MINISTERIO DE SALUD

"SAN BARTOLOMÉ"

0506

N° 0003-DG-HONADOMANI.SB/2014

Resolución Directoral

Lima, 03 de Enero de 2014

Visto, el Expediente N° 20490-13;

CONSIDERANDO:

Que, el artículo VI del Título Preliminar de la Ley N° 26842 – Ley General de Salud, establece que es responsabilidad del Estado promover las condiciones que garanticen una adecuada cobertura de prestaciones de Salud a la población, en términos socialmente aceptables de seguridad, oportunidad y calidad; razón por la cual, es preocupación constante del Ministerio de Salud priorizar la calidad asistencial, así como la implementación de la mejor práctica clínica en las prestaciones asistenciales que se brinde a la población usuaria en los Establecimiento de Salud;

Que, mediante Resolución Ministerial N°526-2011/MINSA, se aprueban la "Normas para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud", cuyo numeral 6.1.4 del acápite 6.1 referido a los "Documentos Normativos", establece que, "*Cuando el Documento Técnico sea un Manual, su finalidad es básicamente de información a los usuarios y operadores cotidianos, por lo que debe ser de fácil manejo, fácil entendimiento y fácil aplicación, debiendo comprender lo mas sustancial de una determinada materia*";

Que, en ese contexto, mediante Memorando N°542-2013-OGC-Resp.ECS-HONADOMANI.SB, el Jefe de la Oficina de Gestión de la Calidad remite al Jefe del Departamento de Ayuda al Diagnostico, el Informe N°061-2013-ECS-OGC-HONADOMANI.SB, por el cual la Responsable de Evaluación de la Calidad de la Oficina de Gestión de la Calidad, concluye que el "Manual de Procedimientos Técnicos", elaborada por el Servicio de Anatomía Patológica, cuenta con opinión favorable para su aprobación;

Que, mediante Nota Informativa N°520-JDAD-HONADOMANI-SB-2013, el Jefe del Departamento de Ayuda al Diagnostico remite al Director General, el citado Manual para su aprobación a través de la Resolución Directoral respectiva, cuya finalidad es ser un referente de buena práctica clínica que permite definir y estandarizar los procesos, tiempos de ejecución y responsabilidades del personal del Servicio de Anatomía Patológica, y a su vez cuenta con opinión favorable de la Oficina de Gestión de la Calidad; y reúne la estructura mínima establecida en el numeral 6.1.4 del acápite 6.1 referido a los "Documentos Normativos" de las "Normas para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud", aprobada mediante Resolución Ministerial N°526-2011/MINSA;

Que, mediante Oficio N°0322.SDG.HONADOMANI.SB.2013, el Sub-Director General emite opinión favorable para la aprobación del citado Manual, por lo cual es necesario emitir el acto resolutivo correspondiente;

Con las visaciones de la Sub – Dirección General, del Departamento de Ayuda al Diagnostico, de la Oficina de Gestión de la Calidad y de la Oficina de Asesoría Jurídica;

En uso de las atribuciones y facultades conferidas al Director General mediante Resolución Ministerial N°436-2011/MINSA y la Resolución Ministerial N° 884-2003-SA/DM, que aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Nacional Docente Madre Niño "San Bartolomé";

HOSPITAL NACIONAL DOCENTE MADRE NIÑO "SAN BARTOLOME"
DEPARTAMENTO DE AYUDA DIAGNOSTICA

SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA

"MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TECNICOS"

2013

INDICE

Pág.

I.- INTRODUCCIÓN
II.- FINALIDAD
III.- OBJETIVO
IV.- BASE LEGAL
V.- AMBITO DE APLICACIÓN
VI.- ASPECTOS TECNICOS CONCEPTUALES
VII - CONSIDERACIONES GENERALES
VIII.- CONSIDERACIONES ESPECIFICAS

A.- DE LA UNIDAD DE PATOLOGÍA QUIRÚRGICA
Procesamiento de Especímenes Quirúrgicos
1. Recepción e Identificación de las muestras
2. Registro de las muestras
3. Procesamiento Macroscópico
4. Procesamiento Técnico
a)Fijación
b)Procesamiento automatizado de tejidos
c)Inclusión en Parafina
d)Corte, Secado y Desparafinado
e)Coloración
i Coloración de Hematoxilina Eosina
f)Montaje
g)Entrega de láminas
5. Diagnóstico Final
6. Digitación
7. Entrega de Resultados
8. Archivo
9. Estadística
Procesamiento de Biopsia por Congelación
Procesamiento de Estudio de Inmunohistoquímica
Documentos de Gestión del Area de Patología Quirúrgica
Coloraciones Especiales
Fluxograma

B.- DE LA UNIDAD DE CITOLOGÍA
De la Citología Ginecológica
Procedimiento de la Citología Cérvicouterina para el Diagnóstico de Cáncer cervical
1.- Recepción, Identificación y Registro de la muestra
2.- Procesamiento técnico
3.- Diagnóstico citológico: lectura, diagnóstico final y reporte
4.- Digitación y Entrega de resultados
5.- Archivo y Estadística
6.- Documentos de gestión
- Libro de Registro de Pacientes
- Formatos de hoja de solicitud y resultado
- Registro de Cargos de entrega de láminas a tecnólogos médicos
- Registro de cargos de casos de consulta a los médicos
- Registro de control de Materiales y reactivos
- Registro de citologías positivas y muestras insuficientes
- Registro de Entrega de Resultados a convenios

Fluxograma

Ministerio de Salud
Oficina de Gestión de la Calidad

De la Citología Especial

1.- Recepción, Identificación y Registro de la muestra
2.- Preparación de la muestra
3.- Procesamiento técnico
4.- Diagnóstico citológico
5.- Reporte
6.- Digitación y Entrega de resultados
7.- Archivo y Estadística

Fluxograma

C.-DE LA UNIDAD DE CITOGENÉTICA

Procedimiento del examen de Cariotipo en linfocitos de sangre periférica

1.- Solicitud de Examen
2.- Entrevista
3.- Toma de Muestra
4.- Procedimiento Técnico
5.- Lectura
6.- Reporte:
7.- Lectura con el Cariotipador
8.- Diagnostico
9.- Entrega de Informe

Archivo de láminas,entrevistas

Estadística por Pacientes, por Diagnostico, por Iconografía

Fluxograma

Procedimiento del examen de la Cromatina Sexual

1. Toma de muestra
2. Procesamiento técnico
3. Lectura
4. Reporte
5. Archivo y Estadística

D.-DE LA UNIDAD DE NECROPSIAS

Introducción, Definición, Utilidad, Marco Legal, Tipos, Materiales, Reactivos, Equipos, Vestimenta

Procedimiento:

1. Autorización de necropsia y Solicitud
2. Identificación y Registro
3. Procedimiento necrópsico
4. Emisión de Certificado de Defunción
5. Diagnóstico macroscópico:
6. Procesamiento macroscópico
7. Procesamiento técnico
8. Diagnóstico final
9. Tipeado
10. Archivo y estadística

Fluxograma

I.-INTRODUCCION

El trabajo de la Anatomía Patológica tiene características que requiere de las personas un conocimiento teórico de la tecnología, ciencia y arte de la medicina en general y en particular de la Anatomía Patológica; la capacidad de un trabajo en equipo que consolide la experiencia cuotidiana rica y sorprendente científicamente hablando, el uso de un raciocinio lógico pertinentemente exitoso para la interpretación de los mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos de la morbilidad de la estructura biológica corporal, orgánica, tisular, citológica y molecular; de una obligada y permanente actualización de los conocimientos teóricos y aplicativos para la mejora permanente del diagnóstico.

Toda esta actividad se evidencia en la organización del trabajo de la Anatomía Patológica que comprende Unidades como la Patología Quirúrgica, la Citología, la Citogenética y Biología Molecular y Necropsias

El presente Manual de Procedimientos Técnicos que presentamos a continuación es un documento de Gestión Clínica del laboratorio de la Anatomía Patológica, referente necesario para la práctica cuotidiana que justifica su importancia

II.-FINALIDAD

Este documento tienen como finalidad ser un referente de buena práctica clínica que nos permitirá definir y estandarizar los procesos, sus tiempos de ejecución y las responsabilidades de cada uno de los trabajadores en forma puntual y global dentro de los procedimientos que ejecutamos; así mismo desarrollarlos según las mejores evidencias científico tecnológicos, monitorear y realizar evaluaciones de sus productos a fin de brindar un servicio de calidad a nuestros usuarios

III.-OBJETIVO

- Determinar de manera explícita nuestra labor diaria, los procesos que realizamos y sus tiempos de ejecución y las responsabilidades de cada uno de los trabajadores en el proceso global
- Servir de referente para el desarrollo y la evaluación que permita:
  - Establecer los lineamientos estandarizados de los procedimientos de exámenes histopatológicos, necrópsicos, citológicos y citogenéticos bajo los criterios de Calidad, eficacia y eficiencia.
  - Designar las responsabilidades del personal que labora en el Servicio bajo los criterios de correspondencia con su nivel laboral, experticia y capacitación

IV.-BASE LEGAL

- Ley N° 27657 Ley General de Salud
- Ley N° 27657 Ley del Ministerio de Salud
- Ley N° 27658 Ley Marco de la Modernización del la Gestión del Estado
- Decreto Supremo N° 013-2002-SA – Aprueba el Reglamento de la Ley N° 27657 – Ley del Ministerio de Salud.
- Decreto Supremo N° 023/2005-SA aprueba el ROF del MINSA
- Decreto Ley N° 276 Ley de bases de la administración Pública
- Ley N° 27444 – Ley de Procedimiento Administrativo General
- Resolución Ministerial N° 884-2003 Aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Nacional Docente madre Niño "San Bartolomé"
- Resolución Ministerial N° 603-2006-SA/DM
- Resolución Ministerial N° 317-2009-SA/DM Aprueba directiva N° 007-MINSA/OGPE-V.02: (14 de mayo 2009) Directiva para la Formulación de Documentos Técnicos Normativos de Gestión Institucional"
- Resolución Ministerial N° 526-2011 MINSA Norma para la elaboración de documentyos Normativos del Ministerio de Salud

V.-AMBITO DE APLICACIÓN

El campo de aplicación del presente manual es el Servicio de Anatomía Patológica del Departamento de Ayuda Diagnóstica del HONADOMANI San Bartolomé y por ende está dirigido a todo el personal que labora en él.

Está dirigido a todo el personal del Servicio de Anatomía Patológica como médicos anátomo patólogos, tecnólogos médicos, biólogos, técnicos de laboratorio y administrativos.

VI.-ASPECTOS TECNICOS CONCEPTUALES

El producto final de la Anatomía Patológica es usado en el proceso del estudio de la salud y su morbilidad, para fines diversos como son:

a) El diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las enfermedades
b) La investigación y publicación científicas
c) La gestión clínica
d) La Microfotografía
e) Como elemento legal
f) Epidemiología
g) La Auditoría
h) La innovación tecnológica
i) La Docencia
j) La ética y deontología

En el presente manual se enumeran los procesos, se describen y fijan las funciones y se detallan los procedimientos cuya base está referida a los consensos científicos de estandarización universal en la Anatomía Patológica.

Estos procesos llamados procedimientos técnicos, se describirán según las áreas o unidades de trabajo, como:

1. Procedimientos técnicos en Patología Quirúrgica.
2. Procedimientos técnicos en Citología.
3. Procedimientos técnicos en Citogenética.
4. Procedimientos técnicos en Necropsias.

NIVELES DE RESPONSABILIDAD

Los niveles de responsabilidad se definen y describen en el curso de todo el proceso

Este documento representa un magno esfuerzo del personal del Servicio de Anatomía Patológica que colaboró en su realización que a continuación detallamos

ELABORACION:	Dra. Nery Romero Rojas
COLABORADORES:	Dra. Ingrid Zegarra Urquizo
	Lic. TM Jesús Riquelme Arredondo
	Lic. TM Marlene Vargas Chavez
	Lic TM Laura Huallpa Salas
	Lic. TM María Isabel Osorio
	Lic TM Carolina San Miguel Egúsquiza
	Lic. TM Rafael Vega Vera
	Lic. Vanesa Llanos Cóndor
	Biol. Rosario Gamarra Camacho
SECRETARIA:	Sra. Erika Gonzales Martínez

.

HOSPITAL NACIONAL DOCENTE MADRE NIÑO "SAN BARTOLOME"
DEPARTAMENTO DE AYUDA DIAGNOSTICA

SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA

DESCRIPCION DE FUNCIONES Y PROCESOS:

"PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS EN LA UNIDAD DE PATOLOGIA QUIRURGICA"

Ministerio de Salud
Oficina de Gestión de la Calidad
Hospital Nacional Docente Madre-Niño "San Bartolomé"

PROCESAMIENTO DE ESPECIMENES DE LA PATOLOGIA QUIRURGICA

CONSIDERACIONES GENERALES

Los especímenes quirúrgicos o muestras que procesamos en esta unidad se obtienen mediante las denominadas biopsias, extirpación de órganos mediante actos quirúrgicos, cirugía laparoscópica, biopsias punción aspiración, así como los óbitos fetales y las placentas. Un proceso particular lo constituye la denominada biopsia por congelación, la cual explicaremos en forma separada.

Este procesamiento de los especímenes quirúrgicos conduce a la formulación del diagnóstico anátomo patológico que es una de las actividades principales del Servicio de Anatomía Patológica

La responsabilidad laboral se designará o señalará según el nivel del proceso

En todo el proceso el personal usará guantes, mascarilla y ropa de laboratorio como medida de bioseguridad

CONSIDERACIONES ESPECIFICAS

Este proceso consta de diferentes etapas o pasos que desarrollaremos a continuación y podemos dividirlas en:

1. RECEPCION E IDENTIFICACION DE LA MUESTRA
2. REGISTRO DE LA MUESTRA
3. PROCESAMIENTO MACROSCOPICO
4. PROCESAMIENTO TECNICO
5. DIGNOSTICO FINAL
6. DIGITACION
7. ENTREGA
8. ARCHIVO
9. ESTADISTICA
10. CONTROL

1.- RECEPCION E IDENTIFICACION DE LA MUESTRA

Responsable: Técnico de Laboratorio

La Recepción de los especímenes tiene como objetivo constatar el tipo de espécimen que se recibe en el servicio y si concuerda con la hoja de solicitud, Estas muestras vienen de sala de operaciones, consulta externa, hospitalización, emergencia, de referencia de otras instituciones o particulares.

Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente lleguen las muestras al Servicio de Anatomía Patológica

La muestra llega con un documento de pago y una hoja de solicitud del examen que contenga los siguientes datos: (*Anexo N° 1*)

a) De filiación: Nombres y apellidos, edad, N° de historia clínica, sexo, procedencia, departamento, servicio, N° de cama
b) Nombre del especimen o muestra
c) Informe de patología previos o de otro hospital
d) Enfermedad actual y exámenes auxiliares de importancia
e) Hallazgos operativos
f) Diagnóstico Clínico
g) Fecha
h) Firma del médico que solicita el examen

Responsable: técnico.

Si la muestra llegara sin el documento de pago, inmediatamente se facturará digitalmente según código respectivo.

Responsable: digitador o secretaria del servicio

2.- REGISTRO DE LA MUESTRA

Responsable: Técnico de Laboratorio
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente lleguen las muestras al Servicio
MATERIALES
Libro de registro
Lápiz de cera
Lapicero
Engrapador.
Guantes
La muestra inmediatamente recepcionada, será inscrita en el libro de registro de la Patología Quirúrgica (Anexo N° 2), donde se le asignará un número para su identificación posterior y se consignará:

a) Fecha de ingreso del especimen,
b) N° de Muestra.- este número se colocará en el recipiente del espécimen, hoja de solicitud, casetes y bloques de parafina, láminas, reporte final y en todos los libros de registro y control y la estadística del área
c) Nombres y apellidos,
d) Edad,
e) N° de historia clínica,
f) Tipo de espécimen y
g) Médico y técnico responsables

Se inscribirá con lápiz de cera el número de registro en el recipiente que transporta la muestra y en la hoja de solicitud y se asegurará que la muestra esté en un recipiente que lo cubra totalmente con formol

3.- PROCESAMIENTO MACROSCOPICO
Responsable: médico patólogo
Colaborador: Técnico de laboratorio
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente después del registro durante el horario de trabajo.
Equipos:

- Equipo de disección: bisturí, pinzas sin dientes, pinzas con dientes, tijeras, viscerótomo, estiletes, sierra eléctrica, otros.
- Balanza.
- Cámara y Equipo fotográficos.

Reactivos:

- Formol.
- Decalcificante.

Materiales:

- Recipientes de diversos tamaños para colocar los especimenes en formol
- Casetes.
- Recipientes para colocar los casetes con muestras
- Papel filtro
- Hojas de bisturí
- Regla.
- Tabla para disección.
- Lápiz de carbón.
- Lapicero.
- Tinta para bordes de sección.
- Formatos de las guías de procedimientos específicos, protocolos u hojas de check list
- Algodón.
- Gasa.
- Guantes
- Hilo de sutura para fetos

El objetivo de este paso es, realizar según estándares internacionales, la descripción macroscópica de la muestra, abordar las lesiones y elegir la zona más representativa de la lesión para realizar el diagnóstico patológico final, de allí su importancia y la responsabilidad recae en el médico patólogo y ésta es no delegable. El producto que se obtiene es un documento llamado reporte macroscópico y muestras para el procesamiento técnico. Se anotará la fecha de realizado procedimiento.

PROCEDIMIENTO.-

Para cada tipo de especimen se utilizará una guía, protocolo o check list específico, el cual deberá ser llenado completamente de acuerdo a los estándares fijados. (Anexos N°.....)

Se anotará en la descripción macroscópica el tipo de muestra y las condiciones en que se recibe, si está en fresco o fijado, si es un órgano entero o fragmentado.

En relación a las biopsias se consignará el número de fragmentos que se recibe, sus dimensiones, el nombre cómo el médico envía la muestra ejemplo, *"rotulado como biopsia de mama se recibe 4 fragmentos... etc"*. En relación a especímenes mayores se describirá la forma, peso, consistencia, dimensiones, color, olor, descripción de la superficie externa, superficie de corte, y cortes seriados.

Con la tinta china se señalará los bordes de sección si fuera obligatorio y de acuerdo al caso

Se realizará los cortes estandarizados. Cada corte deberá colocarse en los casetes con el respectivo número de registro y se dejarán en un recipiente que cubrirá los casetes con formol en una proporción del doble. Se anotará los números de cortes y casetes que se envía por muestra.

Si las muestras fueran menores a 1 cm de diámetro mayor o de una consistencia blanda, éstas deberán ser colocadas en el casete envueltas en papel filtro

En los óbitos fetales, deberá procurarse realizar un BABYGRAMA. Luego de concluido el procesamiento macroscópico se realizará los diagnósticos macroscópicos de inmediato, según parámetros que están consignados en el protocolo respectivo. Deberá entregarse a secretaría para el tipeado de la macroscopía y se imprimirá una hoja la cual se engrampará al protocolo.

Si por casualidad no hubiera la paciente pagado dicho examen se inscribirá en el archivo de fetos y se consignarán en éste los diagnósticos macroscópicos

4.- PROCESAMIENTO TECNICO

Responsable: Tecnólogo Médico

Colaborador: Técnico en Laboratorio

Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente se concluya el Examen macroscópico y se compruebe que la muestra está bien fijada

Las técnicas en el procesamiento histopatológico de los especímenes quirúrgicos representan para el diagnóstico en la Anatomía Patológica otro paso importante luego de la obtención de la muestra, su registro e identificación y estudio macroscópico.

El manejo y procesamiento técnico de los especímenes quirúrgicos conllevan una gran responsabilidad, en tanto es la base para el diagnóstico final. De la calidad que posea el producto final en este proceso dependerá el diagnóstico anatomopatológico .

El proceso consta de varios pasos que pasamos a describir:

- Fijación
- Preparación de Tejidos,
- Inclusión en bloques de parafina
- Corte
- Coloración y
- Montaje

4.1.- FIJACION

MATERIALES Y REACTIVOS:

-Formol al 10%.

-Agua destilada.

-Probetas de 1000 ml.

-Recipientes de plástico para mantención de especimenes en formol
-Frascos dispensadores para el formol preparado.
-Guantes y mascarillas.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

FORMOL AL 10%:

Formaldehído al 37%-40%	100 ml
Agua destilada	900 ml

FORMOL AL 20%.

Formaldehído al 37%- 40%	200 ml
Agua destilada	800 ml

La Fijación es el proceso mediante el cual se precipita las proteínas, formando una malla que engloba los otros componentes celulares, por lo tanto, los elementos constitutivos de células y tejidos son fijados en su estado físico y parcialmente en su estado químico, de manera que puedan resistir el tratamiento sucesivo con varios reactivos sin pérdida, distorsión o descomposición de su estructura. La fijación tiene como objetivo interrumpir los procesos de degradación o lisis de los tejidos, inactivando las enzimas proteolíticas e inhibiendo el crecimiento bacteriano que aparecen tras la muerte celular, tratando de conservar su arquitectura y composición lo más próxima posible a como se encontraba en el organismo vivo; evitando que se encojan y procurando que sólo se endurezcan ligeramente para no fragmentarse cuando se realice el procedimiento posterior. Usamos diversas sustancias, pero, el mayormente utilizado es el formol al 10%. Fue August W. Von Hofmann quien descubrió el aldehído fórmico (formol) en 1868, sustancia química que utilizamos aun en nuestros días en la preparación y mantenimiento de los cuerpos y tejidos.

