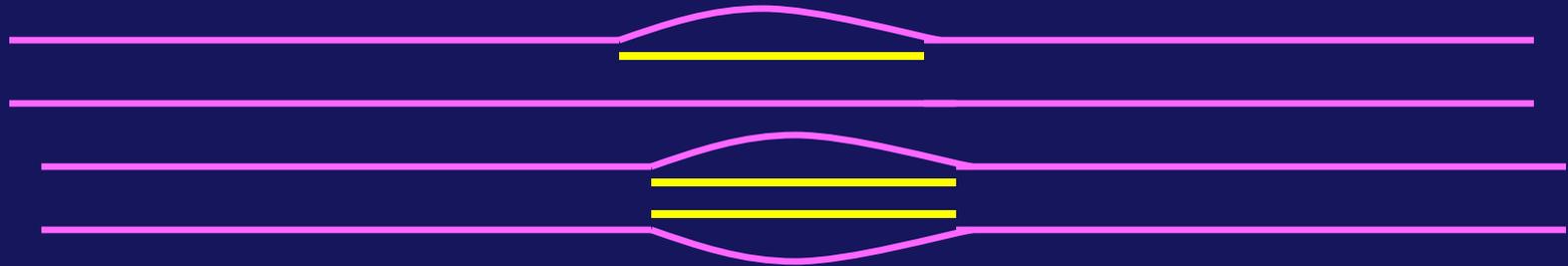
calore



DNA cromosomico



Appaiamento *sonda* + *DNA cromosomico*



FISH

Sonde

Alfoidi

- sequenze centromeriche altamente ripetute specifiche per cromosoma (CEP)
- 750 kb
- riconoscere e/o enumerare uno specifico cromosoma

FISH

Sonde

- **Painting**
 - intero cromosoma o di grosse porzioni di esso (per es:braccio lungo o corto);
 - studio e identificazione di rimaneggiamenti cromosomici complessi
- **Telomeriche**
 - specifiche per sequenze cromosomiche terminali;
 - < 100kb

FISH

Sonde

Sequenza unica • consentono di studiare le modificazioni di un locus specifico (delezioni, amplificazioni, traslocazioni)

- 500bp / centinaia Kb
- sequenze altamente specifiche per il sito di ibridazione

FISH

Materiali

- **Vetrini silanizzati o a carica positiva**
- **Piastra riscaldata (45-50 °C)**
- **Microtomo**
- **Bagni termostatici (37C° e 82 C°)**
- **Camera di ibridazione umidificata (HYBRITE)**
- **Microscopio a fluorescenza dotato di filtri dedicati**

J Nath, K Jhonson "Fluorescent in situ hybridization (FISH): DNA probe production and hybridization criteria". Biotech Histochem 1997

FISH

allestimento dei preparati

- *Preparazione dei vetrini*
- *Deparaffinazione*
- *Pretrattamento*
- *Trattamento con proteasi*
- *Post-fissazione*
- *Ibridazione*
- *Valutazione al microscopico a fluorescenza*

Preparazione dei vetrini di campioni FFPE

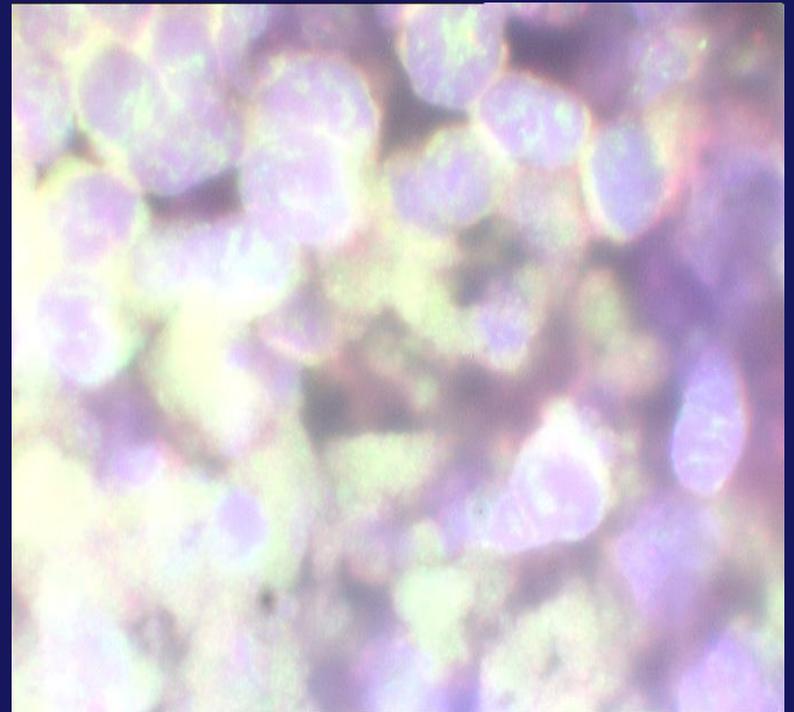
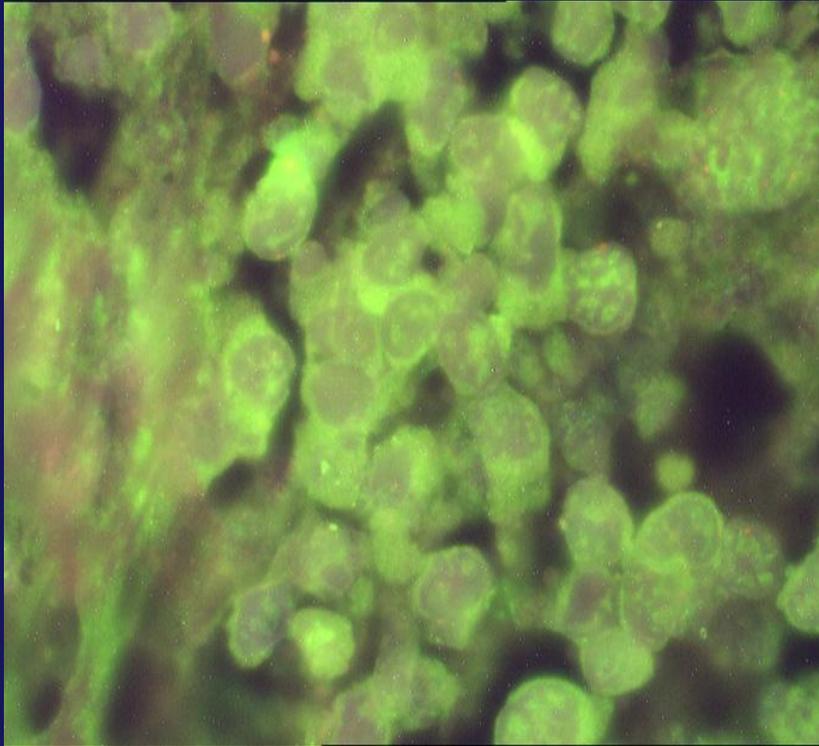
- Tagliare sezioni dello spessore di 3-5 μm utilizzando un microtomo
- Porre le sezioni in un bagno “protein free” a 40° C
- Montare le sezioni sulla superficie a carica positiva del vetrino silanizzato
- Asciugare i vetrini all’aria
- Porre i vetrini in stufa a 45-56° C overnight (deparaffinazione)

Pretrattamento dei vetrini:

Deparaffinazione

- Immergere i vetrini in toluene (agente deparaffinante) per 10 min a temperatura ambiente.
- Tale operazione va eseguita due volte, cambiando ad ogni passaggio la soluzione.
- Deidratare i vetrini in EtOH al 100% per 5 min a temperatura ambiente. Ripetere per due volte.
- Asciugare i vetrini all'aria o ponendoli su una piastra riscaldata a 45-50° C.
- Porre i vetrini in soluzione di pretrattamento (NaSCN) a 80 °C per 30 minuti.

Scarsa deparaffinazione



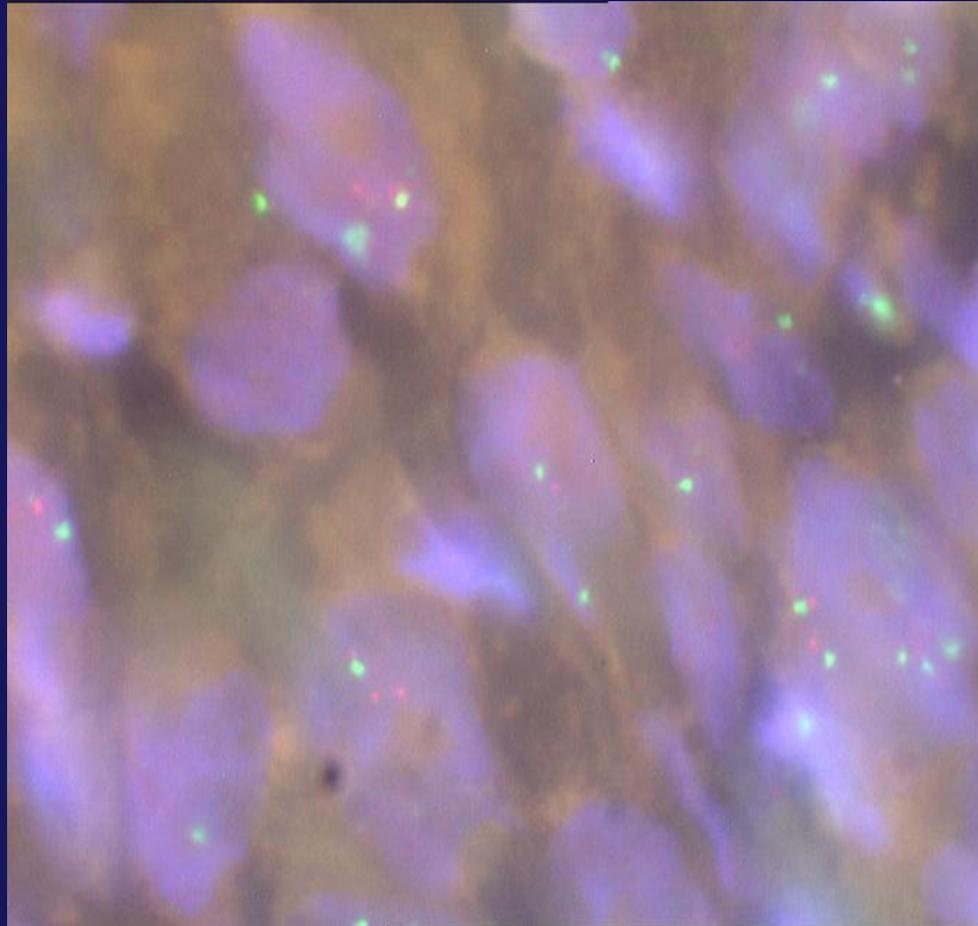
Pretrattamento dei vetrini: trattamento in soluzione di proteasi

- Immergere i vetrini in soluzione di proteasi a 37 C° per 18-20 minuti.