Es importante tomar en cuenta lo siguiente: a)no existe un fijador universal, ya que un agente fijador adecuado para un tejido, puede no serlo para otro; b)los fijadores no conservan indefinidamente el tejido; c)si se produce un defecto de fijación jamás podrá ser corregido y es imposible realizar un estudio histopatológico de rutina en un material con graves defectos de fijación.

Una buena fijación se basa en obtener muestras delgadas, menos de 5mm de grosor y el tiempo de fijación varía en relación al tipo de tejido; así por ejemplo el material óseo debe fijarse y decalcificarse previamente, lo que demorará algunos días antes de continuar su proceso. Las biopsias pequeñas generalmente con unas 4 a 6 horas pueden continuar su procesamiento posterior y otros especimenes como el cerebro necesita una semana por lo menos.

La fijación se logra por inmersión o por perfusión y debe hacerse inmediatamente de obtenida la muestra, salvo especificaciones puntuales como la biopsia de congelación u otras.

En la selección del fijador intervienen varios factores tales como las estructuras y entidades que se van a demostrar y el tipo de estudio a realizar. Hay numerosos tipos de fijadores, cada uno con sus ventajas y desventajas, así tenemos al Formol, el más usado, el Alcohol Corriente de 96° , el Alcohol – éter, ácido Pícrico, ácido Acético y otros.

DECALCIFICACIÓN Y REBLANDECIMIENTO TISULAR.

Se denomina decalcificación a la completa eliminación de las sales de calcio presentes en los tejidos tras haber realizado su fijación. Habitualmente este procedimiento técnico se realiza de forma sistemática sobre tejidos mineralizados (dientes y hueso) y esporádicamente, sobre material anatomopatológico con calcificaciones que dificultan o impiden la observación microscópica de las lesiones. Se aconseja no decalcificar el tejido en las enfermedades óseas metabólicas, en las que el estudio del frente de osificación es imprescindible para valorar el equilibrio entre síntesis y destrucción de matriz ósea y su grado de calcificación.

Entre los principales agentes decalcificadores tenemos al ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido sulfuroso, ácido fórmico, acético o tricloroacético, empleados aisladamente o en conjunción con distintos líquidos fijadores. Además, se han utilizado resinas de intercambio iónico, quelantes químicos como el EDTA, disociación electrolítica y aceleradores de procesos, los emisores de ultrasonidos. El líquido decalcificante ideal debe reunir las siguientes cualidades: a) Producir una

eliminación completa de los depósitos cálcicos; b) No provocar efectos indeseables o artefactos sobre los tejidos tratados y c) No interferir con los procedimientos de tinción.

MATERIALES:

Frascos de plástico.
Probetas 100mL.
Guantes y mascarillas

REACTIVOS:

Agua de caño	700mL
Acido Nítrico	100mL
Formol	100mL
Alcohol 96°	100mL

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar los 700mL de agua de caño en un frasco de plástico.
2. Agregarle lentamente los 100mL de Ácido Nítrico.
3. Agregarle 100mL de formol comercial.
4. Añadir 100mL de alcohol al 96°.

Trabajar con guantes y mascarilla.

4.2 PROCESAMIENTO DE TEJIDOS

Luego de fijada la muestra, ésta deberá pasar por diferentes sustancias químicas con el objetivo de ser accesible a la microtomía que permita visualizar su estructura histológica microscópicamente. Está constituido por tres pasos secuenciales con el fin de remover todo el agua de los tejidos y reemplazarla con un medio que se solidifique para permitir así el corte de los mismos; son:

- Deshidratación
- Aclaramiento
- Infiltración

La deshidratación se realiza con alcoholes de concentración creciente desde los 70° hasta el alcohol absoluto

El aclaramiento se realiza con el xilol y es un paso que permitirá que la parafina penetre a los tejidos.

La Infiltración en parafina es el reemplazo del agua por la parafina, que permite se endurezca el tejido para un ulterior corte

REACTIVOS

a. Formol,
b. Agua destilada,
c. Alcohol corriente,
d. Alcohol absoluto,
e. Xilol,
f. Parafina.

Existen dos formas de procesar estos tejidos: Manual o Automatizado.

Nosotros la realizamos de forma automatizada en un equipo llamado "procesador automatizado de tejidos" que tiene una programación digital

EQUIPOS

Procesador automático de tejidos

PROCEDIMIENTO:

Nuestro procesador automático presenta 12 recipientes que contienen en orden sucesivo, reactivos por las cuales pasan los casetes de tejidos en un tiempo establecido, tal como a continuación detallamos

1. Fijación en formol al 20%... 1 hora
2. Agua corriente ..... 1 hora
3. Alcohol de 70% ..... 1 hora y 30 min

4. Alcohol de 80% ..... 1 hora y 30 min
5. Alcohol de 90% ..... 1 hora y 30 min
6. Alcohol de 96% ..... 1 hora y 30 min
7. Alcohol de 100% ..... 1 hora y 30 min
8. Alcohol de 100% ..... 1 hora y 30 min
9 Xilol ..... 1 hora y 30 min
10. Xilol ..... 1 hora y 30 min
11. Parafina a 56 ° C ..... 1 hora y 30 min
12. Parafina a 56°C ..... 1 hora y 30 min
13. Parafina a 56°C ..... 1 hora y 30 min de duración.

4.3.- INCLUSIÓN EN MOLDES DE PARAFINA

EQUIPOS

Centro de Inclusión (dispensador de parafina y cámara fría)
Moldes de acero para inclusión

MATERIALES Y REACTIVOS

Pinzas
Pinza para presión de tejidos

REACTIVOS

a. Parafina

La parafina es una mezcla de hidrocarburos sólidos derivados del petróleo; es blanca, translúcida e inodora. Tiene un punto de fusión de 45°C a 60°C. Se añaden polímeros plásticos para aumentar la consistencia y la elasticidad. Esto último permite que se formen cintas más fácilmente que ayuda a a evitar la compresión de los tejidos. También se agrega sulfóxido de dimetilo (DMSO)para lograr una rápida infiltración a los tejidos.

La inclusión es el proceso de rodear un tejido con una sustancia firme. La parafina es el medio de inclusión más frecuentemente usado. La finalidad del proceso es obtener un bloque fácil de manejar, de dureza homogénea, así como con plasticidad y elasticidad adecuadas, que permita realizar los cortes de calidad sin distorsión ni fragmentación de las estructuras constituyentes del tejido.

Después del procesamiento se coloca la muestra en el molde de acero, orientándola a fin que su plano de corte se ubique en el fondo del molde, luego se cubre con parafina y se coloca su propio casete numerado, se deja solidificar, obteniéndose un bloque sólido.

4.4.- CORTE, SECADO Y DESPARAFINADO:

Este proceso tiene como objetivo la obtención de cortes de espesor muy fino (3 micras) lo suficientemente delgados para su observación al microscopio. Se realiza con instrumentos llamados micrótomos, algunos son automatizados

EQUIPOS:

-Micrótomo
-Portacuchillas de perfil alto o de perfil bajo
-Baño de flotación.
-Estufa

MATERIALES:

-Agua corriente o destilada a 42°C
-Cuchillas de perfil alto Y de perfil bajo
-Pinzas.
-Guantes
-Lápiz cristalográfico con punta de diamante.
-Canastillas portaláminas
-Láminas portaobjetos.
-Libro de registro.

Previamente los bloques deben estar en la congeladora por lo menos unos 15 minutos. Se ubican en el micrótomo, se realiza el desbaste y luego cortes finos sucesivos; se extienden estos cortes primero en una pequeña cubeta con agua y alcohol que facilita la extensión y luego se pasa al

Ministerio de Salud
Oficina de Gestión de la Calidad

flotador que contenga agua a 47°C; se recogen en una lámina portaobjeto rotulada con el número de la muestra. Se continúa con el secado para evitar su desprendimiento y se desparafina.
La desparafinación se realiza en una estufa a 60°C por 30 minutos, o a 37°C hasta el día siguiente.
Se realiza los cortes, se extienden en el baño de flotación que posee agua tibia y se recogen los cortes en una lámina portaobjeto

4.5.- COLORACIÓN
Responsable: Tecnólogo Médico
Colaboración: Técnico de Laboratorio

La coloración de Hematoxilina – Eosina es la coloración estándar de referencia para el estudio anatomopatológico. Los conceptos teóricos de la histología y la Anatomía Patológica se sustentan en esta coloración para describir las características microscópicas de los tejidos normales y realizar el diagnóstico de las entidades patológicas. Se hace uso de coloraciones llamadas especiales cuando se tiene necesidad de definir la especificidad de algunos tejidoso estructuras microscópicas diversas; éstas las describiremos posteriormente.

La ***hematoxilina*** es un colorante natural, que se obtiene del árbol Hematoxilon campechianum, el extracto natural es el hematoxilon y no es un colorante activo; para teñir debe ser oxidado y convertido en hemateína. Para la oxidación usamos el óxido rojo de mercurio. En este proceso el hematoxilon pierde 2 átomos de hidrógeno y una de sus moléculas se vuelve quinona. Para que la hemateina se fije al tejido le agregamos un mordiente, el sulfato de aluminio y potasio (alumbre), este se combina con el colorante bajo forma de hidróxidos, ocupando el lugar de un átomo de hidrogeno, y el resto de sus valencias permite unir o fijar el complejo colorante – mordiente sobre la estructura tisular principalmente los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos. Como el alumbre se utiliza en solución acuosa tiende a disociarse, es necesario entonces usar una solución alcalina (azuleamiento) para neutralizar el acido libre y liberar grupos hidroxilos que permiten la formación de una laca insoluble azul de aluminio – hemateina – tejido. Usamos para el azuleamiento, sustancias como el carbonato de litio o soluciones amoniacales. Esta solución de hematoxilina tiende a teñir el núcleo.

La ***eosina*** Y es un colorante artificial cuya fórmula es C20H8Br4O5, tetrabromofluoresceina. Es un compuesto ácido con polaridad negativa, lo que le permite unirse con constituyentes celulares de carga positiva. Se usa como colorante de fondo o de contraste y tiñe el citoplasma celular, sus componentes y orgánulos, colágeno, eritrocitos, fibras musculares, gránulos eosinófilos y proteínas del líquido; no colorea los nucleos que son ácidos nucleicos. La coloración resultante es rosado-anaranjada para citoplasma y rojo intenso para eritrocitos

Este procedimiento cuenta con colorantes principales o compuestos, que deben prepararse antes de usarlos en la llamada batería de coloración de hematoxilina – eosina; éstas son la Hematoxilina de Harris y la Eosina Y Compuesta. Además de los colorantes compuestos existen otros reactivos que también deben ser preparados previamente para su uso, como son la solución alcohol-acido, agua amoniacal o solución sobresaturada de carbonato de Litio.

COLORACION DE HEMATOXILINA – EOSINA (H-E)

EQUIPOS:

a. Microscopio para control de calidad de la coloración.
b. Estufa
c. Balanza digital de 1 gr a 5 lts
d. Cocina eléctrica de plancha
e. Matraz,
f. Papel filtro

MATERIALES:

a. Cubetas de acero quirúrgico.
b. Canastillas portaláminas.
c. Material de vidrio:
    - Balón de 4 lts
    - Pipeta de 10 ml

- Probeta de 100 ml
- Probeta de 1 lt
- Bagueta de 20 cms
- Beaker de 1 lt
- Mortero con pilón de 100 ml

d. Espátula
e. Guantes.
f Papel de filtro
g. Matráz de 1 lt
h. Probetas de 1 lt

REACTIVOS.

Los reactivos los nombraremos según los colorantes y reactivos compuestos que se usan en la batería.

COMPOSICIÓN DE LOS COLORANTES COMPUESTOS

a. **Hematoxilina de Harris**
   - Hematoxilina cristales ..... 5 gr
   - Sulfato de Alumbre y Potasio ..... 100 gr
   - Oxido rojo de mercurio ..... 2.5 gr
   - Acido Acético glacial ..... 40 cc
   - Alcohol Absoluto ..... 50 cc
   - Agua destilada csp ..... 1 lt

b. **Eosina Y Compuesta:**
   - Eosina Y ..... 10 gr
   - Bicromato de potasio ..... 5 gr
   - Solución saturada de ácido Pícrico ..... 100 cc
   - Alcohol absoluto ..... 100 cc
   - Agua destilada ..... 800 cc

c. **Alcohol Acido:**
   - Acido clorhídrico QP ..... 3 cc
   - Alcohol corriente 96° ..... 250 cc

d. **Agua Amoniacal:**
   - Amoniaco QP, ... 3 cc
   - Agua destilada ..... 250 cc

e. **Carbonato de Litio: Solución Sobresaturada**
   - Carbonato de Litio, ... 3 cc
   - Agua destilada ..... 250 cc

f. **Alcohol Absoluto,**
g. **Alcohol corriente de 96°**
h. **Xilol**
i. **Agua corriente**

PREPARACIÓN DE LOS COLORANTES COMPUESTOS

Preparación de la "HEMATOXILINA DE HARRIS"
Responsable: Tecnólogo Médico
Procedimiento:
Disolver la hematoxilina con alcohol.
Colocar en un balón el agua destilada y llevar al fuego hasta que salgan burbujas, retirar del fuego y agregar el sulfato de alumbre y potasio y agitarlo hasta que se disuelva.
Agregar la solución de hematoxilina al balón y llevar al fuego hasta que salgan las primeras burbujas, retirar.

Ministerio de Salud
Oficina de Gestión de la Calidad

Agregar al balón, el oxido rojo de mercurio y agitar con un movimiento de rotación constante, hasta que se disuelva y el colorante tome un color rojo vinoso o púrpura intenso.
Dejar enfriar al agua de caño al balón con el preparado.
Una vez frio, agregar el ácido acético glacial.
Poner a guardar la solución en frasco de vidrio oscuro por 24 horas y luego filtrar para usar. Etiquetar el frasco colocando el nombre y la fecha de preparación y el nombre del TM.
El preparado es estable por 06 meses hasta un año.
El técnico, cada vez que saca este colorante deberá anotar en la hoja respectiva del CARDEX, la cantidad de colorante y la fecha

Preparación de la "EOSINA Y COMPUESTA"
Responsable: Tecnólogo Médico
Procedimiento:
Disolver la eosina en agua en un recipiente,
Disolver el bicromato de potasio en agua en otro recipiente,
Unir las dos soluciones y mezclar.
Agregar la solución de ácido pícrico, alternando con el OH.
Guardar por 24 horas en frasco de vidrio oscuro y luego usar. Etiquetar el frasco colocando el nombre del colorante, la fecha de preparación y el nombre del TM que preparó.
El preparado es estable por 06 meses hasta un año.
El técnico, cada vez que saca este colorante deberá anotar en la hoja respectiva del CARDEX. la cantidad de colorante y la fecha

La composición y disposición en la llamada batería de coloración H-E de estos reactivos están definidos en proporciones y procesos estandarizados, tal como detallamos a continuación:

BATERIA DE COLORACION.- se dispone los reactivos en cubetas de acero quirúrgico de manera secuencial, donde se colocarán las canastillas con láminas en tiempos establecidos

1)	Xilol	5 minutos
2)	Xilol	5 minutos
3)	Xilol	5 minutos
4)	Alcohol absoluto	5 minutos
5)	Alcohol absoluto	5 minutos
6)	Alcohol corriente	5 minutos
7)	Agua de caño	5 a 10 minutos
8)	Hematoxilina de Harris	2 minutos
9)	Agua de caño	10 a 15 minutos
10)	Alcohol - Acido	1/2 minuto
11)	Agua de caño	2 a 5 minutos
12)	Agua amoniacal	1/2 minuto
13)	Agua de caño	2 a 5 minutos
14)	Eosina "Y" compuesta	10 a 15 segundos
15)	Agua de caño	5 minutos
16)	Alcohol corriente	5 minutos
17)	Alcohol corriente	5 minutos
18)	Alcohol corriente	5 minutos
19)	Alcohol absoluto	5 minutos
20)	Alcohol absoluto	5 minutos
21)	Xilol	5 minutos
22)	Xilol	5 minutos
23)	Xilol	5 minutos

Previamente se debe verificar la fecha de vencimiento de las sustancias y reactivos a utilizar. Asimismo se debe verificar la adecuada preparación de acuerdo a las instrucciones
Se filtrará diariamente los colorantes.

Se usará hoja de control diario del tiempo de uso de los reactivos de la batería (Anexo N°...)

Resultados:
Con la hematoxilina de Harris, el núcleo se observa de color pardo negruzco a azul negro, el calcio semejante al núcleo. Con la eosina se tiñen de color rosa pálido el citoplasma, los eritrocitos, músculos, gránulos eosinófilos de color rojo brillante;, las proteínas del líquido de edema, etc.

Fundamento de la Coloración de la Hematoxilina-Eosina:
El tejido se desparafina con los xiloles; se hidrata para la posterior coloración, con los alcoholes de mayor porcentaje al menor hasta el agua; la coloración del nucleo se realiza con la hematoxilina de Harris; la diferenciación con el alcohol acido al 1%; el viraje se realiza con agua amoniacal; la coloración del citoplasma con la eosina; luego se deshidrata con alcoholes del corriente al absoluto hasta el xilol para el montaje en resina

4.6- MONTAJE:
Responsable: Tecnólogo Médico
Colaborador: Técnico en Laboratorio
Materiales
- Resina sintética para montar los extendidos. (Entellan),
- Laminillas
- Etiquetas para láminas

4.7- ENTREGA DE LÁMINAS
Responsable: Tecnólogo Médico
Colaborador: Técnico en Laboratorio
Tiempo de Ejecución: inmediatamente de concluido el proceso técnico
Materiales
- Portaláminas
- Cuaderno de registro de Entrega de láminas
- Lapicero

La entrega de láminas se realizará inmediatamente se concluya el procesamiento técnico. En el documento respectivo se consignará el nombre del médico a quien se entrega, la fecha, el listado de casos que incluya el N° del caso y el número de láminas por cada caso. Si hubiera coloraciones especiales igualmente serán consignadas con la fecha respectiva

5.- DIAGNÓSTICO FINAL.
Responsable: médico patólogo
Tiempo de Ejecución: se realizará el dia posterior a la entrega de láminas. Los casos difíciles o problemáticos se consultarán para asegurar el diagnóstico
Los diagnósticos se realizarán según los estándares internacionales de cada entidad que se plasmen en los protocolos
Los médicos llevarán control de sus casos: exigiendo la pronta entrega de las láminas

Equipos:
- Microscopio.
- Formatos de protocolo específicos para cada entidad.

6.- DIGITACION Y FIRMA
Responsable: Digitador y Médico patólogo
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente que el médico patólogo entregue los resultados dentro del horario de trabajo
Los diagnóstico realizados y escritos por el médico patólogo en la ficha respectiva serán tipeados en el Sistema informático hospitalario, luego serán impresos y entregados al médico patólogo para control de calidad del tipeo y firmarlo
7.- ENTREGA DE RESULTADOS

Oficina de Gestión de la Calidad

Responsable: Digitador, secretaría.
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente que el médico entregue el resultado firmado y halla realizado el control de calidad del tipeado
El digitador realizará un listado con el número del caso y entregará a Archivo de historias clínicas

8.- ARCHIVO DE LAMINAS, BLOQUES DE PARAFINA Y FICHAS DE TRABAJO MEDICO

Responsable: Técnico de laboratorio (a y b). y Digitador (c)
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente que realice el listado de cargo para la entrega
MATERIALES

- Archivadores de lámina
- Archivadores de bloques de parafina
- Archivo de hojas de trabajo

Se archivarán:

a. Láminas
b. Bloques de parafina
c. Ordenes

9.- ESTADISTICA

a) Responsable: secretaría
b) Control: Jefe del servicio
c) La secretaria realizará la estadística mensual según formato expreso

10.- CONTROL DEL PROCESAMIENTO TECNICO

Responsable: Tecnólogo Médico
Colaborador: Técnico de laboratorio
Control de Reactivos:

a. Control diario del Tiempo de uso de los Reactivos de la Batería de Coloración (ficha de control)
b. Control diario del filtrado de los reactivos (ficha de control)
c. Control diario de la temperatura de los Equipos (ficha de control)

Control del Proceso.- Este es manual, deberá proponerse a futuro que sea computarizado. Se llevarán instrumentos visibles del control del proceso del Procesamiento técnico de los tejidos:

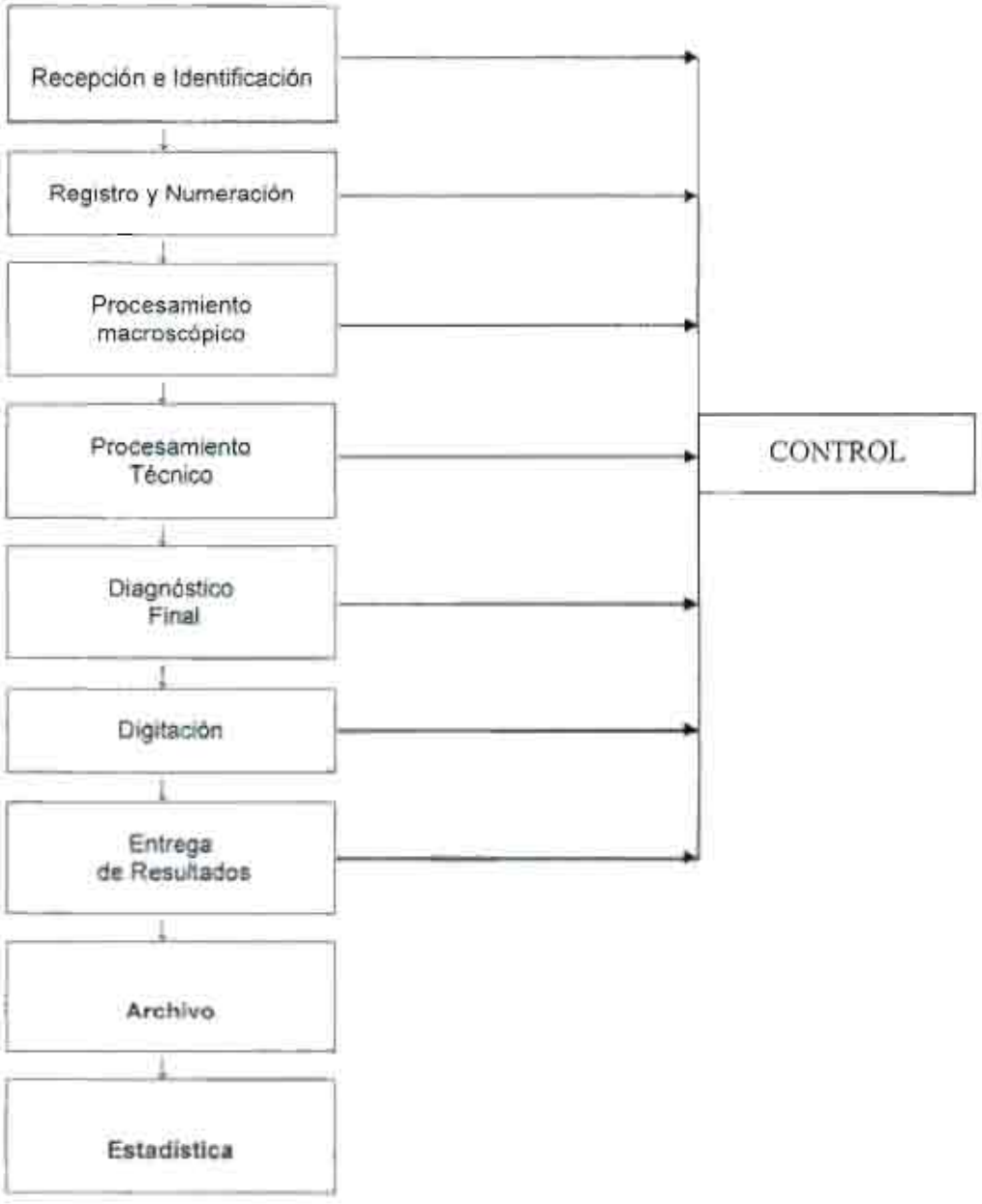
a) Libro de Registro de recepción e identificación de las muestras.
b) Libro de registro del control del proceso que constará de los siguientes ítems
c) Registro del control de tiempos de uso de reactivos de la batería de coloración
d) Registro del control del filtrado de reactivos de la batería de coloración
e) Cardex de los materiales que se usan

Detallaremos estos instrumentos

a. El Libro del Registro *Anexo N° 2* descrito anteriormente
b. Libroo libros de Registro del control del proceso *Anexo N° 3* constituido por los siguientes ítems:
    i. Fecha de recepción de la muestra
    ii. N° de Muestra
    iii. Tipo de especimen
    iv. Fecha de procesar la macroscopía
    v. Fecha de realizar el procesamiento automatizado de tejidos
    vi. Fecha de Inclusión en parafina
    vii. Fecha de corte en el micrótomo automatizado
    viii. Fecha de Coloración de láminas
    ix. Fecha de entrega a los médicos patólogos
    x. Fecha de procesos adicionales: nuevos cortes, IHQ, coloraciones especiales
    xi. Firma del médico que recibe las láminas para el diagnóstico
c. Registro del control de tiempos del uso de reactivos de la batería de coloración *Anexo N° 4*
d. Registro del control del filtrado de reactivos de la batería de coloración *Anexo N° 5*

e. Cardex del uso de materiales y reactivos *Anexo N° 5*

FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DEPATOLOGIA QUIRURGICA



BIOPSIA POR CONGELACIÓN

RESPONSABLE: Médico Patólogo
Colaborador: Tecnólogo Médico
Tiempo de Ejecución: se realizará todo el proceso inmediatamente llegue la muestra al Servicio de Anatomía Patológica

La biopsia transoperatoria es el método por el cual se realiza el diagnóstico inmediato de una determinada entidad utilizando el proceso de congelación del tejido y la coloración de Hematoxilina –Eosina. Generalmente se usa en oncología para determinar si la muestra contiene tejido neoplásico benigno o maligno, asegurar que los márgenes de escisión quirúrgica estén libres de tumor o la determinación de otra patología que se requiera como en el Hirschprung.

EQUIPOS:

a. Criostato.
b. Estufa.
c. Platina porta muestra
d. Microscopio

REACTIVOS:

a. Batería de coloración de Hematoxilina- Eosina.
b. Medio de montaje.
c. Medio de inclusión para tejidos por congelación.
d. Alcohol corriente 96°.

MATERIALES:

a. Pinceles.
b. Koplin.
c. Lápiz cristalográfico con punta de diamante
d. Lápiz de cera.
e. Láminas portaobjetos
f. Laminillas cubreobjetos
g. Formato

PROCEDIMIENTO:

1. Identificación, inscripción y registro
2. Estudio macroscópico
3. Procesamiento técnico
4. Diagnóstico
5. Tipeo y entrega de resultado

IDENTIFICACIÓN, INSCRIPCIÓN Y REGISTRO.-
Responsable: Técnico
Se procesará de forma inmediata, apenas llegue la muestra al servicio si la muestra está en fresco, no fijada en formol y se realizará tal como se procede con las especímenes quirúrgicos anteriormente descritas.

ESTUDIO MACROSCÓPICO.-
Responsable: Médico Patólogo
Se procederá a igual que los especímenes quirúrgicos, seleccionando la muestra para el estudio microscópico.

PROCESAMIENTO TÉCNICO
Responsable: Tecnólogo Médico
Sobre la platina portamuestra se coloca el medio de inmersión y luego la muestra de tejido seleccionada, se lleva al criostato, para su congelación a -60° C durante 5 minutos. Se realiza los cortes con micrótomo a una temperatura de -27°C, con espesores de 3 a 4 micras, a través del sistema antirrol (criostato), se desenrollan con el pincel, se adhiere el tejido a la lámina portaobjeto y ésta lámina se fijará rápidamente en alcohol corriente 96°.

Se realiza la coloración con Hematoxilina Eosina según técnica anteriormente descrita pero los tiempos serán cortos por algunos segundos, así en la hematoxilina de Harris 1 minuto, se lava

con agua de caño agitando la lámina, se pasa 6 segundos por alcohol-ácido, se lava con agua de caño, agua amoniacal 5 segundos, agua de caño, eosina 5 segundos, agua de caño, alcohol corriente, alcohol absoluto, xilol y se monta con resina y cubreobjetos.

Se realizará improntas en láminas, se fijará en alcohol corriente, se teñirá con H-E y/o Papanicolaou para estudio citológico.

DIAGNÓSTICO.-
Responsable: Médico Patólogo
Si se trata de un diagnóstico oncológico se obtendrá tres posibles diagnósticos:

a. Negativo para neoplasia maligna
b. Positivo para neoplasia maligna
c. Se deriva el diagnóstico a parafina.

DIGITACION Y ENTREGA DE RESULTADOS.-
Responsable: Digitador o secretaria
La digitación se realizará inmediatamente concluya la descripción macroscópica y se esperará el diagnóstico final posterior al procesamiento técnico. También se emitirá el diagnóstico por teléfono a sala de operaciones

El tiempo de emitir el diagnóstico deberá ser el mínimo posible, y se tratará que se reporte el diagnóstico entre 10 a 15 minutos.

BIBLIOGRAFIA

1. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de USA (AFIP). Métodos Histotecnológicos.1997. Editado por Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L.Versión en castellano de Heffes C, Mullick F
2.

FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE BIOPSIAS POR CONGELACION

PROCEDIMIENTOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) permiten la identificación de componentes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular en muestras tisulares enbebidas en parafina, congelación o en extensiones celulares mediante la aplicación directa de anticuerpos sobre estas secciones tisulares, La utilización de la IHQ se ha consolidado como tecnología esencial en el diagnóstico patológico de rutina así como en el pronóstico y tratamiento de las enfermedades.

Responsable del procesamiento técnico:
Tecnólogo médico.
Responsable del reporte: Médico patólogo
Tiempo de Ejecución: a igual que los especímenes quirúrgicos

FUNDAMENTO:
Esta técnica está basada en la inmunoreactividad de antígenos y anticuerpos y las propiedades químicas de enzimas o complejos enzimáticos que reaccionan con un sustrato-cromógeno incoloro para producir un producto final coloreado; marcando de esta forma en el tejido, el antigeno deseado. El tejido debe pasar por:

a. Recuperación antigénica
b. Bloqueo de la Peroxidasa endógena tisular
c. Bloqueo de las reacciones inespecificas
d. Aplicación del Anticuerpo(Ac) primario
e. Aplicación del Anticuerpo secundario)
f. Inmunodetección o inmunomarcación con el Complejo Estreptavidina – peroxidasa
g. Revelado con el cromógeno DAB
h. Tinción de contraste

a.-*La recuperación antigénica* permite desenmascarar los Epítopes del antígeno que ha sido cubierto o alterado en el proceso de fijación, rompiendo los lazos de uniones entre el formol y estos epítopes del tejido y permitiendo una mejor penetración y accesibilidad del anticuerpo primario. Puede realizarse por calor o reacción enzimática.
b.- El *Bloqueo de la peroxidasa endógena*.- Los tejidos contienen peroxidasa que deben inhibirse para evitar que reaccionen con el sustrato de la enzima marcadora y evitar falsos positivos.
c.- El bloqueo de reacciones inespecíficas inhibe o impide la reacción con otros tipos de proteínas que contiene el tejido. Se realiza con suero normal, cream milk o bloqueador de proteínas
d.- El *Ac primario* es una inmunoglobulina IgG que va reaccionar con el Ag tisular especifico que queremos demostrar; puede ser monoclonal o policlonal, de ratón o de conejo
e.- El *Ac secundario*, se une al Ac primario, es una inmunoglobulina Anti-IgG biotinizada que servirá de puente para la inmunodetección debido a la afinidad que existe entre la biotina y la estreptavidina
f.- La *Inmunodetección o inmunomarcaje* se realiza con el Complejo Estreptavidina–peroxidasa que se unirá al Ac secundario
g.- El *Revelado* es la visualización de la reacción Ag-Ac con el cromógeno y se produce al reaccionar la peroxidasa del complejo Estreptavidina–peroxidasa con el peróxido de hidrógeno del sustrato, liberando moléculas de oxígeno que van a oxidar al cromógeno (DAB) produciendo color.
La tinción del contraste se realiza con Hematoxilina de Harris
h.- *Tinción de contraste*
ASPECTOS A CONSIDERAR:
Debe usarse un control positivo del antígeno a demostrar.
Los *lavados* se realizan para eliminar todo el antisuero no unido al antígeno después de cada incubación Esto se realiza con una solución baferada (PBS) a un pH neutro que mantiene el medio estable en el tejido.

La incubación previene la evaporación de los antisueros y favorece la velocidad de la reacción manteniendo una ambiente húmedo. La calidad del anticuerpo primario es un factor importante en la IHQ.
Algunos marcadores y revelado requerirán condiciones distintas, teniéndose que optimizar el procedimiento para cada uno de ellos.
El procesamiento tisular inapropiado previo a la IHQ determina pérdida de antigenicidad que limita o impide la obtención de resultados fiables
Los tiempos prolongados de fijación en formol son perjudiciales para muchos antígenos, porque puede cambiar la conformación nativa de proteínas, alterando así la estructura del epítope, lo que hace más difícil la unión del anticuerpo a la proteína, produciendo el enmascaramiento de antígenos.
La formalina tamponada al 10% (pH: 7.0-7.6) es la que se usa comúnmente para inmunohistoquímica. Una de las recomendaciones principales para la fijación es poner todo el tejido (biopsia) al fijador inmediatamente después que ha sido obtenida

EQUIPOS
a. Horno microondas
b. Balanza.
c. Baño María u horno micro ondas

MATERIALES
a. Espátulas metálica para pesar reactivos
b. Phmetro.
c. Racks o contenedores.
d. Cubetas.
e. Probetas, matraz de vidrio.
f. Pipetas Pasteur descartables.
g. Láminas sialinisadas
h. Laminillas cubreobjetos
i. Controles positivos (células diana teñidas)
j. Controles negativos.

REACTIVOS
a. Recuperador antigénico.- puede ser de pH ácido, neutro o alcalino según las especificaciones del Anticuerpo (Ac) primario a usar
b. Peroxidasa al 3%.
c. Anticuerpo (Ac) primario
d. Kit de inmunohistoquímica Biocare Medical: Sistema de Detección Universal Starr Trek.
   - Bloqueador de reacciones inespecíficas (Background Sniper.)
   - Anticuerpo secundario.
   - Complejo Estreptavidina – peroxidasa.
   - Cromógeno: Diaminobenzidina (DAB)
   - Sustrato Buffer DAB
e. Hematoxilina de Harris
f. Solución bufferada de Fosfato Monobásico de Na y Fosfato Dibásico de Na (PBS), para el lavado
g. Alcohol corriente
h. Alcohol absoluto
i. Xilol
j. Resina de montaje

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

a.-PBS (Buffer Fosfato Salino) para el LAVADO

Solución A:

Fosfato Monobásico de Na.....	6.9	gr
Agua destilada.....	1000	ml

Solución B:

Fosfato dibásico de Na..... 7.09 gr
Agua destilada..... 1000 ml

Solución de Trabajo:

Solución A ..... 95 ml
Solución B..... 405 ml
Agua destilada csp 1lt ..... 500 ml (csp 1litroS)

Ajustar el pH: 7.4-7.6 y conservar a 4°C.

b.-**Recuperador Antigénico:**

-Diva Decloaker 10X ..... 100 mL
- Agua destilada..... 900 mL

c.-**Cromógeno:**

Diaminobenzidina..... 1 gota.
Substrato Buffer DAB,..... 1mL

PROCEDIMIENTO

El procedimiento podrá ser manual, semi-automatizado o automatizado, éstos dos últimos con equipos específicos estandarizados

1. Fijación y procesamiento técnico hasta la obtención de bloques de parafina (pág N°4).
2. Se realizan los cortes y se recogen en láminas sialinisadas .
3. Desparafinar a 60° C por 30 minutos y luego pasar por la batería de xilol. Hidratar con la batería de alcoholes hasta agua destilada.
4. TECNICA DE IHQ:
   a. Recuperación Antigénica..... 20 min.
   b. Lavados con buffer (PBS)..... 5 min.
   c. Bloqueador de Peroxidasa ..... 10 -15 minutos.
   d. Lavados con buffer PBS 5 minutos.
   e. BacKground Sniper: 15 minutos.
   f. Incubación con el Anticuerpo Primario..... 30 min.
   g. Lavados con buffer (PBS), ... 5 min.
   h. Lavados con buffer (PBS), ... 5 min.
   i. Incubación con el Segundo Anticuerpo..... 20 min.
   j. Lavados con buffer (PBS), ... 5 min.
   k. Lavados con buffer (PBS), ... 5 min.
   l. Incubar con Streptovidina – Biotina ..... 20 min.
   m. Lavados con buffer (PBS), ... 5 min.
   n. Lavados con buffer (PBS), ... 5 min.
   o. Agregar el cromógeno (DAB Substrato Buffer).. 2 – 5 min.
   p. Lavados con buffer (PBS), ... 5 min.
   q. Lavados con buffer (PBS), ... 5 min.
   r. Contraste con Hematoxilina de Harris ..... 30 seg.
   s. Se lava con agua de caño.
   t. Deshidratación alcohol 96°, y OH absoluto
   u. Xilol.
   v. Montaje.

CONTROL DE CALIDAD

La técnica de IHQ precisa de controles, donde los anticuerpos a estudiar son comerciales y la mayoría de ellos adjuntan una ficha técnica en la que se exige los controles de tejidos que expresen la proteína problema, con el fin de observar al final de la técnica que todo el proceso se ha realizado correctamente al ponerse de manifiesto la inmunotinción del control positivo. Los problemas técnicos más frecuentes son: muestra seca por exceso o defecto de pre-tratamiento, escaso contraste o que el control del tejido seleccionado no sea representativo, algunos de estos puntos se pueden comprobar in situ, pudiendo decidir si es recomendable o no seguir con la

técnica, algunos de ellos sólo son reconocidos al final de la técnica en su observación al microscopio.

Los falsos negativos puede producirse por exposición excesiva al calor, tiempo de isquemia fría prolongada, tipo de fijador, prolongada fijación con formalina, decalcificación, método incorrecto o no optimizada de recuperación antigénica, tipo de anticuerpo,

REPORTE

Responsable: médico patólogo

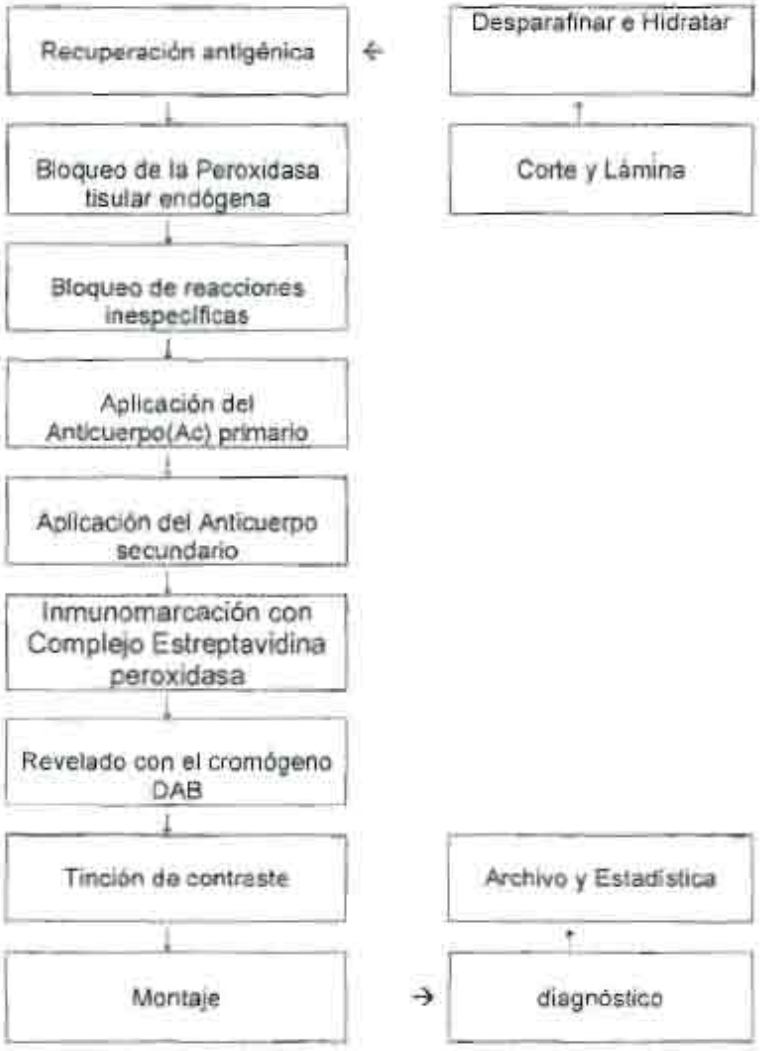
Se informa si la inmunorreacción es positiva o negativa, Para ello debe tenerse en cuenta el sitio de localización de la inmunomarcación que puede ser en la membrana, en el núcleo o en el citoplasma. Existen antígenos como el amiloide, la fibronectina, la laminina y el colágeno tipo IV cuya localización es extracelular.