Il tempo è variabile e dipende dal tipo di tessuto e della lesione.

- Immergere i vetrini in Wash Buffer per 5 minuti. Tale operazione va ripetuta due volte.
- Asciugare i vetrini a 45-50 C° per 2-5 minuti.

Insufficient treatment in solution of proteases



Ibridazione

- **Applicare la sonda** sull'area selezionata sul vetrino.
- Porre un vetrino coprioggetto sull'area selezionata e sigillare accuratamente con del mastice.
Bolle di aria possono interferire con l'ibridazione
- Porre il vetrino nella camera di ibridazione deumidificata (HYBRITE).

Lavaggi post-ibridazione

- Riscaldare in bagno termostato a 72 °C la soluzione di lavaggio post-ibridazione (2xSSC/0,3% NP-40)
- Rimuovere delicatamente il mastice dal vetrino
- Immergere i vetrini nella soluzione di lavaggio post-ibridazione a temperatura ambiente
- Dopo avere rimosso il vetrino coprioggetto, immergere i vetrini nella soluzione di lavaggio post-ibridazione a 72 °C
- Asciugare i vetrini all'aria in ambiente privo di luce.
- Applicare 10 µl di controcolorante DAPI sull'area target ed applicare un coprioggetto

Parametri che influenzano l'ibridazione

- *Temperatura* : la temperatura di massima velocità di ibridazione è di 25°C
- *pH*: in un range tra 5-9 la velocità di ibridazione è indipendente dal pH
- *Solventi organici*: riducono la stabilità termica delle doppie eliche e permettono la denaturazione a temperature più basse (ad es: formammide)
- *Cationi monovalenti (Na⁺)*: interagiscono elettrostaticamente con il DNA a livello dei gruppi fosfato (*la repulsione fra le due catene diminuisce con l'aumentare della concentrazione salina*)

Parametri che influenzano l'ibridazione

- *Concentrazione della sonda* (rapporto diretto).
- *Lunghezza della sonda*: la velocità di rinaturazione è proporzionale al quadrato della lunghezza del frammento.
- *Contenuto in G-C*: la stabilità dell'ibrido è direttamente proporzionale alla percentuale di G-C.

Allestimento di campioni citologici

Allestimento dei vetrini:

Il materiale può consistere in campioni urinari o ottenuti mediante scraping (ad es: neoplasie della mammella) e diluiti in soluzione di PBS.

- Centrifugare a 2000 rpm per 5 min. Versare il soprannatante con cura. Raccogliere il pellet ed inumidirlo con una quantità adeguata di PBS (2X).
- Caricare la Cytospin con vetrini a carica positiva. Centrifugare a 1500 rpm per 10 min.

Allestimento di campioni citologici

Allestimento dei vetrini:

- Fissare i vetrini in fissativo di Carnoy (3 metanolo:1 acido acetico).
- Disidratare i vetrini in etanolo al 70%, al 85% ed, infine, in etanolo assoluto, a temperatura ambiente.
- Asciugare i vetrini su piastra a 45-59 °C.

Allestimento di campioni citologici

Fase di pretrattamento:

- Risciacquare i vetrini in una soluzione 2XSSC a 73°C per 2 min.
- **Immergere i vetrini nella soluzione di proteasi a 37°C per 10 min.**
- Risciacquare i vetrini in wash buffer a T ambiente per 5 min.

Allestimento di campioni citologici

Fase di pretrattamento:

- Immergere i vetrini in una soluzione di formaldeide all' 1% a T ambiente per 5 min.
- Risciacquare i vetrini in wash buffer a T ambiente per 5 min.
- Disidratare i vetrini in etanolo 70%, 85% ed assoluto, a T ambiente e per 2 min ad ogni passaggio.
- Asciugare i vetrini su piastra a 45-50°C per 2-5 min.

Allestimento di campioni citologici

Ibridazione:

- Far riscaldare la sonda a T ambiente fino a quando la viscosità non sia sufficientemente diminuita.
- Porre sull'area prescelta 3 μ l di sonda.
- Coprire con vetrino copri-oggetto e saldare con mastice.
- Porre i vetrini in camera di ibridazione umidificata (Hybrite).

Allestimento di campioni citologici

Fase di post-ibridazione :

- Rimuovere delicatamente il cemento ed il vetrino coprioggetto.
- Immergere i vetrini in una soluzione 0,4XSSC/0,3% NP-40 a 73°C per 2 min.
- Immergere i vetrini in una soluzione 2X SSC/0,1% NP-40 a T ambiente per 1 min.
- Far asciugare i vetrini al buio.

Allestimento di campioni citologici

Fase di post-ibridazione :

- Porre sui vetrini una quantità adeguata di colorante DAPI.
- Coprire la regione con un vetrino coprioggetto.
- Valutazione dell'avvenuta reazione di ibridazione mediante microscopio a fluorescenza con filtri dedicati.

Valutazione del segnale

Occorre valutare l'adeguatezza del preparato utilizzando i seguenti parametri:

- **Intensità del segnale della sonda:** il segnale deve essere chiaro, distinto e facilmente valutabile.
- **Segnale di fondo:** deve essere omogeneamente scuro.

Valutazione del segnale

- Utilizzare l'obiettivo 25X per identificare l'area di interesse.
- Evitare le aree dove predomina la necrosi e dove i bordi nucleari sono indistinti.
- Non considerare i segnali con intensità debole o le aree con segnale di fondo eccessivo
- Valutazione a 100X (immersione con olio)

Suggerimenti e precauzioni

- In genere è opportuno processare non piu' di otto vetrini , con un controllo positivo.
- Il vetrino di controllo deve essere corso contemporaneamente agli altri casi per poter valutare la corretta esecuzione e per valutare l'accuratezza del segnale.
- Per poter identificare correttamente l'area bersaglio, è bene disporre dello stesso caso di una sezione colorata con E/E.

Applicazioni in Anatomia Patologica

- Carcinoma della mammella.
- Citologia urinaria.
- Carcinoma della prostata.
- Carcinoma dell'ovaio

Amplificazione/iperespressione Her2/neu

- **Her-2/neu risulta amplificato/iperespresso nel 20-30% dei casi di carcinoma mammario.**
- **L'amplificazione/iperespressione di HER2 è un *evento precoce* nello sviluppo del carcinoma della mammella.**
- **L'*amplificazione* è fattore prognostico negativo in termini di OS e DFS (rischio 5,5; Press MF et al. J Clin Oncol, 1997); è marcatore di recidiva precoce (rischio 3,1).**

Amplificazione

- **Evento mutazionale che comporta l'aumento del numero di copie di un determinato gene con conseguente aumento di attività del prodotto da esso codificato.**
- **Principale meccanismo di attivazione degli oncogeni.**

Iperespressione/Amplificazione di Her2/neu

- Si correla **positivamente** con la risposta alla terapia antitumorale (taxani e antracicline) e **negativamente** con quella ormonale (tamoxifene)
- L'**iperespressione** condiziona la somministrazione dell'anticorpo monoclonale ricombinante rhuMAb Her2 (Trastuzumab) in associazione con le tradizionali terapie.

Valutazione dello stato di HER2/neu

- I campioni sono inizialmente testati mediante IHC.
- I campioni con intensa positività per Her-2 (IHC 3+) sono elegibili per la terapia con Herceptin.
- I campioni IHC 2+ devono essere ritestati con altro metodo, preferibilmente con indagine FISH.

Bilous M et al “Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines” Mod Pathol 2003.

PathVysion HER-2/DNA probe

- **Permette di valutare l' amplificazione del gene HER-2 mediante FISH.**
- **Consiste di due sonde a DNA marcate con sostanze fluorescenti:**
 - **HER-2 che identifica l' intero gene HER-2 gene è marcato con Spectrum Orange®.**
 - **CEP 17 è marcato con Spectrum Green® e si ibridizza con il DNA alfa-satellite localizzato in corrispondenza del centromero del cromosoma 17 (17p11.1-q11.1)**

Valutazione amplificazione HER 2 mediante FISH

- Amplificazione: Her-2/CEP 17 $>2,2$
- Borderline: Her-2/CEP 17 1.8-2.2
- **Non amplificato:** Her-2/CEP 17 < 1.8

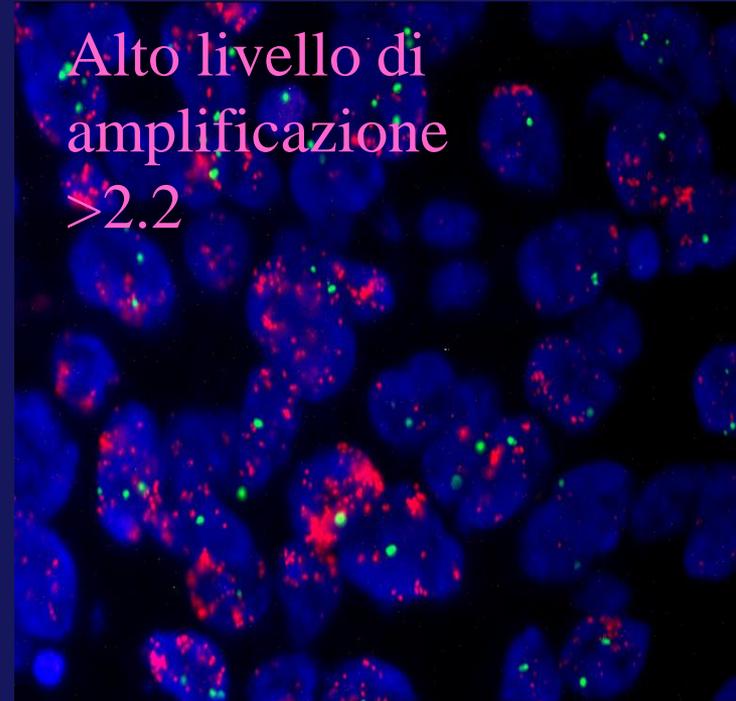
Zarbo, Hammond "Conference summary, strategic science symposium". Arch Pathol Lab Med 2003

Amplificazione di HER2/neu

Basso livello di
amplificazione
 $<1.8 < 2.2$



Alto livello di
amplificazione
 >2.2



Applicazioni in Anatomia Patologica

- Carcinoma della mammella.
- Citologia urinaria.
- Carcinoma della prostata.
- Carcinoma dell'ovaio.

Diagnostica molecolare oncologica in Urologia

Carcinomi a cellule transizionali

- **Diagnosi precoce**
- **Follow-up di pazienti già diagnosticati**

Problemi in Oncologia vescicale

- Lesioni di basso grado (Tumori papillari LMP, Carcinomi transizionali a basso grado - (ISUP&WHO 1998) hanno percentuali di recidiva del 20 e 50%
Citologia non attendibile per lesioni di basso grado
- DNA index: aneuploidia solo per lesioni G2-G3
- Marcatori urinari (citocheratina 20, BTA, telomerasi, NMP22) necessitano studi prospettici
- Valutazione mutazioni di p53
- Comparative Genomic Hybridization

Marcatore molecolari nei carcinomi vescicali

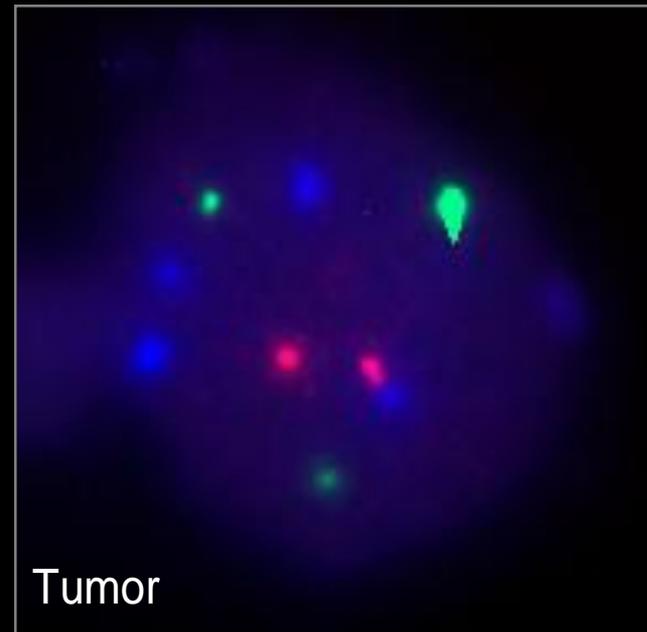
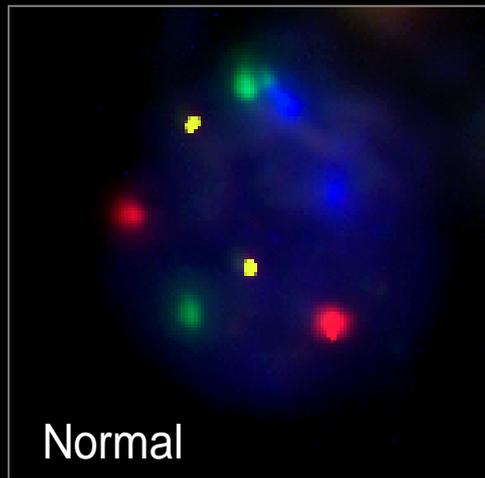
- **Bassi gradi (G1-2): basso livello di instabilità genomica con perdita 9p21-22 e Y.**
- **Alti gradi(G3): alto livello di instabilità genomica con numerose alterazioni genomiche in diversi cromosomi.**

UroVysion Multi-color probe

- Permette di identificare e quantificare i cromosomi 3, 7 e 17 (aneuploidia) e la perdita del locus 9p21 mediante FISH nelle urine di pazienti con carcinoma della vescica a cellule transizionali.
- La sonda consiste di CEP 3 Spectrum Red®, CEP 7 Spectrum Green®, CEP 17 Spectrum Aqua® and LSI 9p21 Spectrum Gold®.

UroVysion™ Multi-color probe

Multi-probe FISH for the detection of tumor cells

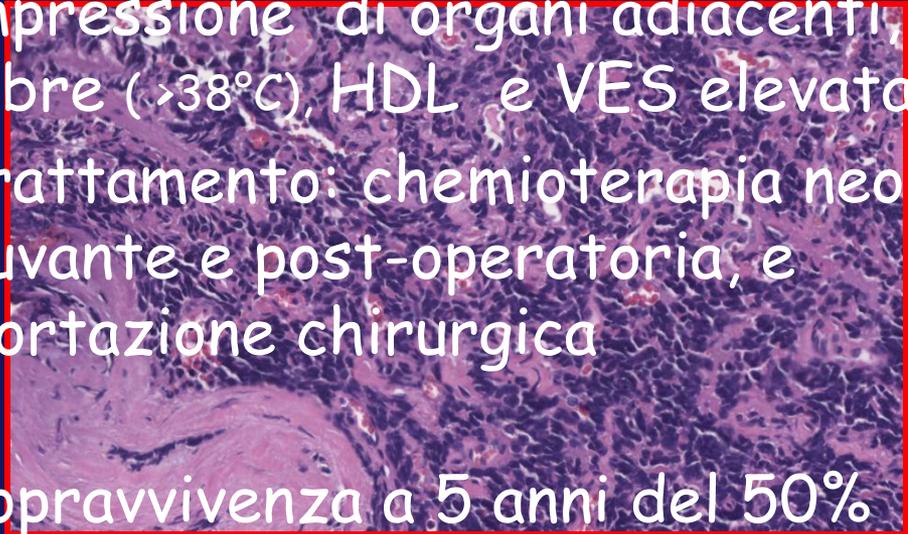


● CEP3 ● CEP7 ● CEP17 ● 9p21

Sarcoma di Ewing

Tumore raro e maligno

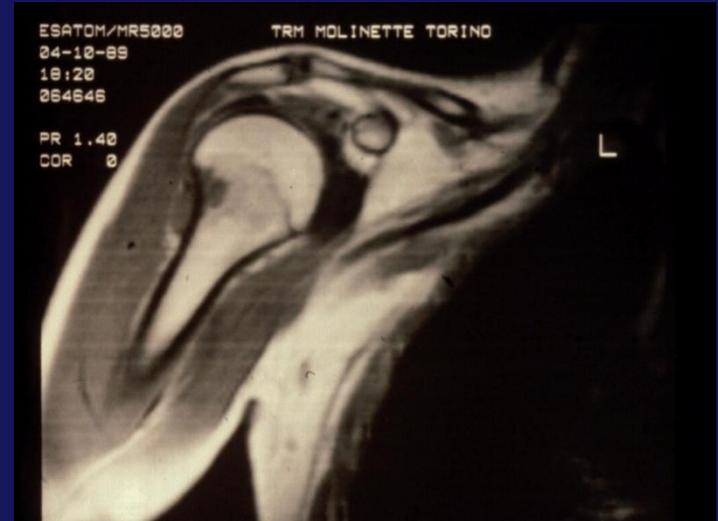
- Insorgere nell'osso o nei tessuti molli
- I 2/3 dei casi presentano un'età inferiore ai 20 anni
- Sintomi: dolore forte, tumefazione, compressione di organi adiacenti, febbre ($>38^{\circ}\text{C}$), HDL e VES elevata
- Trattamento: chemioterapia neo-adiuvante e post-operatoria, e asportazione chirurgica
- Sopravvivenza a 5 anni del 50%



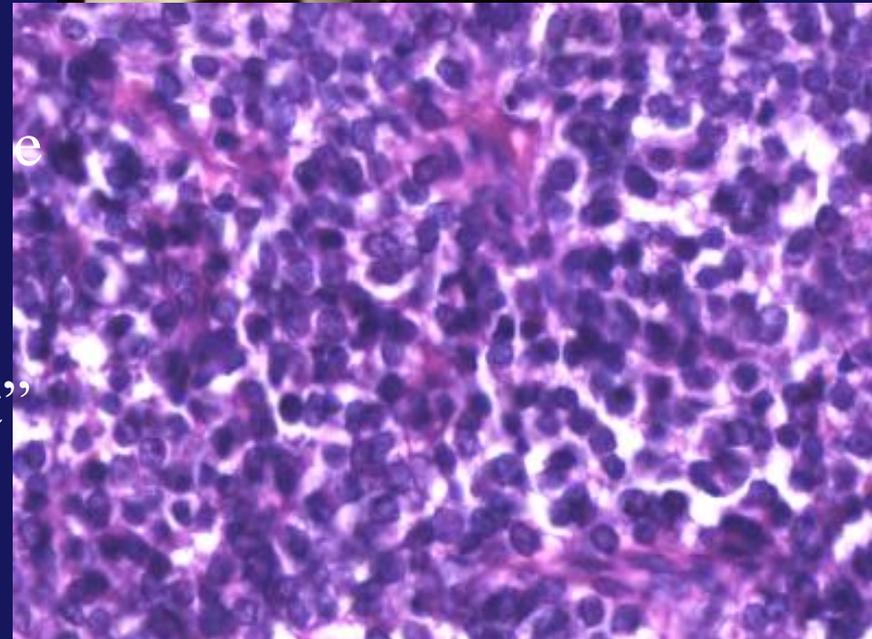
Sarcoma di Ewing



1921 - J. Ewing



- Cellule rotonde di piccola taglia
- Nuclei rotondi o ovali, fine cromatina e piccoli nucleoli
- Scarso citoplasma
- Presenza di “rosette di Homer-Wright”
- Variabile presenza di glicogeno



Patogenesi

Traslocazione cromosomica reciproca
tra il braccio lungo del cromosoma 22
con.....