ARCHIVO

Responsable: Tecnólogo médico

Se inscribirá el resultado en en el cuaderno de reportes de IHQ

FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO INMUNOHISTOQUIMICO



DOCUMENTOS DE GESTION DEL AREA DE PATOLOGIA QUIRURGICA

El Área de Patología Quirúrgica utiliza como instrumentos de control varios documentos, los cuales son:

1. Ficha de Solicitud de examen
2. Libro de registro de Identificación y numeración de las muestras.
3. Registro de Muestras Quirúrgica enviadas al Procesador automático de tejidos.
4. Registro de muestras incluidas en bloques de parafina.
5. Registro de Cortes de Tejido.
6. Registro de Entrega de Láminas al Médico Asistente.
7. Registro de nuevos cortes, coloraciones especiales e IHQ
8. Ficha de control de muestras concluidas en la sección tecnológica
9. Ficha de control de exámenes tipeados y archivados
10. Fichas de control de exámenes diagnosticados por los médicos
11. Archivos de Guías o check list o protocolos de procesamiento macroscòpico de especímenes:
    a. Procesamiento de Útero.
    b. Procesamiento de Placenta de Embarazo simple.
    c. Procesamiento de Placenta de Embarazo múltiple.
    d. Procesamiento de Cono.
    e. De Cáncer de Mama.
    f. De cáncer de Cuello uterino.
    g. De cáncer de Endometrio.
    h. De Cáncer de Ovario.
    i. Protocolo de Autopsia.
    j. Protocolo de Autopsia Fetal.
12. Libro de registro de necropsias
13. Registro de Ingreso y egreso de Materiales CARDEX
14. Registro de ingreso y consumo de sustancias para reportar a la DIRANDRO
15. Registro de ingreso y consumo de metanol

Ministerio de Salud
Oficina de Gestión de la Calidad
Hospital Nacional Docente Madre-Niño "San Bartolomé"

COLORACIONES ESPECIALES

A continuación describiremos las coloraciones especiales que se usan para mayor discriminación de las estructuras diagnósticas.

Coloraciones especiales para Microorganismos:

- Giemsa,
- Ziehl Neelsen
- Gram
- Warthin Starry

Coloraciones especiales para diferenciación tisular:

- Tricrómica de Masson
- PAS,
- Van Giesson,
- Amiloide,
- Hemosiderina,

GIEMSA PARA HELICOBACTER

FUNDAMENTO: La tinción de Giemsa emplea como colorante fundamental una mezcla de derivados tiacínicos catiónicos (azur A, B y azul de metileno) destinado a teñir núcleos celulares, y de eosina como colorante citoplasmático de carácter aniónico. La técnica radica en la disociación controlada de las sales de eosinato que ocurre al insolubilizar la mezcla de Giemsa por dilución en agua destilada, la eosina así liberada colorea el componente extracelular y determinadas estructuras acidófilas (gránulos leucocitos polimorfonucleares eosinófilos) y los derivados de azur, las estructuras basófilas. La cromatina nuclear adopta una tinción azul violácea.

FIJACIÓN: Formol al 10%.

SECCIONES: Cortes de parafina 3 µm.

CONTROL POSITIVO: Tejido de estómago o de colon que contiene Helicobacter.

SOLUCIONES:

GIEMSA:

- **SOLUCIÓN STOCK:**

Giemsa.....3,8g
Alcohol Metílico absoluto.....250cc
Glicerina Q.P.....250cc
Incubar todos los reactivos en baño maría a 37 grados durante 24 horas, agitando frecuentemente.

- **SOLUCIÓN TAMPÓN** pH 6,8:

Fosfato monopotásico.....6.25 g
Fosfato disódico anhidro.....5.0 g
Agua destilada c.s.p.....100cc
Esta solución se guarda en refrigeración.

- **SOLUCIÓN DE TRABAJO:**

Solución stock.....1mL
Solución Tampón.....19mL

PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar el tejido.
2. Hidratar.
3. Alcohol ácido por 5 minutos.
4. Agua destilada.
4. Diluir el Giemsa 1/20 con la solución tampón y cubrir las láminas por 2 horas.
5. Diferenciar con solución de ácido acético al 1 por 1000 (1cc de ácido acético en 1000 cc de agua destilada) enjuagando rápidamente con agua destilada por 2 a 3 veces, hasta observar que los eritrocitos tengan un color rosa rojizo claro.

Ministerio de Salud
Oficina de Gestión de la Calidad

6. Enjuagar bien con agua destilada dejar secar completamente al aire.
7. Luego se pasan por xilol
8. Montaje.

RESULTADOS:

Las bacterias y espiroquetas son azules a púrpura; las rickettsias toman color violeta, la cromatina de los parásitos es roja, el citoplasma es azul y los eritrocitos tienen color rojo salmón.

WARTHIN STARRY PARA HELICOBACTER PYLORI

FUNDAMENTO: La tinción de Warthin-Starry se basa en la capacidad de ciertas bacterias de unirse a los iones de plata a partir de solución. La adición de un agente reductor, convierte esta plata unida a plata metálica.

Se utiliza para identificar, por microscopía óptica, Helicobacter pylori y microrganismos espiroquetas en muestras de tejidos. Esta técnica es muy buena para visualizar el microrganismo, pero es relativamente complicada de realizar, en ocasiones pueden producirse falsos positivos al ser difícil distinguir al microrganismo de los precipitados de plata en la capa mucosa. Ello hace que habitualmente no se utilice como técnica de rutina, reservándose para aquellos casos en que existen dudas diagnósticas.

FIJACIÓN: Formalina al 10%.

SECCIONES: En parafina, 3 µm.

SOLUCIONES: Tejido de estómago o de colon que contiene Helicobacter.

Preparar en el momento:

- Acido cítrico al 1%:

  Acido cítrico..... 0.5 g
  Agua destilada..... 50 mL

- Agua acidulada:

  Acido cítrico al 1%..... ±20 gotas.
  Agua destilada..... 1000 mL

- Solución de Impregnación: NO_3Ag al 1%:

  NO_3Ag..... 1 g
  Agua Acidulada..... 1000 mL

- Soluciones de Trabajo:
  a) NO_3Ag al 2%.....(0.5g NO_3Ag/25mL agua acidulada)
  b) Gelatina al 5%.....(gelatina 2,5g/50mL agua acidulada)
  c) Pyrocatecol..... (pyrocatecol 0,15/100mL agua acidulada)
  *Dejar todo en Baño María a 54°C.
  *Combinar en el siguiente orden: 1.5 mL de **a**.
  3.75 mL de **b**.
  2.0 mL de **c**.

PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar e hidratar.
2. Impregnación en NO_3Ag 1% a 43°C por 30 minutos.
3. Solución de trabajo (a+b+c) de 4 a 7 minutos.
4. Lavar con agua destilada.
5. Deshidratar.
6. Montaje.

RESULTADOS: Espiroquetas-negro/Fondo amarillo pardo.

METODO DE ZIEHL NEELSEN PARA BACTERIAS ACIDO-ALCOHOL RESISTENTE

FUNDAMENTO: La cápsula de los bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) absorbe la carbolfucsina, gracias a su pared celular rica en lípidos y ácidos carboxílicos (ácido micólico). Una vez que se forma este complejo colorante-pared, resiste a la decolorización del diferenciador, apareciendo los bacilos de color rojo sobre fondo azul.
FIJACIÓN: Fijar en formalina al 10% o cualquier fijador, excepto el Líquido Carnoy.
SECCIONES: En parafina de 3 µm.
CONTROL POSITIVO: Una sección positiva para bacilos ácido alcohol resistente.
SOLUCIONES:

- **CARBOLFUCSINA:**
  Solución A: Fucsina básica (C.I.42510).....3gr
  Alcohol absoluto..... 10cc
  Disolver el colorante.

  Solución B: Fenol fundido.....5cc.
  Agua destilada.....95cc
  Mezclar, juntar ambas soluciones y dejar reposar.
- **ALCOHOL ACIDO AL 1%.**
  Acido clorhídrico q.p.....1cc.
  Alcohol absoluto.....99cc.
- **AZUL DE METILENO.**
  Solución Matriz: 1,4 g de azul de metileno (C.I.52015) en 100 ml de etanol al 95%.
  Solución Diaria: 10 ml de solución matriz de azul de metileno en 90 ml de agua destilada.

PROCEDIMIENTO DE COLORACIÓN:

1. Desparafinar.
2. Hidratar. Pasar por los alcoholes de 100, 95 y 50%.
3. Lavar en agua destilada.
4. Colorear las láminas con una solución fresca y filtrada de Carbolfucsina durante 30 minutos.
5. Lavar bien con agua corriente.
6. Decolorar con la solución de alcohol ácido al 1% hasta que las secciones de tejido aparezcan de color rosa pálido.
7. Lavar bien con agua corriente.
8. Contrastar con azul de metileno por 1 a 2 minutos, si es nuevo hasta segundos. Las secciones deben ser de color azul pálido (azul cielo). El exceso de contraste puede enmascarar los bacilos.
9. Lavar con agua y luego con agua destilada. Secar.
10. Pasar por xilol.
11. Montaje.

RESULTADOS:
Bacilos ácido-alcohol resistente.....rojo brillante.
Eritrocitos.....amarillo anaranjado.
Otros elementos titulares.....azul pálido.

COLORACIÓN DE GRAM PARA BACTERIAS
(Técnica de Brown - Hopps)

FIJACIÓN: Formalina neutra al 10%.
SECCIONES. En parafina de 3 µm.
CONTROL POSITIVO: Tejidos positivos con bacterias.
SOLUCIONES:

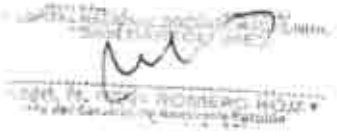
- **SOLUCIÓN DE CRISTAL VIOLETA AL 1%:**
  1g de cristal violeta (de genciana) en 100ml de agua destilada.
- **SOLUCION DE FUCSINA BASICA AL 1%:**
  1g de fucsina básica en 100ml de agua destilada
- **YODO DE GRAM, LUGOL:**
  1g de yodo, 2 g de yoduro de potasio en 300 ml de agua destilada
- **SOLUCION DIFERENCIANTE DE GALLEGOS:**
  Agua destilada ..... 100.0 ml
  Solución de formalina al 37-40%..... 2.0 ml
  Ácido acético glacial..... 1.0 ml
- **SOLUCION ACIDO PICRICO-ACETONA:**
  1 g de ácido pícrico en 100 ml de acetona.
- **SOLUCION DE ACETONA –XILENO:**
  Partes iguales de acetona y xileno.

PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar e hidratar las láminas hasta llegar al agua destilada.
2. Colocar en la solución de cristal violeta al 1% durante 1 minuto
3. Enjuagar con agua.
4. Empapar en la solución de yodo de Gram durante 1 minuto
5. Enjuagar con agua
6. Decolorar con acetona hasta que el fondo aparezca claro.
7. Lavar inmediatamente con agua
8. Empapar en la solución de fucsina básica al 1%, durante 5 minutos.
9. Enjuagar con agua.
10. Colocar en la solución diferenciante de Gallegos ,2 veces, 1 minuto cada uno.
11. Enjuagar con agua.
12. Transferir a un recipiente para teñido.
13. Tratar con acetona durante 30 segundos.
14. Colocar en la solución de ácido pícrico –acetona durante 2 a 3 minutos.
15. Colocar en la solución de acetona –xileno, 2 veces.
16. Aclarar con xileno, 2 veces.
17. Montar con un medio de montaje

RESULTADOS:
Bacterias Gram-positivas..... Azul
Bacterias Gram negativas..... Rojo
Fondo..... Amarillo

RECOMENDACIONES:
a) Usar un soporte para teñido entre los pasos 2 y 11
b) El procedimiento original requiere una solución básica al 0,1%.
c) Usar un recipiente para coloración, entre los pasos 12 a 16.
d) El contraste tartrazina usado en el procedimiento original fue sustituido por el ácido pícrico acetona.



COLORACION DE GIEMSA

REACTIVOS

I.-GIEMSA

SOLUCION STOCK

Giemsa	3.8 g
Alcohol metílico	250 cc
Glicerina QP	250 cc

Incubar todos los reactivos en baño Maria a 37 C por 24 horas, agitando frecuentemente.

SOLUCION TAMPON ph 6.8

Fosfato monopotasico	6.25 g
Fosfato disodico anhidro	5.0 g
Agua destilada c.s.p	100 cc

II.-SOLUCION DE TRABAJO

Solución stock	3 gotas
Solución tampón	3 cc

TECNICA DE COLORACION:

Desparafinar el tejido
Fijar con alcohol metílico durante 10 minutos
Lavar con agua destilada
Cubrir con colorante de trabajo de Giemsa por 60 minutos
Diferenciar con solución de Acido acético al 1 por 1000 (1 cc de acido acético en .....cc de agua destilada) enjuagando rápidamente con agua destilada por 2 a 3 veces hasta observar que los eritrocitos tengan un color rosa rojizo claro
Enjuagar bien con agua destilada
Dejar secar completamente al aire
Luego se pasan por xilol y se montan con bálsamo de Canadá y laminilla

RESULTADOS

Las bacterias y espiroquetas son azules a purpura, las ricketsias toman color violeta ,la cromatina de los parásitos es roja ,el citoplasma es azul y los eritrocitos tienen color rojo salmón.

COLORACIÓN TRICRÓMICA DE MASSON

FUNDAMENTO: Se utilizó inicialmente la solución de Bouin como mordiente para unir las moléculas de colorante a los componentes del tejido de interés. Los núcleos se tiñeron con Hematoxilina de Weigert, que es resistente a la decoloración por las siguientes soluciones de tinción ácida. Aplicación de la solución de la Escarlata de Biebrich - fucsina ácida- tiñe todos los elementos acidófilas del tejido como citoplasma, el músculo y el colágeno. Posteriormente el tratamiento con ácido fosfomolibdico / fosfotúngstico sirve como un decolorante causando que la Escarlata Biebrich - fucsina ácido- se difunda fuera de las fibras de colágeno, dejando a las células musculares rojas. La posterior aplicación de azul de anilina tiñe el colágeno después de lo cual, el ácido acético al 1% se emplea para diferenciar correctamente la sección de tejido.

FIJACIÓN: Formalina neutra al 10%.
SECCIONES: En parafina de 3 µm.
CONTROL POSITIVO: La mayoría de los tejidos tienen un control interno, pero puede utilizarse como control el apéndice, trompas de Falopio, el útero o el intestino delagado.
SOLUCIONES:

- **FIJADOR DE BOUIN:**

Solución saturada de ácido pírico	75 cc
Formol al 40%	25 cc
Ácido acético glacial	5 cc.

Oficina de Gestión de la Calidad

- **HEMATOXILINA DE WEIGERT:**

Solución A	:	Hematoxilina	1 gr.
		Alcohol absoluto	100 cc.
Solución B	:	Agua destilada	95 cc.
		Acido clorhídrico Q.P	1 cc.
		Cloruro férrico al 29%	4 cc.

Se mezclan volúmenes iguales de la solución A y solución B, antes de su uso (esta solución así preparada dura tan solo 2 semanas).

- **ALCOHOL ACIDO AL 1%**

Acido clorhídrico	1 cc.
Alcohol absoluto	99 cc.

- **BIEBRICH – FUCSINA ACIDA**

Escarlata Biebrich al 1% em agua dest	90 cc.
Fucsina acida al 1% en agua dest	10 cc.
Acido acético glacial	1 cc.

- **MORDIENTE (Cuando se emplea azul de anilina)**

Acido fosfomolíbdico	2.5 grs.
Acido fosfotúngstico	2.5 grs.
Água destilada	100 cc.

- **AZUL DE ANILINA**

Azul de anilina	2.5 grs.
Ac. Acético 2% (2 cc + 98 cc agua destilada)	100 cc.

- **ACIDO ACETICO AL 1%**

Acido acético glacial	1 cc.
Água destilada	99 cc.

PROCEDIMIENTO:

Los cortes fijados con formol, se deben tratar primero com liquido de Bouin durante toda una noche a temperatura ambiente.
Lavar los cortes hasta que desaparezca el color amarillo.
Se tiñen los núcleos con hematoxilina de Weigert por 10 a 30 minutos.
Se diferencian hasta obtener tinción nuclear pura con alcohol – acido
Se lava con agua corriente por 10 minutos.
Se tiñe con Escarlata de Biebrich por 15 minutos.
Se enjuaga con agua.
Se aplica la solución de mordiente durante 10 a 15 minutos.
Se deja escurrir.
Se tiñe con azul de anilina por 5 a 10 minutos.
Se enjuaga con agua y se deja escurrir.
Se diferencia con ácido acético por 1 a 3 minutos.
Se deshidrata, aclara.
Montaje.

RESULTADOS:

Fibras musculares	rojo.
Fibrina	rosa.
Colágeno	azul.
Núcleos	azul o negro.
Eritrocitos	rojo.

COLORACION DE PAS
(ACIDO PERYODICO DE SCHIFT)

FUNDAMENTO: Consiste en oxidar los tejidos mediante el ácido peyódico para incrementar el número de grupos carbonilos (aldehídos o cetonas) presentes en ellos de forma que puedan ser demostrados posteriormente mediante el reactivo de Schiff.
FIJACIÓN: Formalina al 10% o solución de Bouin´s.
SECCIONES: En parafina de 3 µm.
CONTROL POSITIVO: Una sección de riñón, estómago o intestino se usa como testigo.
SOLUCIONES:

- **REACTIVO DE SCHIFT:**
  Fucsina básica..... 1 g
  Agua destilada..... 200cc
  Meta bisulfito de sodio..... 1g
  Ácido clorhídrico 1N..... 20 cc
  Carbón activado..... 0,5 g

Calentar el agua destilada y luego disolver la fucsina básica, dejar enfriar y después de filtrar se añade el meta bisulfito de sodio y después de una hora se añade 20 cc de ácido clorhídrico 1N y el carbón activado, agitar y filtrar. La solución debe ser transparente y de color amarillento al cabo de 24 horas y entonces ya puede ser usado, guardar en frasco ámbar en refrigeración de 0 a 4 grados.

- **ÁCIDO PERYÓDICO:**
  Ácido peryódico .....0,5 g.
  Agua destilada..... 100 mL.

- **ÁCIDO CLORHÍDRICO 1N:**
  Ácido clorhídrico, g esp. 1.19.....83.5 mL
  Agua destilada.....916.5mL

- **HEMATOXILINA DE HARRIS.**

PROCEDIMIENTO:

1) Se desparafina e hidratan los cortes
2) Se oxida durante 5 a 10 minutos con ácido peryódico
3) Se enjuaga con agua de caño y luego con agua destilada.
4) Se deja 15 minutos con reactivo de Schift .
5) Se lava durante 5 a 10minutos con agua corriente.
6) Se aplica como colorante de contraste la hematoxilina de Harris.
7) Se lava con agua de caño.
10 Se azulea con carbonato de litio por 2 segundos o agua amoniacal.
11) Lavar con agua de caño
12) Se deshidrata, aclara y monta.

RESULTADOS:
Los núcleos son de color azul, las sustancias PAS positivas toman color magenta (rojo purpura).

PAS/DIASTASA

FUNDAMENTO: La diastasa es una enzima que rompe el glucógeno y el PAS es una coloración que colorea de color magenta en presencia de glucógeno. Cuando ambas son usadas un color rosado bajo reemplaza al magenta. La diferencia en la intensidad de ambas coloraciones (PAS y PAS-D) puede ser atribuida a la concentración de glucógeno.

SOLUCIONES:

- **SOLUCIÓN DE FOSFATO ESTABILIZADORA:**

  Cloruro de sodio.....8.0g
  Fosfato de sodio, dibásico.....0.28g
  Fosfato de sodio, monobásico.....1.97g
  Agua destilada.....100mL

- **SOLUCIÓN DE DIASTASA PARA DIGESTIÓN:**

  Diastasa de malta.....0.1g
  Solución de fosfato estabilizadora, pH 6.0.....100Ml

PROCEDIMIENTO:

1 - La lámina con el corte de tejido se desparafina e hidrata hasta agua destilada.
1- Colocar en la solución de diastasa para digestión, precalentada a 37°C, durante una hora.
2- Lavar a fondo con agua corriente o con varios cambios de agua destilada.
3- Proceder con el procedimiento para glucógeno, conocido como ácido periódico Schiff (PAS).

RESULTADOS:

La coloración atribuida al colágeno es eliminada.

AZUL ALCIAN, pH 2,5

FUNDAMENTO: El Alcian Blue es un grupo de colorantes básicos polivalentes soluble en agua. El color azul es debido a la presencia de cobre en la molécula. La solución acética al 3% (pH: 2.5) tiñe mucopolisacáridos ácidos carboxilatados y sulfatados y sialomucinas carboxilatadas y sulfatadas.

FIJACION: Formalina neutra al 10%.

SECCIONES: En parafina, 3 µm.

SOLUCIONES: Intestino bajo, apéndice y colon.

- **SOLUCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO AL 3%:**

  3ml de ácido acético glacial en 97 ml de agua destilada.

- **SOLUCIÓN DE AZUL ALCIAN:**

  Azul Alcian, 8GX.....1.0 g
  Solución de ácido acético al 3%.....100.0ml.

- **SOLUCIÓN DEL ROJO NÚCLEO RESISTTENTE (KERNECHTROT):**

  0.1 g de rojo núcleo resistente (de Kernechtrot) en 100ml de una solución de sulfato de aluminio al 5%.Lleve a hervor, lentamente .Enfríe, filtre y añada un grano de timol como preservativo.

PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinizar e hidratar hasta llegar al agua destilada.
2. Colocar en la solución de ácido acético al 3% durante 3 minutos.
3. Teñir con la solución de azul Alcian durante 30 minutos.
4. Lavar con agua corriente durante 10 minutos.
5. Enjuagar con agua destilada.
6. Contrastar la solución filtrada del rojo núcleo resistente durante 5 minutos.
7. Lavar con agua corriente por 1 minuto.
8. Deshidratar y aclarar a través de alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto y xileno, 2 cambios cada uno, 2 minutos cada uno.
9. Montaje.

RESULTADOS:

Mucinas sulfatadas ácidas débiles, ácido hialurónico y mucina salivar azul oscuro.
Núcleos de rojo a rosado., Citoplasma rosado pálido.

ALCIAN BLUE/PAS

FUNDAMENTO: Diferenciar entre mucosubstancias neutras y ácidas.
FIJACIÓN: Formalina al 10%
SECCIONES: En parafina de 3 µm
CONTROL POSITIVO: Utilizar un control de mucina.
SOLUCIONES: Mencionadas anteriormente (PAS y Alcian Blue pH: 2.5)
PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar e hidratar los cortes.
2. Solución de Alcian Blue. 30 minutos
3. Lavar en agua destilada.
4. Acido periódico 10 minutos.
5. Lavar en agua destilada.
6. Solución de Schiff 30 minutos.
7. Lavar en agua corriente.
8. Contrastar con Hematoxilina
9. Lavar.
10. Deshidratar.

RESULTADOS:

Azul Alcian (pH 2.5)- PAS: ácido hialurónico y mucina salivar.....azul.
Azul Alcian (pH1.0)-PAS: mucinas sulfatadas .....azul.
Polisacáridos y mucinas neutras conteniendo hexosas y desoxihexosas con grupos de glicol vecinas.....púrpura a rojo

COLORACIÓN PARA HEMOSIDERINA
METODO DE PERLS PARA LA TINCIÓN DE HIERRO

FUNDAMENTO: La reacción de Perls se basa en la liberación de los iones férricos asociados a proteínas mediante la acción del ácido clorhídrico, a su vez, los iones férricos liberados reaccionan con el ferrocianuro potásico formando un precipitado azul verdoso de ferrocianuro férrico o azul de Prusia.
FIJACIÓN: Formalina neutra al 10%.
SECCIONES: En parafina de 3 µm.
CONTROL POSITIVO: Como control se puede usar bazo.
SOLUCIONES:

- **ACIDO CLORHIDRICO AL 20%:**
  Acido clorhídrico.....20.0 ml.
  Agua Destilada.....80.0 ml.
  *Agregar el ácido al agua.
- **SOLUCIÓN MATRIZ DEL FERROCIANURO DE POTASIO AL 10%**
  Ferrocianuro de potasio.....10.0 g.
  Agua destilada.....100.0 ml.
- **SOLUCION DIARIA DE ACIDO CLORHIDRICO – FERROCIANURO DE POTASIO**
  Usar partes iguales de las soluciones de acido clorhídrico al 20% y ferrocianuro de potasio al 10%. Preparar antes de usar.
- **SOLUCION DEL ROJO NUCLEO RESISTENTE (DE KERNECHTROT)**

0,1 g de rojo núcleo – resistente (de Kernechtrot) en 10 ml de una solución de sulfato de aluminio al 5%. Lleve a hervor, lentamente. Enfríe, filtre y añada un grano de timol como preservativo.

PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinizar e hidratar las laminas hasta el agua destilada.
2. Colocar las laminas en una mezcla fresca de la solución diaria de acido clorhídrico – ferrocianuro de potasio durante 30 minutos

3. Enjuagar las láminas con agua destilada.
1. Contrastar con la solución del rojo núcleo resistente durante 5 minutos.
2. Lavar bien con agua corriente 2 minutos.
3. Deshidratar y aclarar con alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto y xileno, 2 cambios cada uno, 2 minutos cada uno.
4. Montar con medio resinoso.

RESULTADOS:
Hemosiderina, algunos óxidos y sales de hierro azul., Núcleos y citoplasma de rosa a rojo.

COLORACIÓNES PARA AMILOIDE

FUNDAMENTO
El Rojo Congo es un colorante con una afinidad selectiva por el amiloide. Se cree que la forma lineal de la molécula es responsable de su capacidad de unirse a la estructura del amiloide, a través de enlaces de hidrógeno no polares. Los métodos de tinción utilizados favorecen la formación de estos enlaces electroquímicos. Una combinación de pH alto y alto sódico en la solución de tinción favorece la unión selectiva del colorante y el amiloide. La disposición de unión entre el colorante y el amiloide produce un efecto único (birrefringencia verde manzana) cuando el tejido teñido se observa con luz polarizada. La presencia de birrefringencia verde manzana se ha convertido en la característica de diagnóstico más fiable del amiloide. La Hematoxilina generalmente es el contraste de elección para la tinción del Rojo de Congo.
FIJACIÓN: Formalina neutra al 10%
SECCIONES: En parafina de 3µm.
CONTROL POSITIVO: Tejidos con depósitos de amiloide.

COLORACIÓN DE ROJO CONGO: METODO DE BENNHOLD

SOLUCIONES:

- **Solución de Rojo de Congo al 1%:**
  Rojo Congo..... 1.0 g.
  Agua Destilada..... 100 ml.
- **Solución de Hidróxido de Sodio al 1%:**
  Hidróxido de Sodio..... 1.0 g.
  Agua Destilada..... 100 ml.
- **Solución Alcohólica Alcalina:**
  Solución de Hidróxido de sodio al 1%..... 1.0 ml
  Solución de alcohol etílico al 50%..... 99 ml
- **Solución de Hematoxilina de Mayer (Hematoxilina de Harris)**

PROCEDIMIENTO:
Desparafinizar e hidratar hasta llegar al agua destilada.
Colorear con una solución filtrada de Rojo de Congo por 1 hora.
Enjuagar brevemente con agua destilada.
Diferenciar rápidamente en solución alcohólica alcalina.
Lavar con agua corriente durante 05 minutos.
Contrastar con la solución de Hematoxilina de Mayer (Hematoxilina de Harris) durante 05 minutos.
Lavar con agua corriente durante 15 minutos.
Deshidratar con alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto, 02 minutos cada uno.
Aclarar con dos cambios de xilol, 02 cada uno.
Montaje.

RESULTADOS:

Amiloide rosado y manzana verdoso con luz polarizada. Núcleos azul.

METODO DEL CRISTAL DE VIOLETA DE LIEB

SOLUCIONES:

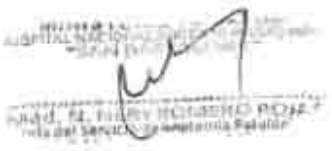
- **SOLUCIÓN MATRIZ DE CRISTAL VIOLETA**
  - Cristal violeta..... 14.0 g
  - Alcohol etílico, 95%..... 100.0 mL
- **SOLUCION DIARIA DE CRISTAL VIOLETA**
  - Solución matriz de cristal violeta..... 10.0 mL
  - Agua destilada..... 300.0 mL
  - Acido clorhídrico, concentrado..... 1.0 mL
- **"APATHY'S" MEDIO DE MONTAR**
  - Azúcar de caña (sucrosa)..... 50.0 g
  - Acacia (goma arábica)..... 50.0 g.
  - Agua destilada..... 150.0 ml.
  - Cloruro de sodio..... 10.0 g.
  - Timol..... 0.1 g

PROCEDIMIENTO:

Desparafinar e hidratar hasta llegar al agua destilada.
Teñir con la solución diaria de cristal violeta durante 5 minutos.
Lavar con agua corriente durante 15 minutos.
Montar con medio acuoso tal como el medio de "Apathy" o bien secar las secciones a temperatura ambiente durante 5 minutos o mas, sumergir la lamina en xileno y montar con un medio resinoso.
Examinar sin demorar pues la tinción tiende a decolorar.

RESULTADOS:

Amiloide ioleta o púrpura., Otros elementos de tejidos azul.



HOSPITAL NACIONAL DOCENTE
MADRE NIÑO
SAN BARTOLOME
Ministerio de Salud

"PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS"

DEL

ÁREA DE CITOLOGIA

2013

UNIDAD DE CITOLOGIA
PROCESAMIENTO DE ESPECIMENES CITOLOGICOS

INTRODUCCIÓN
La citología es la técnica, el arte y ciencia del estudio de las células del cuerpo humano, obtenidas mediante raspado, aspirados, cepillados, de líquidos corporales, de secreciones, improntas o biopsia punción aspiración BAAF.

El origen de la Citología está ligada a dos grandes creaciones, el microscopio por Hans Janssen en 1600 y el concepto de célula que se inició con Robert Hooke en 1665.
Ya en el siglo XIX se habían reportado el reconocimiento de células neoplásicas en observaciones citológicas como las de Donalson en 1853, Lionel Beale en 1854 y 1861, Lambl en 1856 y otros.

La aplicación más exitosa de la citología se dio en el diagnóstico del cáncer, principalmente del cáncer de cuello uterino y el artífice de esto fue George Papanicolaou, cuyo gran mérito fue haber creado una técnica de diagnóstico con métodos de toma de muestra, fijación en fresco, tinción y una nomenclatura de los diferentes grados de alteración cito-oncológica, dando así comienzo a la Citología Clínica moderna. Debemos enfatizar que Papanicolaou con su clasificación pone de manifiesto su concepción de que el cáncer de cuello uterino es un continuo evolutivo, y es esta evidencia científica la que nos permite centrar nuestro trabajo en la consideración de la PREVENCION DEL CANCER CERVICOUTERINO. Este conocimiento ha producido gran impacto a nivel mundial que revolucionó desde la patología la prevención en Salud Pública de Prevención del cáncer.

El sistema y nomenclatura del reporte ha variado desde, la Citología tipo I, II, III, IV y V de Papanicolaou y las diversas denominaciones para las lesiones pre-cancerosas como las Reagan con las denominadas Displasias leve, moderada, severa y carcinoma in situ y los NICs de Richard NIC1, NIC2 y NIC3 hasta la de Bethesda con las Lesiones Intraepiteliales (LEI) de Bajo Grado, LEI de Alto Grado.

Nosotros usamos el Sistema Bethesda para el reporte de la Citología cérvico uterina.

La unidad de Citología del Servicio de Anatomía Patológica presenta dos áreas:
1.- Area de Citología Ginecológica: que procesa las muestras del frotis cérvico uterino para la detección de las lesiones precancerosas y el cáncer de cuello uterino
2.- Area de Citología Especial: que procesa las muestras citológicas de secreciones, líquidos corporales normales o patológicos diversos y aquellas obtenidas por BAAF para diversos estudios

CONSIDERACIONES GENERALES

Los especimenes citológicos o muestras que procesamos en esta unidad se obtienen mediante las denominadas raspado, aspiración, secreciones, líquidos normales o patológicos, improntas. Este procesamiento conduce a la formulación del diagnóstico citológico que es otra de las actividades principales del Servicio de Anatomía Patológica

La responsabilidad laboral se designará o señalará según el nivel del proceso

En todo el proceso el personal usará guantes, mascarilla y ropa de laboratorio como medida de bioseguridad

CITOLOGIA CERVICO-UTERINA
PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DEL CÁNCER CERVICAL

1.-OBJETIVO :

Establecer el procedimiento normativo a usarse en el diagnóstico de cáncer en muestras cérvico uterinas, utilizando la técnica del Papanicolaou para el procesamiento de la muestra y el Sistema Bethesda para el reporte del diagnóstico como nomenclatura estandarizada, a fin de entregar los resultados de alta calidad y de forma oportuna.

Procedimiento

Las muestras que ingresan al área de Citología siguen el siguiente procedimiento:

1.- Recepción e Identificación de la muestra
2.- Registro y Base de Datos de los casos
3.- Procesamiento técnico
4.- Tamizaje, Diagnóstico y Reporte Citológico:
5.- Digitación
6.- Entrega de resultados
7.- Archivo y Estadística

En todo el proceso el personal usará guantes, mascarilla y ropa de laboratorio como medida de bioseguridad

1.-RECEPCIÓN, IDENTIFICACIÓN

Responsable: Técnico de laboratorio.

Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente lleguen las muestras al Servicio de Anatomía patológica

MATERIALES:

a. Formato de solicitud de examen citológico y reporte (Anexo N°)
b. Ticket de pago, u hoja del SIS, u hoja del Servicio Social
c. Numerador
d. Lámina con la muestra
e. Lapiceros azul y rojo
f. Canastillas portaláminas

Se verifica el estado de la muestra que corresponda a la paciente, la integridad de la lámina y la ficha de solicitud del examen (según formato) que debe contener los siguientes datos: nombres y apellidos, edad, N° de historia clínica, fecha de última regla, N° de gestación, paridad, si es gestante o no, si usa Anticonceptivos y el tipo, PAP o biopsia anterior, síntomas, examen cérvico uterino, diagnóstico Clínico, fecha y firma (Anexo N° ...). Se verifica el pago correspondiente con el código 090101

2. REGISTRO DE CASOS

Responsable: Técnico de laboratorio
Digitador o secretaria

Tiempo de ejecución, inmediatamente se reciba las muestras

MATERIALES

a. Libro de Registro de casos
b. Lapicero
c. Computadora

Procedimiento

Se asigna un número correlativo que identifica la muestra de la paciente, el cual debe inscribirse en:

- La ficha de solicitud del examen, realizado por el técnico con el numerador
- La lámina que contiene la muestra, realizado por el técnico con el lápiz cristalográfico
- La base de datos por el digitador, que posteriormente la imprimirá para elaborar el registro físico de pacientes
- La facturación en el caso de las muestras de los convenios en el SIGHOS

Ministerio de Salud
Oficina de Gestión de la Calidad

Las láminas se disponen en canastillas en forma ordenada secuencialmente y se entregan al responsable del procesamiento técnico para su posterior coloración.
Las fichas son entregadas al digitador para la elaboración de la base de datos y el registro físico de casos. Este registro consignará: fecha de ingreso, N° de la muestra, Apellidos y nombres de la paciente, N° de historia clínica si son pacientes del HONADOMANI San Bartolomé o la procedencia de las Redes de los convenios, diagnóstico final. (Anexo N°...); cuando se concluya una hoja se realizará su impresión y se entregará al Técnico

3.- PROCESAMIENTO TECNICO

Responsables:

- Preparación de reactivos: Tecnólogo Médico
- Coloración y montaje: Técnico de laboratorio.

Control de calidad: Tecnólogo médico
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente concluya la inscripción en la lámina del número de identificación de la muestra y su colocación en la canastilla portalámina

El procesamiento técnico consta de :

A) Coloración
B) Montaje
C) Entrega a los tecnólogos médicos para su lectura

A).-COLORACION DE PAPANICOLAOU

La coloración del Papanicolaou es un método basado en la diferenciación por el color de los diversos componentes celulares. Los núcleos son coloreados con la Hematoxilina de Harris (coloración básica) y el citoplasma con el EA-36, colorante de naturaleza alcohólica y policromática. La queratina citoplasmática cuando está presente se colorea con el Orange G. El ácido Fosfotúngstico presente en la solución del EA-36, se usa como mordiente.

Materiales:

a. Mesa para las cubetas de tinción
b. Lavadero
c. 19 cubetas de tinción con capacidad para 60 láminas, de acero inoxidable o vidrio con tapa (202 x 85 x 75mm)
d. 6 canastillas para tinción de 60 láminas, de acero inoxidable
e. Papel filtro N° 4 , por pliegos
f. Bandejas para colocar las láminas portaobjeto
g. Probeta de vidrio pyrex de 1000 mL
h. Probeta de vidrio pyrex de 100 mL
i. Matraz de vidrio pyrex de 2000 mL
j. Becker de vidrio pirex de 200 mL
k. 06 frascos de vidrio color oscuro para almacenamiento (3000 mL - 4000 mL)
l. Gasa para montar y limpiar las láminas
m. Balanza digital
n. Papel para pesar
o. Cronómetro, reloj con alarma
p. Espátula de metal para manipular reactivos

Este procedimiento cuenta con colorantes principales o compuestos, que deben prepararse antes de usarlos en la llamada batería de coloración de Papanicolaou; éstas son la Hematoxilina de Harris, el Orange G y el EA - 36. Además de los colorantes compuestos existen otros reactivos que también deben ser preparados previamente para su uso, como son la solución agua-acida y agua amoniacal

Ministerio de Salud
Oficina de Gestión de la Calidad

Reactivos:

a) Hematoxilina de Harris
b) Orange G
c) EA36
d) Agua destilada
e) Alcohol corriente al 96%
f) Alcohol absoluto 100%
g) Acido clorhídrico
h) Amoniaco
i) Xilol

HEMATOXILINA DE HARRIS

Componentes y Proporciones

Hematoxilina en cristales	5 g.
Sulfato de alumbre y potasio	100 g.
Oxido de mercurio (amarillo)	2.5 g.
Alcohol absoluto	50 cc.
Agua destilada c.s.p.	1 lt.
Acido acético glacial	40 cc.

Preparacion:

1. Disolver los 5 g de hematoxilina en el alcohol absoluto.
2. Colocar en un balón el agua destilada y llevar a fuego hasta que salgan burbujas, retirar del fuego y se agrega el sulfato de aluminio y potasio y agitarlo hasta que se disuelva.
3. Agregar la solución de hematoxilina, se mezcla con movimientos rotatorios, se coloca al fuego hasta que empiece a burbujear y se retira del fuego.
4. Agregar lentamente el óxido rojo de mercurio y mezclar por rotación. Si se obtiene una coloración púrpura intenso, la solución está madura; sino prolongar la ebullición por 1 a 3 minutos más después de añadir el óxido de mercurio.
5. Se enfría totalmente y se agrega el ácido acético.
6. Se guarda en frasco oscuro, se deja hasta el dia siguiente y se filtra para su uso. El preparado es estable por 06 meses hasta un año.

Fundamento:

Se usa para teñir el núcleo , membrana nuclear y la cromatina; éstos se tiñen de color azul oscuro o rojizo púrpura y el nucléolo de color rojo rosado.

La Hematoxilina de Harris es fácil de preparar y envejece rápidamente, por lo que se puede usar inmediatamente preparado.

ORANGE G

Componentes y Proporciones

Orange G-6	5 g
Alcohol etílico absoluto	1000 ml
Ácido fosfotúngstico	0, 15 g

Preparacion:

1. Preparar 50 ml de solución de Orange G al 10% (5 g de orange G en 50 mL de agua destilada). Dejar reposar al menos 5 dias
2. En un matraz de vidrio, Verter estos 50ml de Orange G en 950 ml de alcohol absoluto
3. Añadir los 0.15 g del ácido fosfotúngstico remover hasta que se disuelva.
4. No se calienta, se guarda en frasco oscuro y bien taponado.

Fundamento:

El Orange G y la solución EA36 se usa para teñir el citoplasma. Ambas son coloraciones alcohólicas y el alcohol hace transparente el citoplasma. Con el Orange G, el citoplasma de las células superficiales se tiñe de un color naranja precioso, que contrasta con un núcleo hipercromático, que se tiñe de un color rojizo púrpura oscura con la hematoxilina.

El Orange G también tiñe el citoplasma que contiene queratina de color naranja o amarillo.

Tiempo de Conservación.- Variable según las condiciones de almacenamiento.

Oficina de Gestión de la Calidad

EA – 36

Componentes y Proporciones : Está compuesto por componentes y soluciones madres, las cuales deberán mezclarse por separado en proporciones definidas.

SOLUCION "A"

Eosina	2,25 g
Alcohol etílico absoluto	450 ml

SOLICION "B"

Pardo de Bismark	0,5 g
Alcohol etílico absoluto	100 ml

SOLUCION "C"

Light Green	2,25 g
Alcohol etílico absoluto	450 ml

SOLUCION "D"

Ácido fosfotúngstico	2 g
Agua destilada	10 ml

SOLUCION "E"

Carbonato de litio	20 gotas

Solución acuosa sobresaturada.

Preparacion de las Soluciones:

A. La eosina se disuelve en alcohol etílico absoluto al 0,5 %.
B. El Pardo de Bismark se disuelve en alcohol etílico absoluto al 0,5 %.
C. El Light Green se disuelve en alcohol absoluto al 0,5 %.
D. El ácido fosfotúngstico se disuelve en el agua
E. La solución sobresaturada de carbonato de litio se prepara con aproximadamente el 1,33% a 20° C. por lo menos se debe poner 0,2 g en 10 ml de agua destilada a temperatura normal, agitarlo bien, tomar el líquido sobrenadante una vez que haya sedimento el carbonato de litio y filtrar antes de usar.

SOLUCION DE TRABAJO DEL EA 36 para 1000 ml aproximadamente:

SOLUCION "A"	450 ml
SOLUCION "B"	100 ml
SOLUCION "C"	450 ml
SOLUCION "D"	10 ml
SOLUCION "E"	20 gotas.

Mezclar bien las diferentes soluciones y almacenarlo en frasco oscuro y bien cerrado.

Fundamento:

El EA-36 tiñe el citoplasma de dos colores eosinófilo o basófilo. El citoplasma eosinófilo se tiñe con la eosina, toma el color rosa a naranja, pasando por diversas tonalidades y el citoplasma basófilo se tiñe con el Light Green adoptando coloraciones de azul pálido al verde.