95%

Braccio lungo del
cromosoma 11

$t(11;22)(q24;q12)$

Gene chimerico

EWS/FLI1

10 - 15%

Braccio lungo del
cromosoma 21

$t(21;22)(q12;q12)$

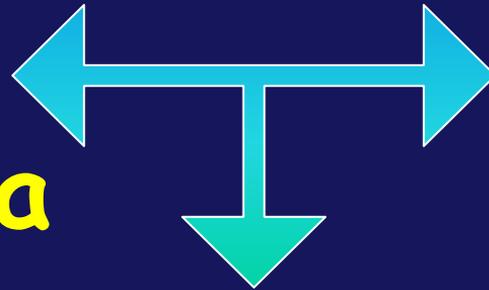
Gene chimerico

EWS/ERG



bocchetto di studio

**immuno
istochimica**



RT-PCR



FISH

FISH

LSI EWSR1(22q12) Break Apart Rearrangement Probe



5' EWS R1 introne 4



3' EWS R1 introni 7-10

-  sonda, lunga 500 Kb, si estende lungo il lato 5' del gene EWS-R1 e verso l'interno nell'introne 4
-  seconda sonda, lunga 1100 Kb, si estende lungo il lato 3' del gene EWS-R1

FISH

- Osservazione a microscopio a fluorescenza, dotato di filtri idonei.
- conta di 30 nuclei (100X) dei segnali relativi

2 segnali di fusione



cellula NON
traslocata

1 segnale di fusione

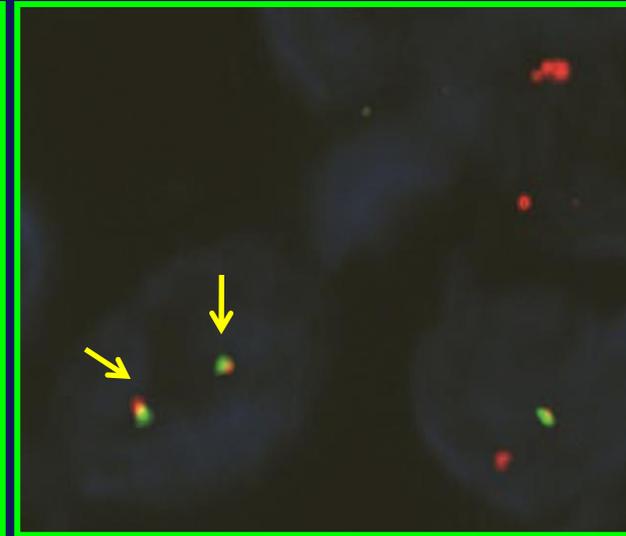
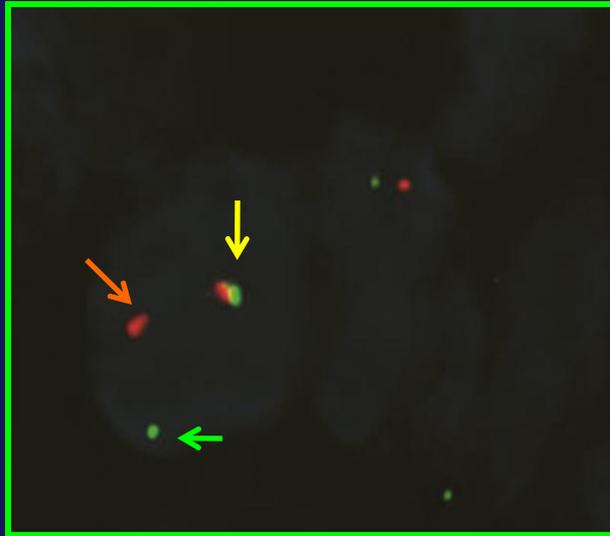
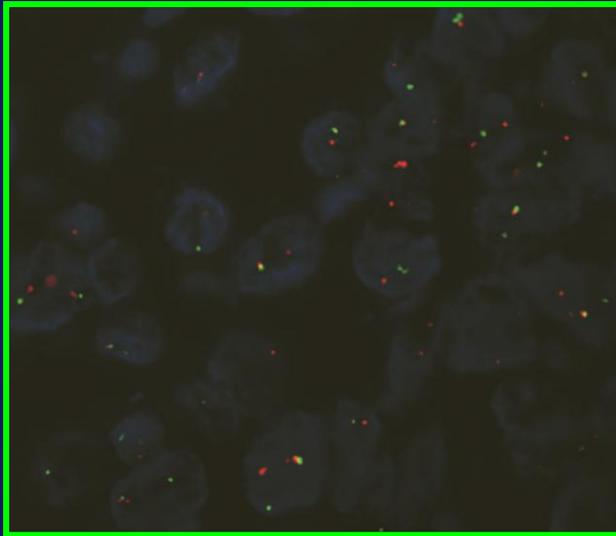


2 segnali separati



cellula
traslocata

FISH

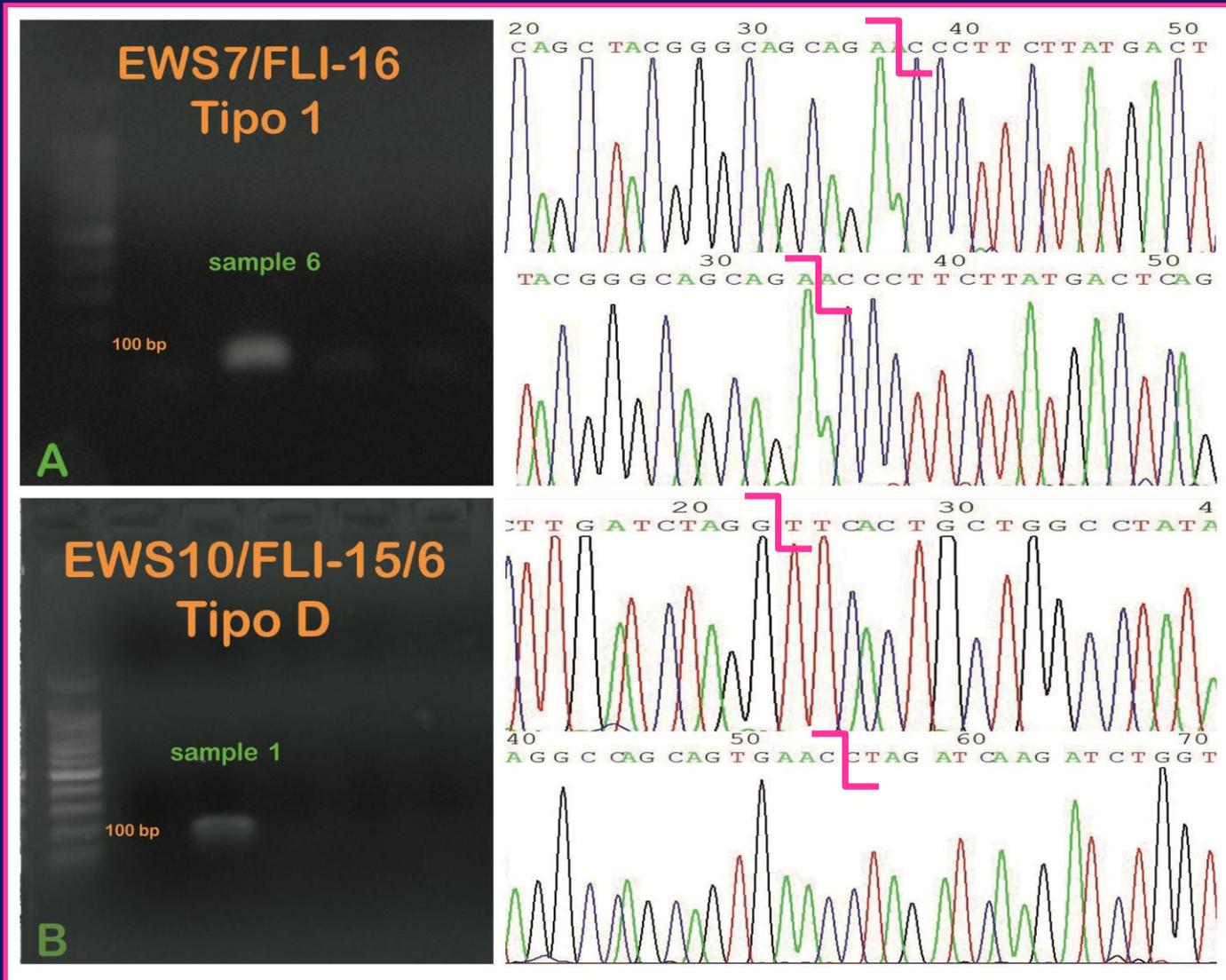


traslocato

non traslocato

- tutti i casi hanno presentato la trascolazione del gene EWS
- necessario per alcuni campioni ripetere più volte il test per ottimizzare la valutazione del segnale

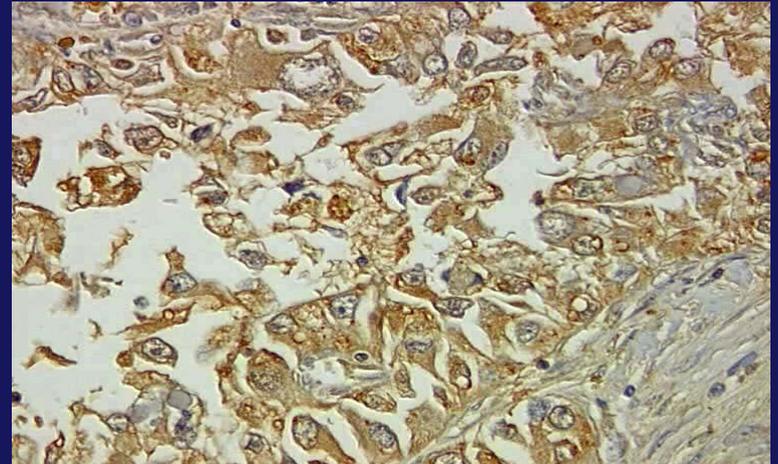
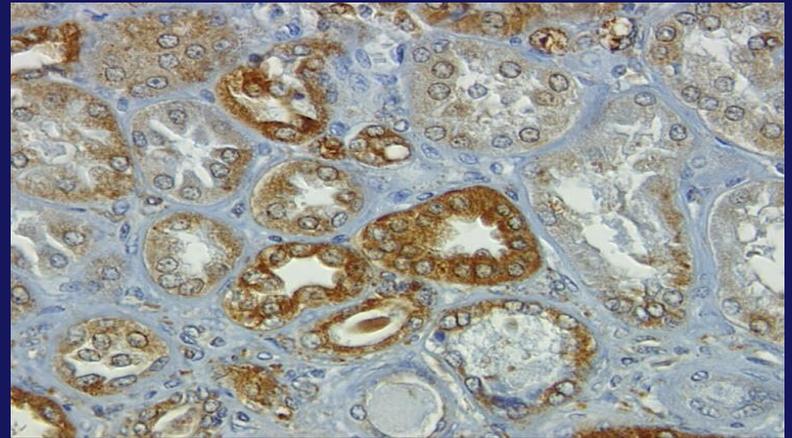
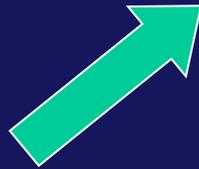
RT-PCR



IMMUNO-ISTOCHIMICA

=

PROTEOMICA IN SITU



Funzioni

- Ausilio nel riconoscimento delle lesioni (fenotipizzazione)
- Fornire indicazioni prognostiche e/o terapeutiche.

Fenotipo

- Espressione di caratteristiche morfologiche ed immunologiche tipiche per ciascuna linea di differenziamento cellulare.
- Dipendente dalla espressione di geni tipici per ciascun tipo cellulare (genotipo).

Antigene

- Qualsiasi sostanza in grado di indurre una risposta immunitaria.
- La complessità antigenica dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche della molecola (Peso Molecolare), dalla composizione chimica, dalla variabilità delle sue strutture primaria e terziaria.

Epitopi

- Sequenze antigeniche (in genere 4-7 aminoacidi) in grado di indurre una risposta anticorpale.
- Maggiore è la complessità antigenica di una molecola, tanto piu' numerosi e diversi sono gli epitopi in grado di provocare la formazione di anticorpi specifici.

Anticorpi primari

- In base al numero di epitopi riconosciuti, gli anticorpi possono essere distinti in anticorpi **policlonali** ed anticorpi **monoclonali**.

Anticorpi policlonali

- Pool eterogenei di numerosi anticorpi diretti contro tutti gli epitopi che costituiscono un dato antigene
- Riconoscono piu' epitopi di un antigene.
- Sono piu' sensibili.
- Sono meno specifici.
- Sono meno purificati

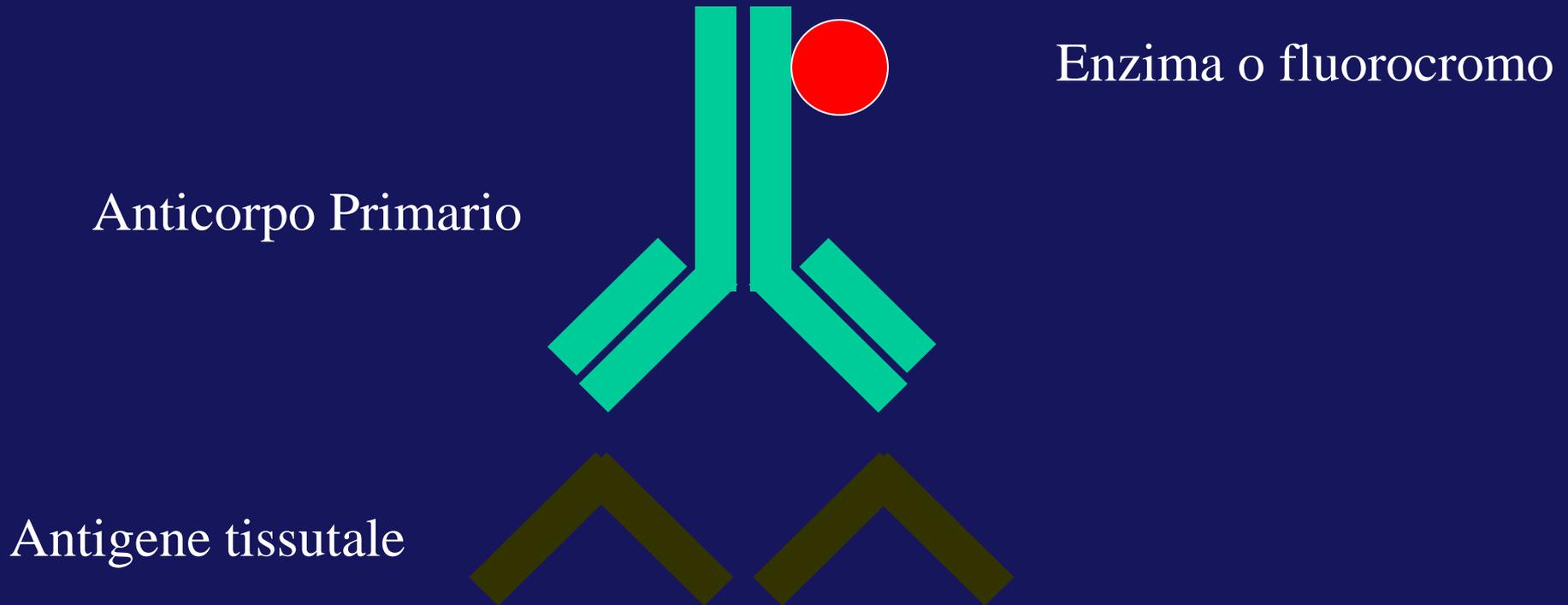
Anticorpi monoclonali

- Anticorpi omogenei diretti verso un unico epitopo di un determinato antigene
- Riconoscono un solo epitopo di un antigene
- Sono meno sensibili.
- Sono altamente specifici.
- Sono quasi sempre purificati per affinità