La coloración varía si la muestra está seca, según el pH de la secreción o si la muestra es demasiado gruesa o muy delgada

Estas proporciones permiten colorear mínimamente 1000 láminas y no debe almacenarse más de 6 meses

BATERIA DE COLORACION -

Se dispone los reactivos en cubetas de acero quirúrgico de forma secuencial y se colorean las láminas en tiempos cronometrados

1°.	Alcohol corriente96"	10 minutos
2°.	Agua corriente (de caño)	5 minutos
3°.	Hematoxilina de Harris	1 a 2 minutos
4°.	Agua corriente (de caño)	5 minutos
5°.	Agua Acida	1 minuto
6°	Agua de caño	2 minutos

Ministerio de Salud
Oficina de Gestión de la Calidad

7°.	Agua amoniacal	30 segundos
8°.	Agua de caño	2 minutos
9°.	Alcohol corriente 96°	2 minutos
10°.	Orange G	2 a 5 minutos
11°.	Alcohol corriente	2 minutos
12°.	EA36	2 minutos
13°.	Alcohol corriente	2 minutos
14°.	Alcohol corriente	2 minutos
15°.	Alcohol absoluto	2 minutos
16°.	Alcohol absoluto	2 minutos
17°.	Secar al medio ambiente	2 minutos
18°.	Xilol	2 minutos
19°.	Xilol	2 minutos

PROCEDIMIENTO DE COLORACION
El procedimiento se realiza sumergiendo la canastilla que contiene las láminas en las diversas cubetas de la batería de coloración según protocolo, agitándola numerosas veces en cada cubeta.
Si las muestras vienen fijadas con laca, se corregirán dejándolas en alcohol corriente hasta que ésta se elimine, generalmente unas 24 horas como máximo

Previamente se debe verificar la fecha de vencimiento de las sustancias y reactivos a utilizar.
Asimismo se debe verificar la adecuada preparación de acuerdo a las instrucciones
Se filtrará diariamente los colorantes.
Se usará hoja de control diario del tiempo de uso de los reactivos de la batería (Anexo N°...)

Resultados de Tinción
En los núcleos la cromatina y la membrana nuclear toman el color azul oscuro o púrpura mientras que el nucléolo obtiene un color rojo, rosado o naranja.
El citoplasma adopta el color amarillo o naranja, si hay presencia de queratina; caso contrario varía de verde, azul o gris.

B) MONTAJE

Responsable: Técnico de laboratorio.
Resina sintética para montar los extendidos. (Entellan),
Para el montaje sobre la lámina portaobjeto, aún húmeda, usar una a dos gotas de Entellan y cubrir con laminilla previo secado de la lámina portaobjeto.

C) ENTREGA DE LAMINAS

Responsable: Técnico de laboratorio.
Tiempo de Ejecución.- se realizará inmediatamente concluya el procesamiento técnico. Se registrará en el cuaderno de control la serie de láminas que se entrega, el nombre del profesional a quien se entrega las muestras y la fecha

Materiales
- Portaláminas
- Cuaderno de Registro
- Lapiceros

4. TAMIZAJE, DIAGNOSTICO CITOLOGICO Y REPORTE DE RESULTADOS

Responsables: Tecnólogo Médico y Médico Patólogo
El tamizaje en Citología es la evaluación microscópica masiva de las muestras citológicas tomadas en una población aparentemente sana con mayor riesgo de tener una lesión oncológica del cuello uterino. La responsabilidad es del Tecnólogo Médico y Médico Patólogo

El diagnóstico Citológico de las lesiones pre-cancerosas y cancerosas es de responsabilidad del médico patólogo

Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente se reciba las láminas dentro del horario de trabajo

Materiales

- Lámina con extendido coloreado por el método de Papanicolaou.
- Microscopio binocular con objetivos de 10x, 20x, 40x y 100x.
- Hojas de resultados, según formato (Anexo N° .....)
- Fechador
- Sello de Muestra Insuficiente
- Sello de NEGATIVO

Lectura y Control

- El tamizaje microcópicola realizan los tecnólogos médicos y los médicos patólogos
- Se realiza según técnicas estandarizadas
- Los resultados negativos o las Muestras Insatisfactorias realizados por los tecnólogos médicos serán emitidos con fecha, sello y firma
- Las muestras leídas por los tecnólogos médicos que presentan alteraciones citológicas serán entregadas a los médicos patólogos para su informe final, previa firma y fecha colocada en el reporte.
- Las láminas que se entregan al patólogo se hará previo registro en el cuaderno de CARGO del Número de la lámina y la fecha
- El médico patólogo asignado, diariamente solicitará que se le entregue las láminas de control y devolverán los resultados luego de concluida su tarea o máximo al día siguiente de haber recibido las muestras.
- El médico patólogo llevará el control de las muestras anotando la fecha en que las devuelve en sus cuadernos de cargos respectivos.
- El 10% de los muestras con resultado negativo serán evaluados por los médicos patólogos, como Control de calidad.
- Los resultados serán inscritos en el registro de casos con tinta azul los negativos y con tinta roja los positivos y las Muestras insatisfactorias.
- Los informes serán entregados a secretaría para su digitación inmediata en el SIHGOS

Diagnóstico y Reporte

Para el reporte de las muestras citológicas cérvico - uterinas usamos como nomenclatura el Sistema Bethesda 2001 (Anexo N° .....)

SISTEMA DE BETHESDA

El reporte del diagnóstico citológico para cáncer cervico uterino es el siguiente: (Anexo N°)

A. **Calidad del espécimen**
    1. Satisfactoria para evaluación, con o sin células endocervicales
    2. Insatisfactoria para evaluación por:
        i. Escasa celularidad,
        ii. Leucocitos > 75%,
        iii. hematíes >75%,
        iv. mala fijación,
        v. mal procesamiento técnico y
        vi. datos clínicos incompletos
B. Negativo para lesión intraepitelial y/o malignidad... o
C. Presencia de Alteraciones celulares
    1 Anormalidades de células epiteliales Escamosas
        I. Células escamosas atípicas: ASC-US o ASC-H
        ii. Lesión de Bajo grado:
            a. Lesiones por PVH
            b. NIC 1
        iii. Lesión de Alto Grado

a. NIC 2
b. NIC3: Displasia Severa o Carcinoma in situ

iv. Carcinoma Escamoso

1. Anormalidades de células epiteliales Glandulares
   i. AGUS
   ii. Adenocarcinoma in situ
   iii. Adenocarcinoma

C. Cambios benignos: elementos infecciosos (trichomonas, candida, vaginosis, herpes), por DIU

D. Observaciones

Debemos recordar que un diagnóstico citológico de calidad se basa en tres factores importantes: a)obtener una muestra satisfactoria, b)realizar un correcto procesamiento técnico y 3)experticia en la lectura citológica.

5.- DIGITACION DE RESULTADOS

Responsable: Digitador y secretaría
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente concluya el procesamiento diagnóstico dentro de la jornada de trabajo
Los resultados serán inscritos en el libro de registro de casos
Los resultados también serán digitados en el sistema informático hospitalario SIGHOS
Los Resultados Negativos serán emitidos en el Formato impreso que viene con la hoja de solicitud
Los Resultados Positivos serán impresos y emitidos conjuntamente con el formato inicial

6.- ENTREGA DE RESULTADOS

Responsable: Técnico de laboratorio
Los exámenes del HONADOMANI San Bartolomé serán entregados al Archivo de historias clínicas con un listado de CARGO que contenga
1) Número de exámenes entregados,
2) El N° del Examen
3)Número de la historia clínica correspondiente
4) Fecha de entrega
5)Persona que realizó el trabajo de digitación
La Entrega de los exámenes de los convenios se entregaran debidamente identificados siguiendo el orden correlativo y la persona que recibe dichos resultados en el libro de cargo, anotando en el recuadro correspondiente (Anexo N°)

7.- ARCHIVO Y ESTADISTICA

ARCHIVO

Responsable: Técnico de laboratorio
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente concluya el diagnóstico final

Existen los archivos siguientes:
a) Archivos de láminas positivas se archivan por siempre
b) Archivos de láminas negativas se archivan por 3 años
c) El Registro de pacientes por 10 años

ESTADÍSTICA

Responsable: Tecnólogos Médicos y secretaria
Tiempo de Ejecución: se realizará dentro del mes correspondiente

Se realizarán las siguientes estadísticas:
a) Numero Total de Producción
b) Número de Citologías del hospital
c) Número de Citologías de Referencias (Centros de salud, campañas, otros)

Ministerio de Salud
Oficina de Gestión de la Calidad

d) Casuística Por diagnóstico que incluye: N° de citología, Nombres de la Paciente, N° de H.C. Edad, Paridad, estado de gestación

DOCUMENTOS DE GESTION

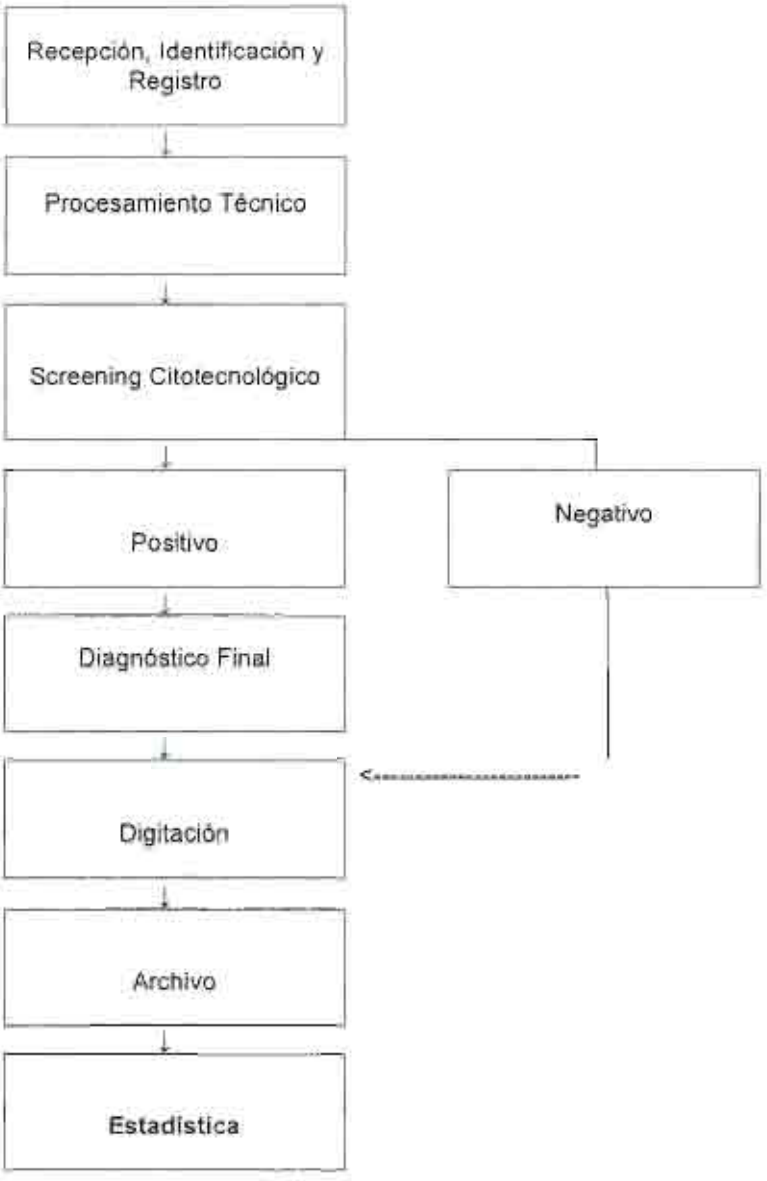
1. Libro de Registro de Pacientes
2. Formatos
3. Registro de Cargos de láminas
4. Registro de cargos de casos de consulta a los médicos
5. Registro de control de Materiales y reactivos
6. Registro de citologías positivas y muestras insuficientes
7. Registro de entrega de resultados a convenio

BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández-Cid A., López A. Citopatología Ginecológica y Mamaria. 2° Edición. Masson-Salvat
2. Takahashi M. Citología del Cáncer. Atlas color. Segunda edición. Ed Panamericana
3. Bibbo M. Comprehensive Cytopathology. Saunder editores. Second edition
4. Atkinson B, Silverman J. Atlas de dificultades diagnósticas en Citopatología. Harcourt Editores. 1° edición
5. Trucco C. Boletín de la Escuela de Medicina 1998. 28; 2. htt:/ escuela.med.tuc.cl/publ/boletín /patlprostata/tamizaje.html
6. Armed Forces Institutte of Pathology. Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology. Ulrika V. Mikel Editor
7. Solomon D, Nayar R. Thew Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Secon Edition
8. Romero N. Reseña histórica de la Citopatología y los Orígenes del Papanicolaou. Anales de la Facultad de Medicina. 2001. 62:4; 342-346

Oficina de Gestión de la Calidad

9. FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE CITOLOGIA GINECOLOGICA



CITOLOGIA ESPECIAL

El Area de Citología Especial procesa muestra citológicas diversas para el diagnóstico de diferentes patologías en frecuencia el hallazgo de células neoplásicas, búsquedas de microorganismos etc. Las muestras pueden ser de:

1. Líquidos normales: orina, liquido céfalo raquídeo, etc
2. Líquidos patológicos: ascítico, hidrotórax etc.
3. Secreciones,
4. Aspirados, Cepillados bronquiales
5. Biopsias punción –aspiración (BAAF) de mama, tiroides, mama etc

Asi mismo realizamos el examen de Urocitograma y de Ruptura Prematura de Membranas

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CITOLÓGICAS DE LÍQUIDOS NORMALES O PATOLÓGICOS Y SECRECIONES

Las muestras que ingresan siguen un procedimiento diferente al de la citología Ginecológica así:

1.- Recepción e Identificación de la muestra y Registro
2.- Preparación de la muestra
3.- Procesamiento técnico
4 - Diagnóstico citológico
5.- Reporte
6.- Digitación y Entrega de resultados
7.- Archivo y Estadistica

1.- RECEPCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y REGISTRO DE LA MUESTRA.-
Responsable: Técnico de laboratorio
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente llegue la muestra al Servicio

MATERIALES:

a) Libro de registro
b) Formato de solicitud

Se procederá anotar los datos en el libro respectivo. La muestra se mide en ml, se describe sus característica de color, densidad etc.

2.- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA
Responsable: Técnico de laboratorio
INSTRUMENTAL, MATERIALES Y REACTIVOS:

a) Centrifuga
b) Tubos cónicos de 15ml
c) Láminas
d) Pipetas
e) Kopling de vidrio
f) Alcohol de 96°

Procedimiento.- La muestra se incorpora en el tubo para centrifugar a 4,000 rpm por 10 minutos aproximadamente; luego de centrifugada la muestra, se elimina el sobrenadante, con la pipeta se aspira y luego se coloca la muestra en una lámina portaobjetos, se hace el extendido y rápidamente se fija en alcohol de 96°.

3.- PROCESAMIENTO TÉCNICO
Responsable: Técnico de laboratorio
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente concluya el registro

Se procede a igual que la muestra de citología ginecológica o sea mediante la técnica del Papanicolaou
En relación a muestras con gran contenido de sedimento, luego de la realización de dos láminas como mínimo para la coloración de Papanicolaou, se procederá a procesar para el Block – cell y se

procesará como si fuera una biopsia, para lo cual se enviará al área de patología Quirúrgica para su procesamiento
Se entregará las láminas procesadas al médico patólogo on un registro de cargo que consigne fecha, N° de caso y número de láminas por cada caso
4.- DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO Y REPORTE
Responsable: Médico patólogo
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente se reciba las láminas

El reporte tomará en cuenta en primer lugar lo solicitado por el médico tratante. Si se encontrara elementos celulares que expresaran un diagnóstico diferente al diagnóstico clínico se procederá a describirlo y reportarlo como diagnóstico citológico según la convención internacional

5.- DIGITACIÓN Y ENTREGA DE RESULTADOS
Responsable: digitador
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente concluya el diagnóstico y sea entregado por el médico patólogo

Se ingresará el resultado al sistema informático hospitalario
6.- ARCHIVO Y ESTADÍSTICA
Responsable: Secretaria
Tiempo de Ejecución: se realizará mensualmente

PROCESAMIENTO DEL UROCITOGRAMA

Recepción, Identificación, registro de la muestra y procesamiento técnico
Responsable: técnico
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente llegue la muestra al servicio

Se procederá a igual que la Citología de líquidos y secreciones en los puntos de la Recepción, Identificación y Registro de la muestra; la preparación de la muestra y el Procesamiento técnico se procederá igual a la de líquidos y secreciones
REPORTE Y DIAGNOSTICO
Responsable: médico patólogo
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente sea entregadas las láminas
En lo referente al Reporte y Diagnóstico se utilizará el protocolo (Anexo N° ....), se procederá a determinar las características celulares de la muestra haciendo la lectura microscópica y el recuento de por lo menos 200 células y deberá anotarse lo siguiente:

- Tipo Celular
- Indice Cariopicnótico
- Indice Eosinofilico
- Indice de Maduración
- Indice de Plegamiento
- Indice de Formación de Placas
- Flora bacteriana
- Leucocitos
- Fondo

El Diagnóstico deberá incluir si existe o no Estímulo Estrogénico en relación a la edad de la paciente, estímulo progesterónico y Estimulo androgénico.

La Digitación y Entrega de resultados y el Archivo y Estadistica se procederá a igual que el procedimiento de liquidos
Responsable: digitador
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente concluya el diagnóstico y sea entregado por el médico patólogo

En el caso del Examen de Ruptura Prematura de membrana se realizará según ficha impresa

HOSPITAL NACIONAL DOCENTE
MADRE NIÑO
SAN BARTOLOME
Ministerio de Salud

"PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS

DEL

UNIDAD DE CITOGENETICA"

2013

Oficina de Gestión de la Calidad

UNIDAD DE CITOGENETICA

CONSIDERACIONES GENERALES

Los especimenes o muestras que procesamos en esta unidad se obtienen de la sangre, médula osea, liquido amniótica y tejidos diversos como vellosidades coriales, mediante técnicas pertinentes.

Este procesamiento de las muestras conduce a la formulación del diagnóstico citogenético que es otra de las actividades principales del Servicio de Anatomia Patológica

La responsabilidad laboral se designará o señalará según el nivel del proceso

En todo el proceso el personal usará guantes, mascarilla y ropa de laboratorio como medida de bioseguridad

CONSIDERACIONES ESPECIFICAS

CARIOTIPO EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA

INTRODUCCIÓN

Gregor Mendel en 1866 publica sus célebres principios sobre la herencia, Johanssen en 1906 acuña el término de gen como unidad básica de la herencia; Averson en 1944 descubre que el gen está formado por ADN; JH Tjio y A. Levan en 1956 determinaron el número 46 de cromosomas en el hombre; Casperson y cols en 1970 sentaron las bases del bandeo cromosómico habiendo sido los pioneros en aplicar en los cromosomas humanos una técnica que consistia en usar la Mostaza de Quinacrina que teñia a los cromosomas con un patrón de bandas claras y oscuras (Bandas Q) cuya disposición era idéntica en los dos cromosomas del mismo par, esto fue un gran avance ya que permitía detectar si esas bandas claras y oscuras estaban o no en número y posición correctas. Dutrillaux y Lejeune en 1971, presentaron las Bandas R (bandas reverse), cuyo patrón de bandas era invertido con respecto al de las bandas Q y se obtenían gracias a un pretratamiento con calor y tinción con Giemsa. Simultaneamente, Arrighi y Hsu presentan las Bandas C, correspondiente a la heterocromatina centromérica. Estas se obtenían en los cromosomas tras ciertos tratamientos que desnaturalizan el ADN, seguidos de tinción con Giemsa, con lo cual se obtenía una intensa coloración en la región centromérica. Esta tinción se debe a la existencia de un ADN satélite en esa región, que está compuesta por secuencias de nucleótidos muy repetitivos y que se renaturalizan rápidamente. También se colorean las constricciones secundarias de los cromosomas 1, 9, y 16 y el segmento distal del cromosoma Y.

El cariotipo es la constitución cromosómica de un individuo; una fotomicrografía de los cromosomas individualizados y ordenados de forma estandarizada (Muller 2001)

PROCEDIMIENTO

Para el examen de cariotipo se siguen diferentes pasos que los describimos a continuación:

1. Solicitud de Examen
2. Entrevista
3. Toma de Muestra
4. Procedimiento Técnico
5. Lectura
6. Lectura con el Cariotipador
7. Reporte: Nomenclatura International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2009
8. Diagnostico
9. Entrega de Informe
10. Archivo (Lamina, Estadístico, por Pacientes, por Diagnostico, de Iconografía).