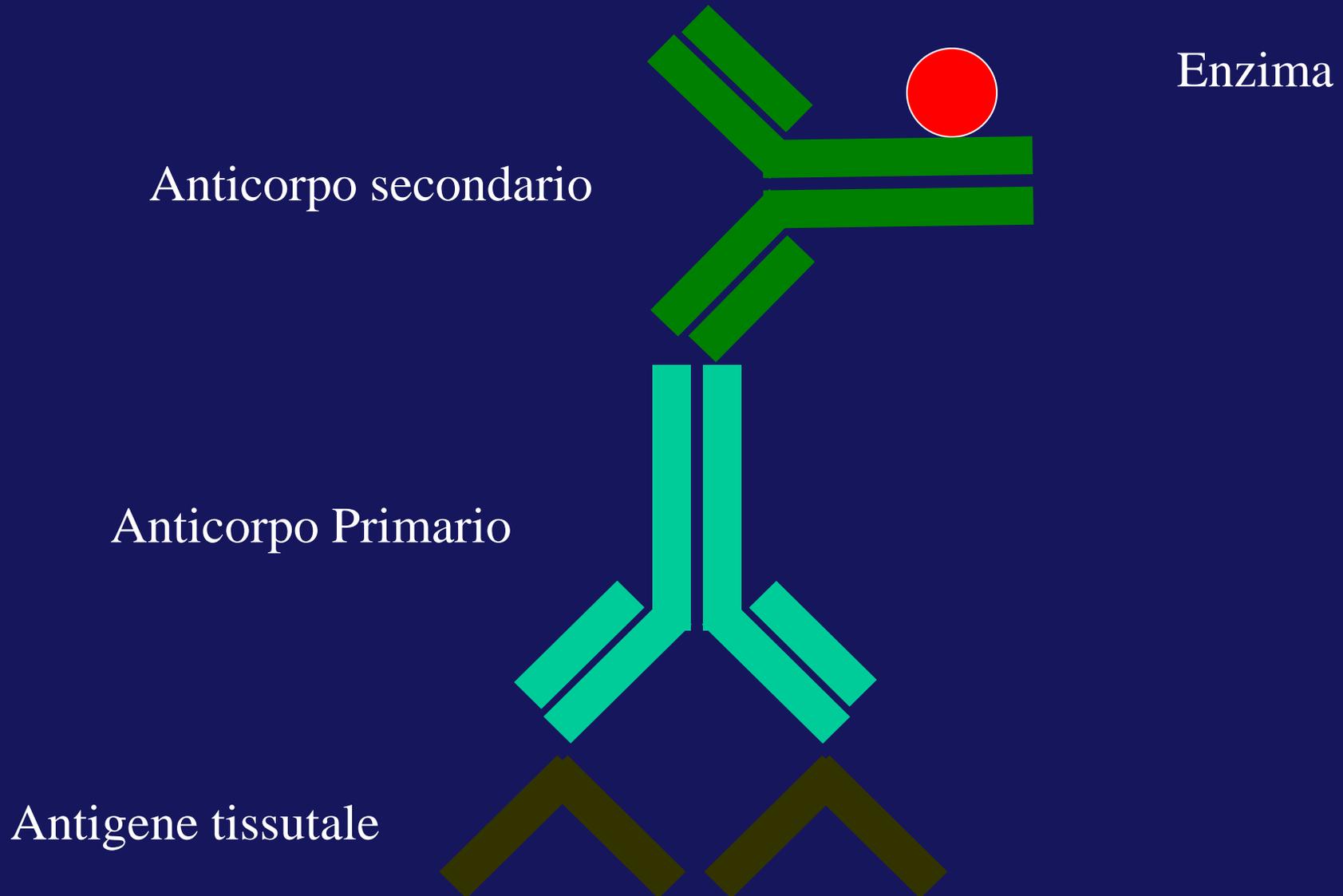
Titolazione

- Titolare un anticorpo significa stabilire a quale diluizione (o intervallo di diluizioni), esso dovrà essere utilizzato per ottenere risultati ottimali in una reazione IHC.
- Caratteristiche dell'anticorpo
(Specificità, Sensibilità, Concentrazione)
- Caratteristiche dell'antigene
- Metodiche IHC
(Sistema di rivelazione, Tempi e temperature, Fissazione e smascheramento)

METODO DIRETTO



METODO INDIRECTO



METODICA

- blocco perossidasi endogene
- smascheramento
- permeabilizzazione chimica
- incubazione con l'anticorpo primari
- anticorpo secondario biotilinato
- streptavidina-perossidasi
- sviluppo
- controcolorazione

Immunohistochimica

- Sezioni da 2 μm
- Standardizzazione del protocollo IHC:
 - scelta del pretrattamento (tamp CITRATO pH 6)
 - scelta del permeabilizzante (Tween20)
 - scelta della diluizione e tempi di incubazione
 - scelta del sistema di sviluppo (AbII biotilinato)
 - scelta del cromogeno (DAB)

Controllo positivo:

interno (se possibile)

esterno suggerito dalla ditta (foglietto illustrativo)

Controllo negativo: ottenuto sostituendo il PBS all'anticorpo in un campione

Interpretazione

- L'interpretazione dei risultati in immunistochemica (IIC) consiste nella valutazione di una immunoreazione in riferimento alla sua sensibilità e specificità
- Localizzazione
 - Antigeni nucleari, citoplasmatici, della membrana, extracellulari

Sensibilità e Specificità

- Per sensibilità (Se) si intende la capacità di individuare l'antigene (Ag) in cellule o tessuti in cui l'Ag è realmente presente (vero positivo)
- Per specificità (Sp) intendiamo, al contrario, la capacità di individuare correttamente le cellule o tessuti privi di Ag ricercato (vero negativo)

Sensibilità e Specificità

- I valori ideali del 100% di Se e Sp in IIC sono in realtà non raggiungibili nemmeno in condizioni tecniche ottimali.
- L'obiettivo da raggiungere è di ottenere risultati costanti in termini di Se e Sp.
- Tale obiettivo va perseguito attraverso una continua valutazione e rivalutazione di reagenti, tecnica e campioni

CONTROLLI IN IMMUNOISTOCHEMICA

- La valutazione di reagenti, tecnica e campioni viene effettuata attraverso i controlli:
 - **Negativo**
 - **Positivo**
 - **Di processazione**

CONTROLLI IN IIC

- *Controllo negativo* serve ad evidenziare i falsi positivi ed è quindi un controllo di specificità
- Viene effettuato sostituendo l'AB primario con un siero normale
- Ogni colorazione osservata sul vetrino di controllo va sottratta idealmente alla colorazione osservata sul vetrino campione

CONTROLLI IN IIC

- *Controllo positivo* serve ad evidenziare i falsi negativi ed è quindi un *controllo di sensibilità*.
- Si usano sezioni note per contenere l'Ag ricercato nelle medesime condizioni del campione in esame.
- Si possono usare in alternativa *controlli interni* positivi alla sezione in esame

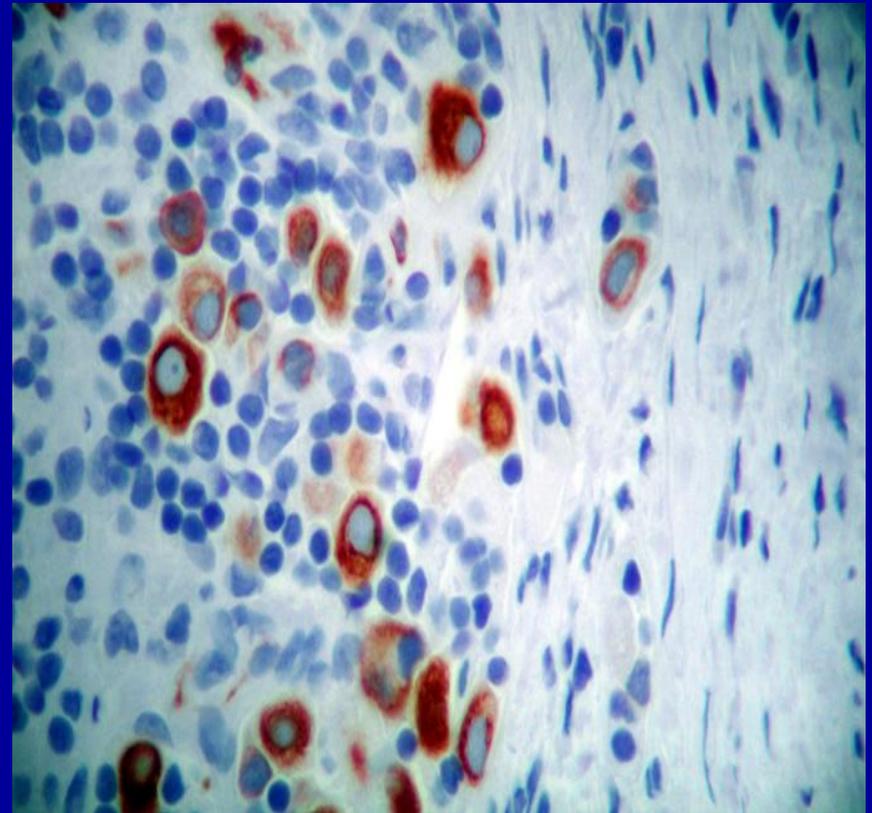
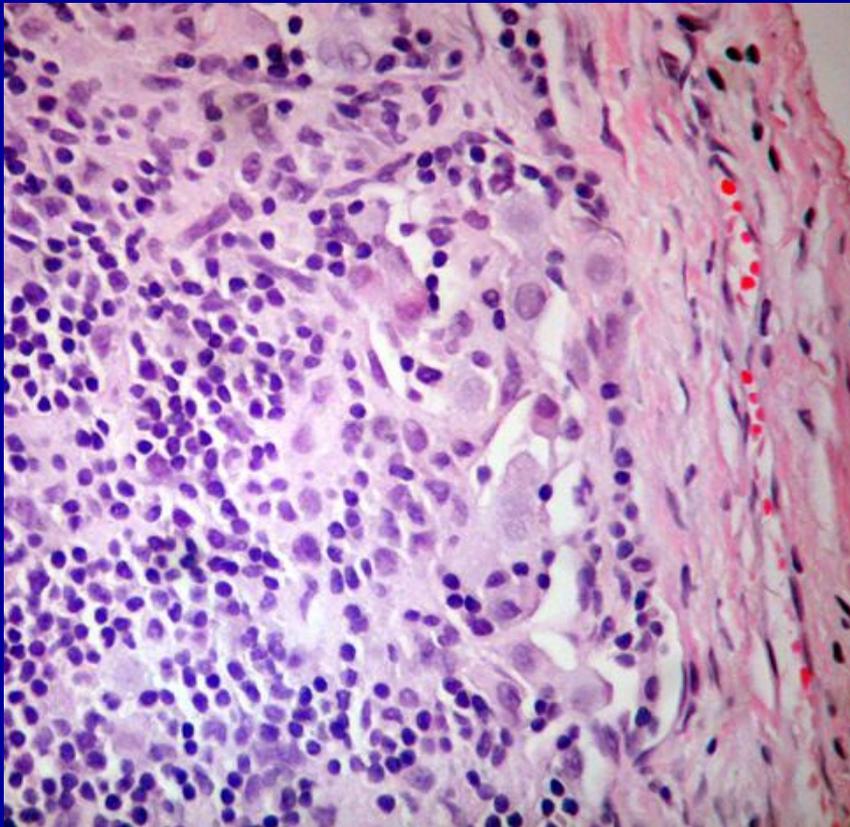
CONTROLLI IN IIC

- *Controlli di processazione* suggeriscono il
 - Tempo di fissazione ottimale
 - Eventuali variazioni di fissazione
 - Necessità di eventuale pretrattamento

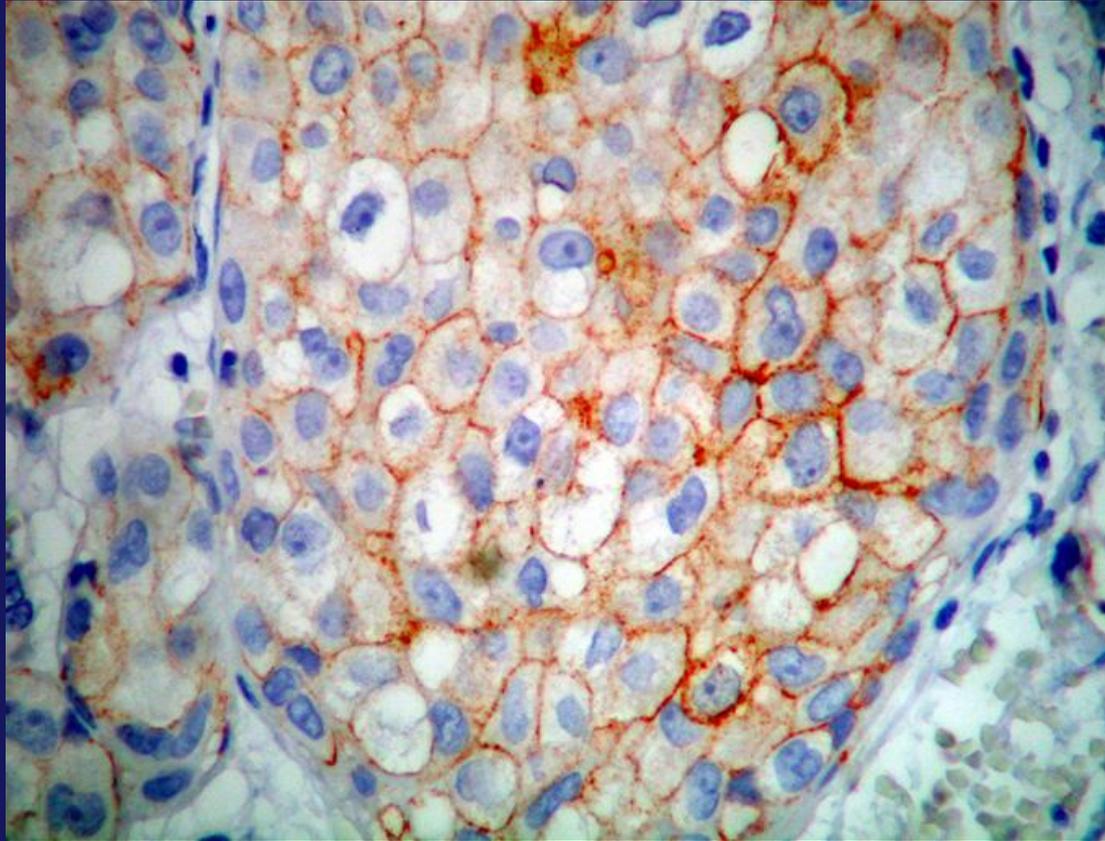
Reazioni Aspecifiche

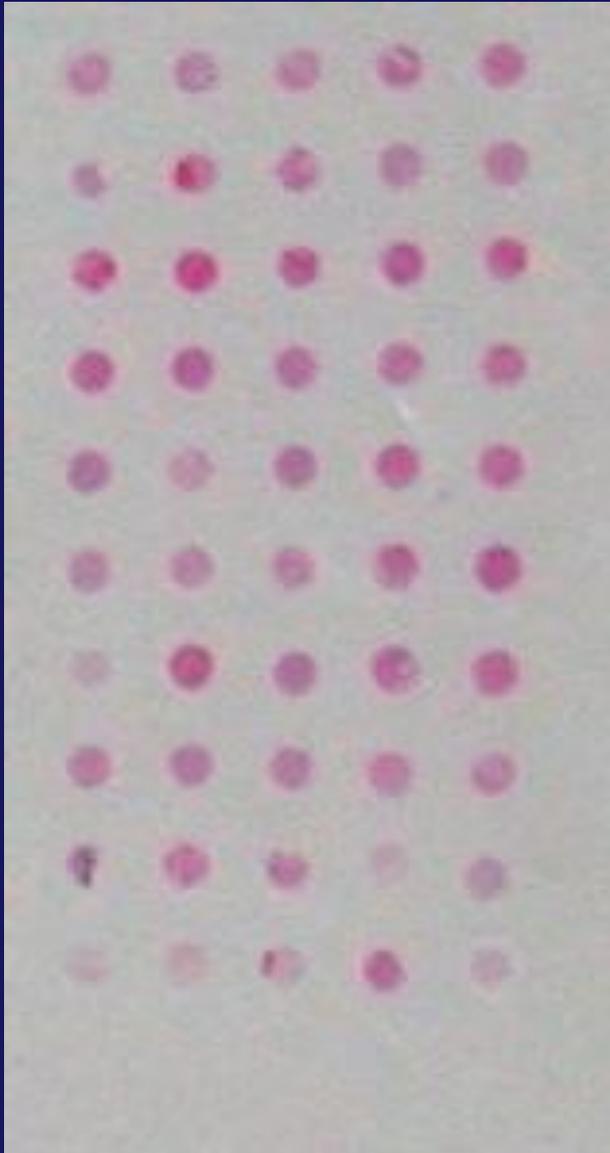
- Per “**colorazione aspecifica**” o di “**fondo**” si intende una colorazione diffusa dei preparati che si verifica con qualsiasi tipo di reazione immunoistochimica, e che è particolarmente intensa in alcuni tessuti.
- Possiamo riconoscere 4 distinte cause di reazione aspecifica, tutte legate a fattori intrinseci dei tessuti che selettivamente interagiscono negativamente con specifici elementi delle metodiche IHC (soprattutto di quelle indirette)
 - Interazioni elettrostatiche (tessuti-anticorpi)
 - Recettori FC Proteina A e Proteina G (tessuti-anticorpi)
 - Perossidasi e Fosfatasi Endogne (tessuti-cromogeno)
 - Biotina endogena (tessuti-complesso enzimatico)