1.-SOLICITUD DE EXAMEN

Responsable: técnico, tecnólogo médico o biólogo

Se anotará en el Libro de Registro si es paciente del hospital o de otra institución

2.- ENTREVISTA AL PACIENTE

Responsable: médico patólogo

Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente

La entrevista es un poderoso instrumento para el diagnóstico ya que proporciona la información directa que permitirá realizar el análisis correspondiente y el diagnostico respectivo en el aspecto citogenético. La entrevista debe contener los siguientes datos mínimos:

a. Nombre del paciente,
b. Edad
c. Lugar de Nacimiento
d. Ocupación
e. Motivo del Examen: Fascie dismórfica, Infertilidad, abortos, antecedentes de Mortinatos , hijos con Malformaciones, alteraciones del desarrollo del crecimiento, disfunciones menstruales, alteraciones en el Espermatograma, otras.
f. Edad de los padres
g. Elaboración del árbol genealógico
h. Peso al nacer, forma de nacimiento
i. Antecedentes familiares, antecedentes patológicos
j. Examen clínico
k. Exámenes de laboratorio

Ver formato (anexo N°)

Procedimiento

Anotar en el libro respectivo:

a. Nombres, N° de examen citogenético y datos de la entrevista personal
b. Iconografía, previa autorización del paciente
c. Anotar impresión diagnostica

3.- TOMA DE MUESTRA

Responsable: técnico de laboratorio, tecnólogo médico o biólogo

Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente se tenga la solicitud del examen

Materiales

a. Jeringa de 5 ml O 3 ml
b. Aguja de 22G (Neonatos) y 20G x 25 ml (niños).
c. Heparina Sódica estéril. No usar EDTA ni citrato de sodio
d. Ligadura.
e. Algodón estéril.
f. Alcohol de 96°

RECOMENDACIONES PREVIAS

Para el estudio de cariotipos, dado que se debe realizar cultivos celulares in Vitro con medios enriquecidos con factores de crecimiento, suero fetal bovino y aminoácidos, se hace totalmente indispensable que la muestra sea tomada con absoluta esterilidad por lo cual se hacen las siguientes recomendaciones:

- El anticoagulante aceptado mundialmente es la Heparina, pues esta quela o quita iones calcio para que no se coagule la sangre.
- No usar el EDTA como anticoagulante debido a que esta sustancia quela los iones calcio necesarios para el crecimiento celular, los cuales no podrán ser repuestos. Tampoco usar citrato de sodio, ni otros anticoagulantes
- La jeringa en que se toma la muestra debe haber sido impregnada previamente con Heparina de la siguiente manera; tome un frasco que contenga heparina sódica estéril, succione 0.2ml de Heparina y dispersarla homogéneamente por toda la superficie interna de la jeringa.
- Tomar la muestra por veno puntura. Para la extracción de sangre en neonatos utilizar aguja 22G en niños y en adultos 20G. extraer 3ml en paciente neonatal, 5ml en paciente pediátrico y adulto, si la sangre tomada es muy poca, por ejemplo 1ml, tenga en cuenta que

la relación anticoagulante – sangre será excesiva y esto va inferir en el crecimiento celular in Vitro y por lo tanto, en la calidad de cromosomas obtenidos. En el caso de pacientes hospitalizados consultar al médico tratante si suministra antibióticos u otros medicamentos que pueden interferir en el crecimiento celular.

- No retirar la aguja de la jeringa que contiene la muestra, debe permanecer con la aguja y ésta ser cubierta con su capuchón, para evitar su contaminación. La aguja se debe cubrir con el capuchón y este debe ser asegurado con cinta de enmascarar o esparadrapo para que la aguja se mantenga unida durante el transporte. Aconsejamos también cubrir el embolo de la jeringa.
- No es necesario estar en ayunas para la toma de muestra

Procedimiento:

a. Preparar el material (jeringa con heparina, aguja estéril, algodón, ligadura).
b. Identificar al paciente o niño (explicar a la madre el procedimiento que vamos a realizar, también podemos hablar con el niño adaptando nuestras explicaciones a su edad y nivel de comprensión).
c. Lavado de manos con agua y jabón.
d. Colocarse los guantes desechables.
e. Colocar cómodamente al paciente e inmovilizar.
f. Colocar compresor por encima del sitio de punción, para producir ingurgitación de la vena.
g. Seleccionar la vena mediante el tacto, así determinaremos la profundidad, calibre, elasticidad, etc. También se puede localizar la vena por inspección (color azulado). Abrir y cerrar el puño, en niños mayores, puede ayudar a distender las venas de los miembros superiores.
h. Desinfectar el punto de punción con torundas impregnadas de alcohol de 70°.
i. Pinchar la piel y posteriormente la vena en dirección contraria al flujo sanguíneo, con un ángulo entre 15° y 30° respecto a la piel, con el bisel de la aguja hacia arriba.
j. Soltar el compresor cuando refluya la sangre.
k. Sacar la aguja y aplicar presión suave hasta lograr hemostasia.
l. Colocar apósito en el sitio de punción.
m. Rotular la jeringa con la muestra, señalando los datos que ayuden a su identificación (nombre, fecha y hora de extracción).

4.- PROCESAMIENTO TECNICO

Responsable: biólogo, Tecnólogo Médico

Para su descripción la dividiremos en varios pasos:

a) Siembra
b) Cosecha
c) Preparación de Lámina
d) Coloración o Bandeo

a) SIEMBRA DE MUESTRA

EQUIPOS

i. Estufa
ii Mechero
iii Centrífuga

MATERIALES

i Sangre Periférica
ii Tubo cónico de 15 ml

REACTIVOS

iMedio de Cultivo

PROCEDIMIENTO

i. Luego de extraer la sangre periférica, dejar sedimentar el paquete globular aproximadamente 30 minutos colocando la jeringa en forma vertical con la aguja hacia abajo. Descartar un poco del paquete globular.

ii. En un tubo cónico graduado que contiene 5 ml de medio de cultivo, agregar 10-15 gotas de la sangre homogenizada de la jeringa.
iii. Agitar suavemente el tubo para homogenizar la muestra
iv. Rotular el tubo indicando el N° de muestra, el día y hora de siembra.
v. Guardar el tubo en la incubadora a 37°C de forma inclinada para obtener mayor superficie de proliferación celular, por 72 horas aproximadamente.

b) **COSECHA**

EQUIPOS

i. Estufa
ii. Centrifuga

MATERIALES

i. Pipeta Pasteur estéril
ii. Láminas portaobjetos
iii. Mechero
iv. Pinza
v. Lápiz con punta de diamante para marcar vidrio
vi. Gradilla para tubos

REACTIVOS:

i. Colchicina
ii. Carnoy: proporciones iguales de Metanol y Ácido acético, por muestra se utiliza 16 ml
iii. Cloruro de potasio en solución hipotónica al 0.075 molar

PROCEDIMIENTO

i. Cumplidas las 72 horas se saca el tubo de cultivo de la estufa, se agrega 55 ul de colchicina y mezclar suavemente.
ii. Incubar a 37°C por 20 minutos.
iii. Centrifugar los tubos de siembra a 2500 rpm por 12 minutos.
iv. Descartar el sobrenadante con una pipeta Pasteur.
v. Agregar al tubo que contiene el sedimento la solución hipotónica de cloruro de potasio hasta completar 6 ml y mezclar agitando el líquido con la pipeta.
vi. Incubar a 37° C durante 15 minutos.
vii. Agregar 0.4 ml de CARNOY (refrigerado) y homogenizar con la pipeta.
viii. Centrifugar a 2500 rpm por 12 minutos.
ix. Eliminar el sobrenadante con la pipeta.
x. Agregar 6 ml de CARNOY (refrigerado), homogenizar con la pipeta.
xi. Dejar en reposo por 30 minutos al medio ambiente para la fijación.
xii. Centrifugar a 2500 rpm por 12 minutos y eliminar el sobrenadante.
xiii. Agregar 5 ml de CARNOY, agitar con la pipeta hasta que quede homogeneo.
xiv. Centrifugar y repetir la operación una vez más desde el paso xii.
xv. Retirar el sobrenadante y agregar 0.5 ml de CARNOY (refrigerado) para el lanzamiento de la muestra.

c) **PREPARACION DE LAMINAS PARA EL LANZAMIENTO**

i. Las láminas portaobjetos se lavan con una mezcla de volúmenes iguales de alcohol etílico de 96° y Acetona
ii. Se almacenan en la nevera por 30 minutos como mínimo, hasta el momento de su empleo
iii. Con la pipeta agitar fuertemente, se carga con la muestra y luego se deja caer III ó IV gotas de la suspensión en una lámina portaobjetos, soplarla para obtener un extendido homogéneo y secar la lámina con un mechero de alcohol.
iv. Dejar la lámina en la estufa a 60° C por 24 horas ó a 37°C por 48 horas
v. Preparar por cada caso, 4 láminas en adultos y 8 láminas en niños.

d) **COLORACION: (BANDEO)**

Hasta este paso se procesan todas las láminas que pueden ser usadas para coloraciones diversas, las que dependerán del estudio que se quiera realizar como: bandas G, R, C, e inclusive para los exámenes de FISH

BANDEO "GTG"

MATERIALES

i. Koplin
ii. Pinza
iii. Probetas de vidrio de 100 ml
iv. Matraz de vidrio de 50 ml
v. Portaláminas
vi. Botella color caramelo de 500 ml
vii. Perlas de vidrio
viii. Embudo de plástico
ix. Papel toalla
x. Papel filtro

REACTIVOS

i. Tripsina solución al 1%
ii. Buffer para Tripsina de KH_2PO_4
iii. Colorante Giemsa
iv. Alcohol metílico absoluto
v. Glicerina q/p
vi. Buffer para Giemsa fosfato pH 6.8 (Na_2HPO_4) y (KH_2PO_4)
vii. Suero fisiológico
viii. Agua destilada

PREPARACION DE REACTIVOS

*TRIPSINA: Solución al 1% en agua destilada (1 gr en 100 ml agua destilada), filtrar 3 veces hasta obtener una solución transparente. Se almacena en viales en porciones de 5 ml cada uno y se conserva en congelación.

*BUFFER PARA TRIPSINA DE KH_2PO_4 a 0.025 Molar

136.09 grs de KH_2PO_4 en 1 lt de agua destilada corresponde al 1 Molar, para 0.025 molar corresponde 3.4 gr de KH_2PO_4 en 1 lt de agua destilada

*COLORANTE GIEMSA (100 ml) (SOLUCION MADRE)

Colorante Giemsa en polvo	0.75	grs
Alcohol metílico absoluto	65	ml
Glicerina q/p	35	ml

Incorporar los tres reactivos en la botella que contenga las perlas de vidrio, mezclar intensamente 6-10 veces al día durante 72 horas como mínimo.

*BUFFER PARA GIEMSA

SOLUCION A: KH_2PO_4 al 0.06 Molar

136.09 grs de KH_2PO_4 en 1 lt, corresponde al 1 molar, para 0.06 molar corresponde 8.165 gr de KH_2PO_4

SOLUCION B: Na_2HPO_4 al 0.06 Molar

142.02 gr de Na_2HPO_4 en 1 lt corresponde al 1 molar, para 0.06 molar corresponde 8.52 gr Na_2HPO_4

SOLUCIÓN DE TRABAJO

Se preparan tres frascos Koplins:

- Frasco 1: Solución de Tripsina 1%.
- Frasco 2: Solución Salina Fisiológica.
- Frasco 3: Colorante Giemsa al 4%.
- Frasco 4: Agua destilada.

PROCEDIMIENTO (Técnica de Bandeo GTG)

- El frasco 1 es colocado en la Estufa a 37°C para descongelar y mantenerlo.

- Colocar las láminas con la preparación cromosómica en el frasco 1 durante 9 segundos.
- Enjuagar las láminas en el frasco 2.
- Colorear con Giemsa durante 10 minutos, en el frasco 3
- Enjuagar las láminas en el frasco 4

PRECAUCIONES

- Se deberá realizar la siembra con la mayor esterilidad posible
- Deberá tenerse en cuenta que son muchas las causas que interfieren con el normal desarrollo de la mitosis y que incluso producen alteraciones cromosómicas como los rayos x, luz ultravioleta, cambios bruscos de temperatura, campo magnético y ondas sonoras.
- El desarrollo de los cromosomas puede ser inhibido por ciertos agentes biológicos como son los virus y protozoarios, reactivos químicos como los compuestos relacionados con los ácidos nucleicos (5mercaptopurina y 5 fluorodeoxiuridina), antibióticos (Mitomicina C, Actinomicina y Daunomicina), drogas del sistema nervioso central (meprobamate, mescalina, ácido lisergico y dietilamida, cafeína y derivados del ciclamato, contaminantes del aire y del agua (cloramina T y el ozono), pesticidas (captan y tio–tapa), inhibidores mitóticos (colchicina), colorantes derivados de la fotoclanina (acridina orange y rojo neutro), compuesto antifolicos (metrotexate y aminopterina), solventes orgánicos (benceno y mercapto – etanol), solventes inorgánicos (plomo y arsénico).

5.- LECTURA

Responsable: biólogo, Tecnólogo Médico

EQUIPOS

a. MICROSCOPIO BINOCULAR especializado de alta resolución con objetivos 10x, 20, 40x,y 100x
b. Cariotipador

MATERIALES

a. Aceite de inmersión
b. Papel lente
c. Alcohol Isopropílico
d. Lámina procesada
e. Cuaderno
f. Lapicero

Esa etapa a igual que las anteriores es de gran importancia pues de ésta se emitirá el diagnóstico final.

Se realizará el análisis cromosómico que consiste en:

a. La observación de los cromosomas se realiza ubicando las metafases inicialmente con el objetivo de 10X.
b. Se seleccionarán las metafases de buena calidad. Estas deberán ser metafases aisladas, que presenten cromosomas separados, no sobrepuestos, no entrecruzados, completos, bien bandeados y coloreados.
c. Se ubican las metafases para el estudio con el objetivo de 100x utilizando aceite de inmersión.
d. Se procede a contar el número de cromosomas. Si estas contiene 46 cromosomas se las toman en cuenta para el estudio posterior.
e. Si se encontraran un número anormal en una metafase de buena calidad, esta cantidad de cromosomas será cercano al número normal.
f. Se analizará las características de cada cromosoma de acuerdo al patrón internacional del bandeo GTG y se realizará el emparejamiento con su homólogo (buscando al otro cromosoma par)
g. Este análisis tomará como base el Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética 2009 ISCN
h. Se completa el análisis de los 22 pares de cromosomas somaticos o autosomas y del par de cromosomas sexuales

i. Se analizarán 25 metafases como mínimo
j. Si se encontraran anormalidades cromosómicas se estudiarán metafases adicionales necesarias para el diagnóstico final, como mínimo 50 metafases
k. Si el análisis de los cromosomas es anormal, se pasará al Cariotipador para realizar el Cariograma respectivo y el reporte del diagnóstico, impresión y archivo de resultados

6.- LECTURA CON EL CARIOTIPADOR.- según manejo del software LEICA CW4000

Este equipo está constituido por

a. Microscopio con cámara fotográfica
b. Computadora
c. software

PROCEDIMIENTO

1.- Preparación de la lámina

a. Luego del encendido de microscopio y la computadora ubicar en la lámina la metafase a analizar con la lente 10x y luego pasar a la lente 100x previo uso del aceite de inmersión

2.- Acceso al programa:

a. En el monitor ubicar el icono del programa Leica CW4000, hacer doble clic en él.

3.-Captura de imagen:

a. Hacer clic en el icono *Leica CW4000 Karyo* para acceder al programa
b. Una vez accedido al programa, ubicar la pestaña "*CAMARA*", dar clic en ella
c. Se abrirá una sub-ventana y dar clic en la pestaña "*VISTA PREVIA*", para ubicar la metafase en el cuadrante del monitor.
d. Se toma la foto de la metafase haciendo clic en la pestaña "*ADQUIRIR*" con el botón izquierdo del Mouse.

4.-Guardar imagen

a. Hacer clic en la pestaña "*ARCHIVO*".
b. Se abrirá una sub -ventana.
c. Buscar la opción "*GUARDAR IMAGEN*" y dar clic.
d. ubicar la carpeta correspondiente para guardar la imagen.

5.-Análisis de la foto de la metafase y Armado del cariotipo

a. Ubicar la barra de herramientas,
b. Hacer clic en "*EJECUTAR ANALISIS*"
c. Ubicar cada cromosoma independientemente y hacer los arreglos posibles.
d. Hacer clic en "*CONTINUAR*"
e. Automáticamente aparece el cariograma realizado por el software
f. Verificar en este cariograma que los pares de cromosomas estén correctamente ubicados según los grupos correspondientes;
g. Emparejar manualmente los pares de cromosomas que no se correspondan
h. Dar clic en la pestaña "*RECORTAR*" para la edición individual de cada cromosoma con el uso de los siguientes iconos: *Separar, solapar, recortar/expandir, unir, borrar, añadir nuevo, expandir, sombreado de bandas, edición de artefactos* y otros a criterio del analista
i. Hacer clic en la opción "*LISTO*", luego hacer clic en la pestaña "*CYBASE*".
j. Archivo de resultado:.- Hacer clic en la pestaña "*CYBASE*". Se abrirá una sub-ventana, hacer clic en ésta y aparecerá un submenú.; hacer clic en minimizar (-). Aparecerá un submenú para registrar los datos del paciente: N° del caso, Nombres y apellidos, Medico de referencia, Procedencia, Técnica de bandeo, número de metafases, Cariotipo. Llenar estos datos.
k. Diagnóstico.- Hacer un clic en "*ACTUALIZAR*" para guardado de datos
l. Impresión de resultado: Escoger la Impresora correspondiente. Dar clic en "*IMPRIMIR REPORTE*" y "(HOSPITAL SB)".

7.- REPORTE

Responsable: Biólogo, Tecnólogo Médico

Se utilizará el lenguaje de la Nomenclatura International System for Human Cytogenetic Nomenclature del año 2009 para el reporte del cariotipo

8.- DIAGNÓSTICO.- Según formato estandarizado en el Cariotipador, será firmado por el médico patólogo responsable

9.- ENTREGA DE RESULTADO

Responsable: Biólogo, secretaria

10.- ARCHIVO Y ESTADISTICA

Responsable: Tecnólogo Médico y biólogo

a. Se archivarán las láminas de los casos positivos
b. La estadística contendrá:
    - datos de la producción,
    - las tasas de referencias y
    - los casos positivos
c. La estadística se publicará mensualmente

BIBLIOGRAFIA

1. Mueller R, Young I. Genética médica. 2001 Editorial MARBAN libros, 10° edición.
2. Vadillo A. (2010) Extracción de sangre venosa, Gerencia del Area de Salud de Plasencia. En: http://areasaludplasencia.es/3/35/pdf/86/A703.pdf. Consultado en Noviembre 16,2010.
3. Extracción sanguínea. En: http://www.slideshare.net/veronoe/extraccion-sanguinea Consultado Noviembre 16, 2010.
4. Recomendaciones, toma y envio de muestra para cariotipo (2010). En: http://www.laboratoriocolcan.com/RECOMENDACIONES%20.
5. Pichardo J. (2008) Prevalencia y cariotipo de pacientes con síndrome de Down atendidos en el hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Arguello y centro de rehabilitación. Los pipitos en el periodo 2006-2007. En http://www.minsa.gob.ni/bns/monografias/full_text.
6. Universidad del Valle de México. Cultivos de Linfocitos en sangre periférica. En: http:/www.scribd.com/doc/30144318/6-cultivo-de-Linfocitos-de-sangre-Periférica.
7. Cultivo de linfocitos, cromatina sexual y cariotipo. En: http:/www.scribd.com/doc/14671166/Cultivo-de-linfocitos-Cromatina-Sexual-y-Cariotipo.

FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE CARIOGRAMAS

CROMATINA SEXUAL

En 1949 Barr descubrió la cromatina sexual del cromosoma X, y su método con algunas modificaciones son universalmente empleados en los laboratorios de citogenética para dicho estudio. Ohno, Kaplan y Kinosita en 1959 demostraron que la cromatina sexual corresponde a la condensación de uno de los cromosomas X en la mujer y la Dra. Mary Lyon descubrió la acción génica de dosis compensada del cromosoma X.

El Corpúsculo de Barr se observa como un pequeño cuerpo intranuclear, de forma triangular plano convexa, de 0.7 a 1.2 µ de diámetro; puede ser único o múltiple y en éste último caso se debe al exceso de cromosomas X en el individuo. Cada corpúsculo de Barr corresponde a un cromosoma X heteropicnótico que replica su DNA más tardíamente que el resto de los cromosomas. En ocasiones se observan cuerpos de Barr de tamaño o forma anormal y esto se debe a anomalías estructurales de uno de los cromosomas X.

La cromatina sexual puede estudiarse en tres tipos de células: nerviosas, epiteliales y leucocitos polimorfonucleares; el epitelio de la mucosa bucal es el tejido más adecuado para la demostración de la cromatina sexual. Así mismo pueden ser teñidos con gran número de colorantes nucleares tales como violeta de crecilo, tionina, hematoxilina y verde de metilo con la técnica de Feulgen seguida por una hidrólisis ácida.

PROCEDIMIENTO

1. Toma de muestra
2. Procesamiento técnico
3. Lectura
4. Reporte
5. Archivo y Estadística

1.-TOMA DE MUESTRA Y FIJACIÓN:

Responsable: tecnólogo médico, biólogo, técnico
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente se obtenga la solicitud del examen

Se inscribirá en el registro respectivo los datos de la paciente, se le asignará un número el cual se marcará en la lámina con un lápiz cristalográfico con punta de diamante elque identificará la muestra a tomar
Antes de tomar la muestra se recomienda que el paciente se enjuague la boca y se haga una higiene bucal
Utilizando una espátula de madera o una lámina porta-objetos limpia se hace un raspado de la mucosa oral a nivel de los carrillos malares y luego se hace un frotis sobre una lámina porta-objetos evitando retornar la lámina por el mismo lugar del extendido.