Micrometastasi occulte linfonodali Citocheratine



Antigeni di superficie recettoriali: HER2/neu



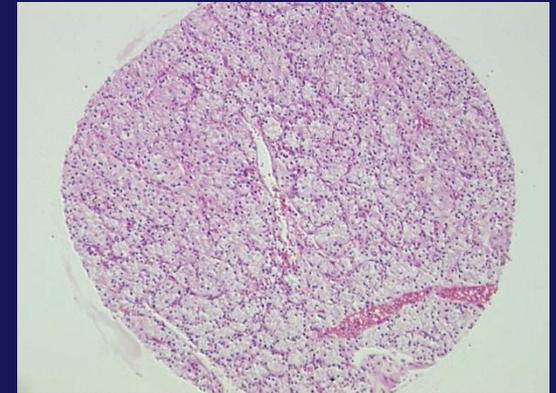


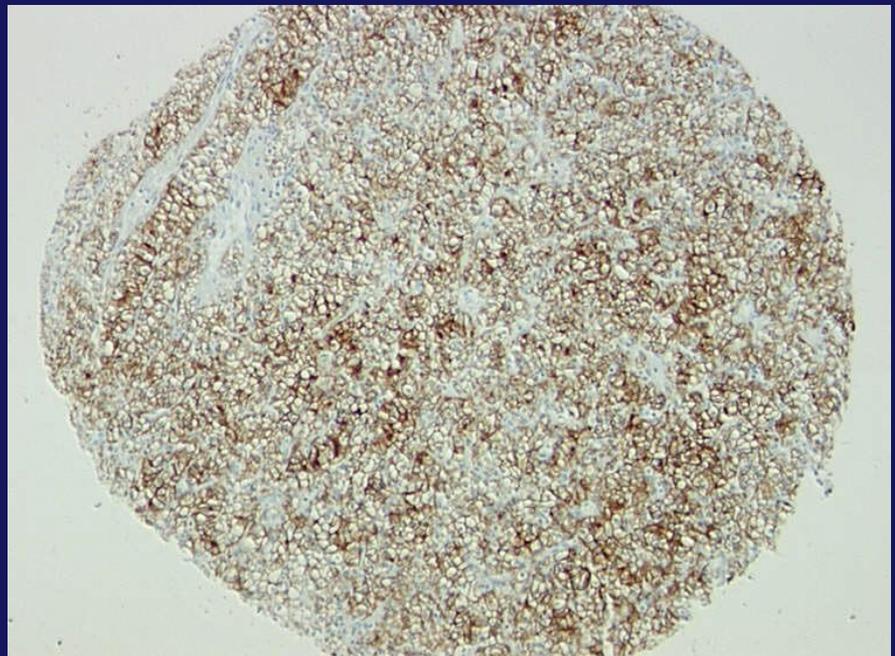
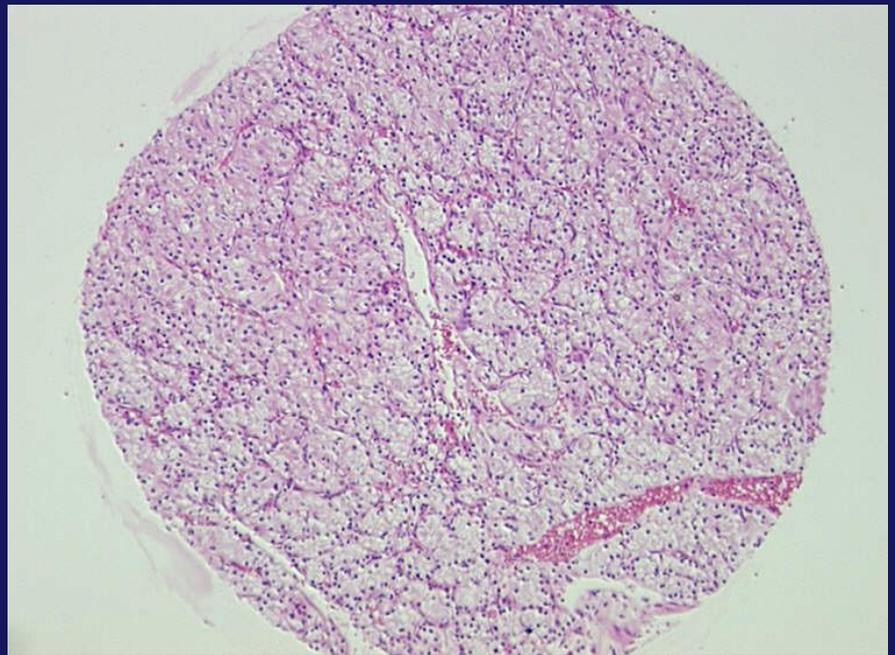
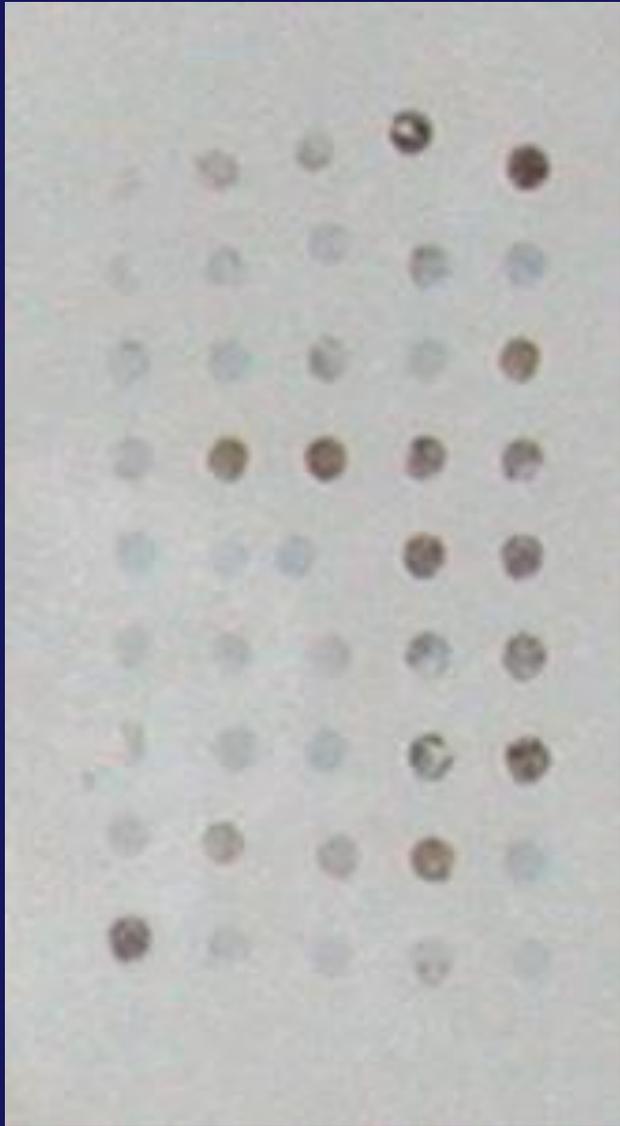
1998: TMA

*Tissue Micro-Arrays
for high-throughput
molecular profiling of
tumor specimens*

*By J Kononen, ... OP
Kallioniemi*

Nat Med 4: 844





TMA

- *Tumoriali:* *una proteina / tumori o istotipi diversi*
- *di Progressione:* *una proteina / stadi diversi*
- *Terapeutici:* *una proteina /trattamenti diversi*

Strumentazione



TMA

Materiali

- Tessuti in Paraffina
 - IHC
 - FISH
 - RNA-ISH

- Tessuti a Fresco
 - IHC
 - DNA
 - RNA
 - proteine

TMA

- Da un singolo blocchetto convenzionale (tessuto cm 2x2 con spessore 0,3-0,5 cm) si possono effettuare circa 500 biopsie per la metodica TMA
- Le biopsie per TMA sono generalmente frustoli di 0,6-1 mm di diametro (paraffina) o 2-3 mm di diametro (fresco) con lunghezza di 3-5 mm
- Un blocchetto per TMA (cm 3x2= 600 mm² area) può contenere fino a 1600 frustoli potenziali di biopsie da 0,6 mm di diametro distanziati tra di loro da 0,1 mm (0.38 mm² area)
- Da un blocchetto per TMA si possono ottenere circa 300-400 sezioni consecutive da 7-8 micron di spessore

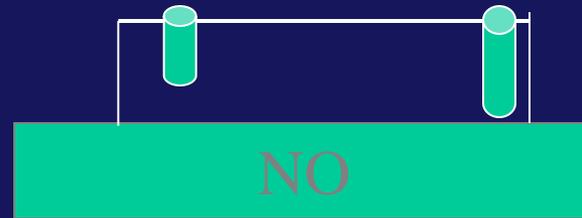
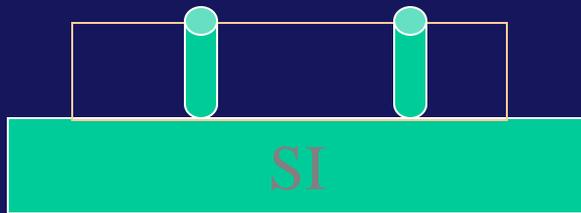
TMA

Metodica

- Visone del preparato in EE e scelta dei blocchetti e dei campi per la biopsia
- Biopsia e preparazione del blocchetto TMA
- Taglio blocchetto (una EE ogni 50 sezioni per controllo materiale)
- Controllo delle sezioni in EE
- IHC (metodica standard)
- Analisi semiquantitativa
- Sistema automatizzato di analisi ed archivio di immagine

Scelta del blocchetto donatore

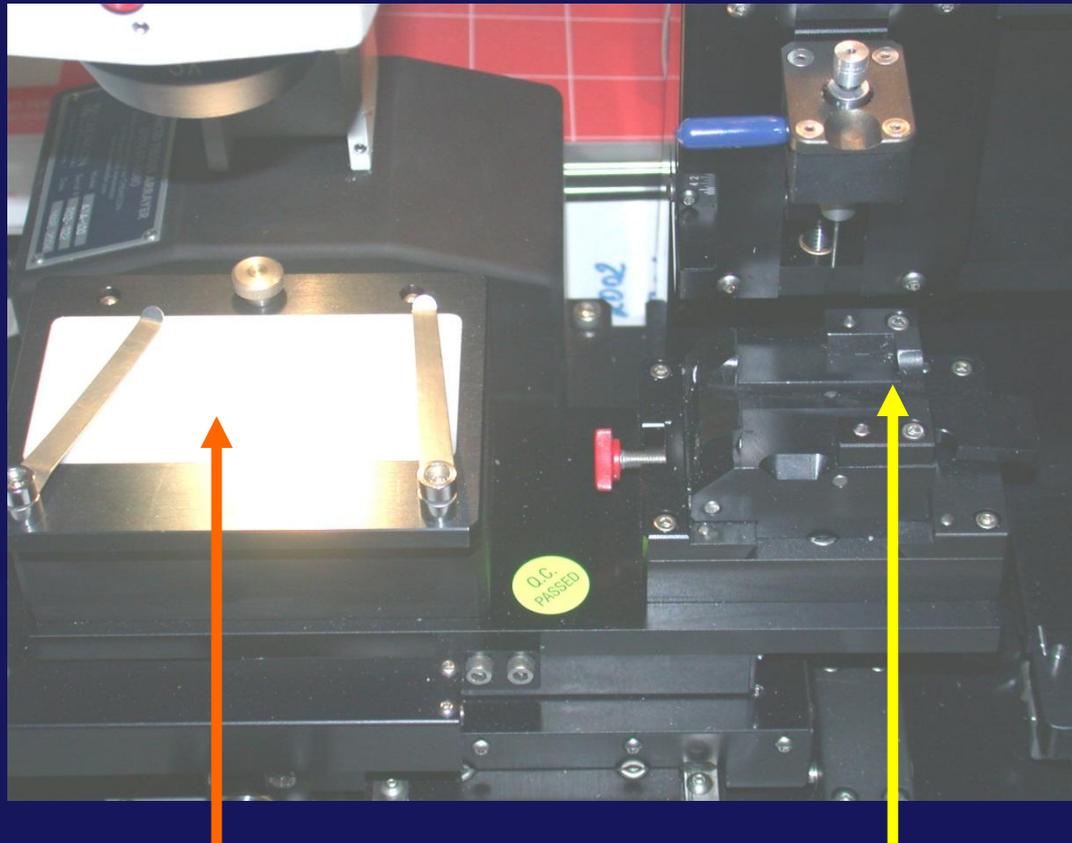
- I cilindri devono avere la stessa altezza nel blocco ricevente*



Processo

- Una volta orientato il blocchetto donatore, ogni movimento del tavolo traslatore del microscopio si trasmette identico al blocchetto donatore. Ciò si traduce in una maggiore accuratezza (controllo visivo) nella selezione dei campi

Processo



Selezione del campo ed allineamento del blocco donatore

TMA

• *Limiti*

- Rappresentatività del campione
- Tumori eterogenei
- Frustoli processati in modalità diverse

• Vantaggi

- Studio di screening
- Buona riproducibilità
- Risultati di rappresentatività simili alle metodiche tradizionali
- Utilizzo di metodiche (IHC etc.) già sperimentate

TMA

strumentazione

- *Diversità nel controllo dei campi*
 - *Controllo visivo (microscopio)*
- *Diversità di preparazione del blocchetto*
 - *Automatici*
 - *Manuali*
- *Diversità nell'archiviazione ed elaborazione dei dati*
 - *Software*