Inmediatamente de tomada la muestra se coloca la lámina en un frasco koplin que contenga el fijador (alcohol de 96°) por 15 minutos como mínimo aunque puede quedarse en este fijador por más tiempo (una semana sin deteriorarse).

2.-PROCESAMIENTO TÉCNICO

Responsable: tecnólogo médico, biólogo
Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente se obtenga la muestra

HIDRÓLISIS:

Retirar la lámina del fijador y dejarlo secar al medio ambiente, luego colocarlo en un frasco koplin que contenga ácido clorhídrico 5N por un tiempo de 30 minutos .
Después enjuagar en agua corriente dos veces para detener la acción del ácido.

COLORACIÓN:

MATERIALES

- Láminas portaobjetos
- Bajalenguas
- Algodón
- Koplick de vidrio
- Lápiz cristalográfico
- Probetas de vidrio de 100 ml
- Papel filtro

REACTIVOS

- Carbol Fucsina
- Solución de Ácido clrhírico al 5N

a. **COLORANTE CARBOL FUCSINA**

Solución Stock

Fucsina básica	3 gr
Alcohol etílico 70%	100 ml

Solución de Trabajo

Solución Stock	10 ml
Acido fenico 5%	90 ml (5 ml de fenol + 95 ml de Agua destilada)
Ácido Acético Glacial	5 ml
Formol 40 %	5 ml

b. **Solución de HCL (Ácido Clorhídrico) al 5N para 100 ml.**

H2O(d)	83.77 ml
HCl	16.23 ml

c. Mezclar con cuidado, filtrar el colorante 2 veces y guardar en frasco oscuro en refrigeración. Preferentemente utilizar el colorante después de 5 días de preparado para evitar que precipite.

Filtrar el colorante antes de usarlo.
La lámina porta-objetos es cubierta por el colorante Carbol fucsina (se adiciona 2 ml del colorante sobre la lámina por 10 minutos.

DECOLORACIÓN:

Las láminas luego de la coloración serán pasadas sucesivamente por dos recipientes que contengan alcohol etílico 96°, a manera de lavados rápidos (sólo por segundos) con la finalidad de eliminar el exceso de colorante y decolorar el citoplasma de las células)

El citoplasma de las células no tiene afinidad por el colorante Carbol fucsina por el que se decoloran (se observan transparentes), mientras que la cromatina se tiñe de color rojo magenta, los núcleos; la cromatina X se verá como un corpúsculo rojo intenso pegado a la membrana nuclear.

3.- LECTURA:

Una vez seca la lámina se procede a observar en el microscopio con objetivo de 10X para seleccionar el campo estudiar, luego se pasa al objetivo de 100X o lente de inmersión para realizar el recuento de Corpúsculos de Barr siguiendo un criterio de conteo pre-establecido. Se lee como mínimo 200 núcleos.

CRITERIOS PARA EL RECUENTO DE LA CROMATINA X

El Cuerpo de Barr es un corpúsculo heteropicnótico, el cual se expresa de forma triangular, obscura adherida a la parte interna de la membrana nuclear y que no desaparece al mover el micrometro del microscopio

Sólo deben contarse aquellos núcleos que tengan membrana nuclear completa y cuya cromatina esté finamente distribuida.
Deben contarse como mínimo: 200 núcleos.
No entran en el recuento los núcleos que presentan las siguientes características:

- Núcleos que estén superpuestos o plegados.
- Núcleos de cromatina heteropicnótica y de distribución irregular.
- Núcleos picnóticos, vacuolizados o degenerados.
- Núcleos contaminados por gérmenes.

4.-REPORTE DE RESULTADOS:
Responsable:
El reporte presenta las siguientes opciones:

a. Si está presente o no el Corpúsculo de Barr
Negativo cuando no se observa ningún corpúsculo de Barr
Positivo.- cuando se observa corpúsculos de Barr
b. Si es positivo, reportar el porcentaje
c. Si es positivo, fijarse si hay uno, que es lo más frecuente o más de uno, reportar en porcentaje la variabilidad. Recordar que si encontramos más de un corpúsculo de Barr, deberá en el cariotipo tenerse alteración numérica en el cromosoma X según la Ley de Lyon

Valores Normales:

Sexo femenino	:	15 - 30%
Sexo masculino	:	0%

BIBLIOGRAFÍA

1. James S. Thomson. Genética Medica . Editorial: Salvat. 2da. edición.
2. Guizar J. Diagnóstico y Manejo de las Enfermedades Hederitarias. Editorial El manual Moderno, Mex. D.F.
3. Thompson & Thompson. Genética en Medicina. 4ta. Edición Edit. Masson
4. Ricardo Cruz-Coke M. Valoración de trabajos clásicos en la historia de la genética. *Rev Méd Chile 2003; 131: 220-4*

Oficina de Gestión de la Calidad

HOSPITAL NACIONAL DOCENTE
MADRE NIÑO
SAN BARTOLOME
Ministerio de Salud

"PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS

DE LAS NECROPSIAS CLINICAS

2013

Ministerio de Salud
Oficina de Gestión de la Calidad
Hospital Nacional Docente Madre Niño "San Bartolomé"

DE LAS NECROPSIAS CLINICAS

INTRODUCCION

El interés por el estudio del cuerpo humano se conoce desde las sociedades muy antiguas. La legitimación de la disección y la autopsia del cuerpo humano se inició aparentemente en Europa en el siglo XIV, con fines educativos y en el contexto universitario. Para inicios del siglo XVI las cátedras de anatomía en universidades europeas estaban ya definidas y se incluía la práctica de disecciones, con permisos y garantías reales. Será en el siglo XIX cuando alcance plena sistematización y vigencia [1,2,3]

El genial belga Andreas Vesalius (1514-1564) produjo una gran revolución científica de su época al realizar a través de la disección de cuerpos humanos, la mejor forma de comprender la anatomía humana, replanteó la medicina de su época y orientó una nueva forma de obtener el conocimiento a través de la observación científica; oponiéndose al conocimiento galénico que por aproximadamente trece siglos fue considerado verdad irrefutable. Su elegante y bella obra *De Humani Corporis Fabrica*, diseñada en los talleres de Tiziano es la evidencia de esa revolución científica de su época.

DEFINICION

La necropsia o su sinónimo autopsia, es una técnica tanatoquirúrgica realizada para investigar la causa o las causas de la muerte de un individuo.

La necropsia es una actividad del médico patólogo

UTILIDAD

- Permite la descripción macroscópica y microscópica de las enfermedades,
- contribuye al conocimiento de la fisiopatología de ellas,
- descubre patologías concomitantes,
- posee un gran valor docente y de investigación
- Es un instrumento de la medición de la calidad de una institución sanitaria, de allí su gran utilidad en las auditorías médicas
- La causa de la muerte en las autopsias perinatales son importantes para el consejo genético a los padres o la familia acerca de los riesgos recurrentes para los futuros embarazos
- Es fundamental para la acción médico legal.

La autopsia continúa siendo un método efectivo y fiable para verificar con exactitud de los diagnósticos clínicos, evaluar los procedimientos médicos realizados así como entender las características de las enfermedades emergentes

MARCO LEGAL

La Ley 26842,[5] Ley General de Salud del año 1997 refiere al respecto en sus diferentes artículos, así:

Artículo 108o.- La muerte pone fin a la persona. Se considera ausencia de vida al cese definitivo de la actividad cerebral, independientemente de que algunos de sus órganos o tejidos mantengan actividad biológica y puedan ser usados con fines de transplante, injerto o cultivo.

El diagnóstico fundado de cese definitivo de la actividad cerebral verifica la muerte. Cuando no es posible establecer tal diagnóstico, la constatación de paro cardio-respiratorio irreversible confirma la muerte.

Ninguno de estos criterios que demuestran por diagnóstico o corroboran por constatación la muerte del individuo, podrán figurar como causas de la misma en los documentos que la certifiquen.

Artículo 109o.- Procede la práctica de la necropsia en los casos siguientes:

a) Por razones clínicas, para evaluar la exactitud y precisión diagnóstica y la calidad del tratamiento de pacientes;
b) Con fines de cremación, para determinar la causa de la muerte y prever la desaparición de pruebas de la comisión de delitos;

c) Por razones sanitarias, para establecer la causa de la muerte con el propósito de proteger la salud de terceros; y,
d) Por razones médico-legales, para determinar la causa de muerte, en los casos que la ley lo establece o cuando lo ordena la autoridad judicial competente, o para precisar la identidad del fallecido.

Sólo la necropsia por razones clínicas requiere de la autorización a que se refiere el Artículo 47o de la presente ley.

Artículo 110o.- En los casos en que por mandato de la ley deba hacerse la necropsia o cuando se proceda al embalsamamiento o cremación del cadáver se podrá realizar la ablación de órganos y tejidos con fines de transplante o injerto, sin requerirse para ello de autorización dada en vida por el fallecido o del consentimiento de sus familiares. La disposición de órganos y tejidos de cadáveres para los fines previstos en la presente disposición se rige por esta ley, la ley de la materia y su reglamento.

Artículo 111o.- Sólo es permitido inhumar cadáveres en cementerios debidamente autorizados por la Autoridad de Salud competente, conforme a lo que dispone la ley de la materia y su reglamento.

Artículo 112o.- Todo cadáver que haga posible la propagación de enfermedades será cremado previa necropsia.

Artículo 113o.- La Autoridad de Salud competente está obligada a disponer la erradicación de cementerios cuando su ubicación constituya un riesgo para la salud.

Artículo 114o.- Los cadáveres de personas no identificadas o, que habiendo sido identificados, no hubieren sido reclamados dentro del plazo de treintaiseis (36) horas luego de su ingreso a la morgue, podrán ser dedicados a fines de investigación o estudio. Para los mismos fines podrán utilizarse cadáveres o restos humanos, por voluntad manifiesta de la persona antes de fallecer o con consentimiento de sus familiares.

Artículo 115o.- La inhumación, exhumación, traslado y cremación de cadáveres o restos humanos, así como el funcionamiento de cementerios y crematorios se rigen por las disposiciones de esta ley, la ley de la materia y sus reglamentos.

Artículo 116o.- Queda prohibido el comercio de cadáveres y restos humanos.

TIPOS

Según su finalidad las Necropsias son:

a) Clínicas
b) Médico legales
c) Epidemiológicas o sanitarias

Según su extensión

a) Totales, cuando comprende el estudio de todos los órganos del cuerpo humano; es la forma ideal para asegurar un diagnóstico válido y confiable
b) Parciales cuando no se autoriza el estudio de algunos órganos como el cerebro por ejemplo

La necropsia clínica es el procedimiento postmortem que estudia las alteraciones morfológicas de los órganos y tejidos como consecuencia de una enfermedad

RESPONSABLE: Médico patólogo
Colaborador: Técnico de laboratorio
Tecnólogo Médico

Tiempo de Ejecución: se realizará inmediatamente llegue la solicitud de necropsia con la Autorización de los familiares al Servicio de Anatomía Patológica hasta concluir con la emisión del certificado de defunción y el Diagnóstico Macroscópico y la realización de los cortes para el estudio histológico

REQUISITOS

- Es indispensable el Consentimiento de la necropsia firmada por el familiar más cercano del niño padre o madre.

- La historia clínica para estudiar los antecedentes clínicos y los exámenes especiales o auxiliares realizados
- El proceptor o médico anatomo patólogo deberá poseer alta capacitación que permita tener validez de sus resultados. Numerosas publicaciones sugieren que una autopsia perinatal debe ser realizada por un patólogo perinatal bien entrenado o debe ser referido a un centro que cuente con un patólogo pediatra.

A pesar que los residentes y patólogos asistentes proporcionan la ayuda necesaria para la ejecución del procedimiento de necropsia, es siempre necesario que sean supervisados por un patólogo calificado en el procedimiento de necropsias pediátricas, es esta persona la que guiará la revisión de la historia clínica para la determinación de la información con carácter de relevante a tomar en cuenta, además supervisará el examen externo, de los órganos internos *in situ*, así como el reconocimiento de anomalías y la toma de muestras apropiadas. Todo esto se debe a que muchas estructuras corporales una vez alteradas ya no pueden ser sometidas a reconstrucción.

El paciente debe ser identificado, se debe confirmar que el Consentimiento Informado este completo y se deben tomar las medidas correctas para prevenir infecciones esto según las regulaciones establecidas por el departamento de Ayuda al Diagnóstico sobre los métodos universalmente aceptados para el manejo de tejidos y fluidos orgánicos.

Se procederá a la revisión completa de la historia clínica incluyendo la conversación con el clínico y la revisión completa de los resultados de exámenes incluyendo imagenología, análisis citogenéticos, estudios Doppler ya que estos pueden dirigir al patólogo para establecer una correlación clínico patológica adecuada.

Se procederá a la ejecución de la necropsia en si, aplicando la técnica más adecuada a cada caso en particular, para lo cual se puede remitir a la siguiente literatura:

- Handbook of Pediatric Autopsy Pathology, Enid Gilbert Barness, Diane E Debich-Spicer.
- Post morten Technique Handbook. Segunda Edición, Michael T. Sheaff, Deborah J. Hopster. Editorial Springer

REACTIVOS:

a. Formol
b. Reactivos para el procesamiento de tejidos con la técnica de Hematoxilina y Eosina

EQUIPOS

a. Mesa de necropsia.
b. Cámara fotográfica y equipo fijo de fotografía.
c. Microscopio Optico.
d. Equipo para procesamiento técnico, que consta de:
   - Procesador automático de Tejidos
   - Estación de Inclusión en Parafina
   - Cámara de frío
   - Micrótomo
   - Flotador de tejidos
   - Refrigeradora
   - Estufa

MATERIALES

a. Instrumental de necropsias (equipo de disección). El instrumental especial y exclusivo para necropsias neonatales y perinatales es el de cirugía oftalmológica.
b. Hojas de Bisturí
c. Balanza

d. Regla
e. Centímetro
f. Tabla de disección
g. Formato de necropsia (*Anexo 7*)
h. Formato de estudio fetal (*Anexo 8*)
i. Lápiz de carbón
j. Casetes
k. Recipiente para almacén de órganos
l. Recipiente para los casetes
m Algodón, gasa absorbente
n. Bloque para soportar la cabeza.
o. Libro de Registro de Necropsias
p. Lapicero
q. Libro de registro de Necropsias

VESTIMENTA

a) Gorro para proteger la cabeza
b) Visor o protector ocular.
c) Mascara facial o barbijo.
d) Botas descartables.
e) Traje de cirugía (chaqueta de manga corta y pantalones).
f) Mandilón impermeable para la protección de brazos, pecho y piernas
g) Dos pares de guantes: un par interno de neopreno resistente a los cortes y otro par externo de látex.

PROCEDIMIENTO:

11. Autorización de necropsia y Solicitud
12. Identificación y Registro
13. Procedimiento necrópsico
14. Emisión de Certificado de Defunción
15. Diagnóstico macroscópico:
16. Procesamiento macroscópico
17. Procesamiento técnico
18. Diagnóstico final
19. Tipeado
20. Archivo y estadística

1.-AUTORIZACIÓN.

Responsable. Los padres o apoderados, identificados con su DNI, firmarán la autorización de necropsia indicando el nombre completo de su hijo y si ésta será total o parcial

2.- IDENTIFICACION Y REGISTRO

Responsable: Técnico

a. Se identificará el cadáver con la Boleta de Fallecimiento, y, si fuera neonato además con el Brazalete de Identificación del recién nacido.
b. Se trasladará a la sala de necropsias,
c. Se anotará en el Libro de Necropsias asignándole el número correlativo, el mismo que será usado para cualquier documento, examen, muestras, láminas o bloques de parafina
d. Se preparará todo el instrumental quirúrgico antes del inicio del procedimiento

3.- PROCEDIMIENTO NECROPSICO MACROSCOPICO

Responsable: médico patólogo

Colaborador: Técnico de laboratorio o Tecnólogo Médico

Toda técnica de necropsia tiene los siguientes pasos:

- Examen externo.
- Exposición de órganos internos.
- Evaluación de órganos internos in situ.
- Evisceración.
- Disección de cada órgano.
- Muestreo para estudios especiales y para interpretación microscópica.
- Cierre del cadáver y será llevado por el personal técnico encargado, de regreso al mortuorio, para su posterior entrega a los familiares.
- Todas las observaciones deben anotarse en el Protocolo de Necropsia y los hallazgos relevantes deben documentarse por fotografías y radiografías.
- Las fotografías tienen un significado invalorable para la documentación de los hallazgos importantes, no solo para el diagnóstico sino también para posteriores revisiones y docencia, en particular los hallazgos no reproducibles como son las lesiones in situ, anomalías externas, dismorfias, posición de tubos y vías, colección de fluidos y lesiones en la base del cráneo son las mandatarias a fotografiar.
- Las radiografías son de valor en circunstancias como documentación de neumotórax, localización de tubos y vías, centros de osificación, cuando se sospecha de una anomalía de crecimiento y en anomalías congénitas esqueléticas. Se debe realizar en toda necropsia perinatal un BABYGRAMA.
- Todos los datos debe quedar consignados en el Protocolo de Necropsia.

Se procederá según protocolo impreso donde se anotará todos los hallazgos de este estudio, así:

a. Se identificará el cadáver con sus apellidos y nombres, edad y sexo que refiere la boleta de fallecimiento o Brazalete de identificación del recién nacido
b. Se pesará y medirá talla, perímetros cefálico, torácico y abdominal.
c. Si se tratara de un niño con malformaciones externas o internas o alteraciones oseas, se solicitará se realice un BABYGRAMA; para lo cual se procederá a llevar al niño al Servicio de Radiología previo trámite con Asistencia social si no pudiera facturarse
d. Se realizará la descripción topográfica del cuerpo: Descripción externa, anotando señales de venopunción, cicatrices o suturas quirúrgicas previas
e. Se realizará el corte de la piel en la parte anterior del cuerpo en "Y" o en "T".
f. En fetos y neonatos se recomienda realizar una incisión horizontal subumbilical y la sutura deberá cubrirse con un pañal, a fin que las madres no se impresionen con el corte de todo el cuerpo
g. Se investigarán las cavidades: torácicas, abdominal, pericárdicas, craneal. Descripción interna
h. Se eviscerará en bloque o por aparatos o sistemas según los antecedentes clínicos
i. Se estudiará cada órgano o sistema según técnicas convencionales
j. Se realizará la disección de cada órgano indicando su peso, medidas, relaciones, color, consistencia, superficie de corte
k. Las malformaciones congénitas se describirán según las clasificaciones internacionales
l. En caso de Cardiopatías se realizará la identificación de las estructura normales in situ. Si se identificara anormalidades, se conservarán la relación con los pulmones
m. Se realizarán cultivos para búsqueda de gérmenes
n. Se realizarán los cortes macroscópicos respectivos, según descrito anteriormente (pág 5)
o. Se documentarán los hallazgns con las fotografías respectivas

4.- EMISION DEL CERTIFICADO DE DEFUNCION
Responsable: médico patólogo
Materiales
Certificado de Defunción (formato)
Se procederá al llenado de este documento, según el formato existente(Anexo N°)

5.- DIAGNÓSTICO MACROSCÓPICO
Responsable: médico patólogo
Se realizará inmediatamente concluida la necropsia y se anotará los diagnósticos macroscópicos en el protocolo de necropsias, se digitará este diagnóstico y se entregará una copia al servicio correspondiente, otra se colocará en la historia clínica del paciente y la tercera se archivará junto con el protocolo

6.- PROCESAMIENTO MACROSCÓPICO
Responsable: médico patólogo

- Se realizará inmediatamente concluida y entregada el certificado de defunción
- Para el estudio de órganos y tejidos se realizarán cortes de un grosor máximo de 0.3cm.
- Cada casete será etiquetado con el número de necropsia y número de casete correspondiente, lo cual facilitará la posterior comprobación de la correspondencia del corte con el número y el conteo total de casetes empleados.
- El tejido debe ser colocado en los casetes aun estando fresco y fijado inmediatamente, durante 24 horas como mínimo, para mejorar la calidad del examen histológico
- En cuanto a los estudios especiales cabe recordar que para el cultivo de gérmenes aeróbicos y anaeróbicos se obtienen muestras de corazón, sangre, bazo, pulmón o hígado.
- Se puede realizar aspirado de contenido gástrico, líquido céfalo raquídeo, hisopado de canal auditivo.
- Para descartar infección por citomegalovirus, herpes virus, toxoplasma o rubéola se pueden tomar muestres de sangre entre las 12 y 24 horas de muerte
- En el caso del cerebro, éste debe fijarse en formaldehído durante una semana antes de su procesamiento.
- Cultivos para estudios citogenéticos, inclusive en fetos macerados puede crecer el tejido siempre y cuando el cuerpo se haya mantenido refrigerado después de la muerte.

7.-PROCESAMIENTO TÉCNICO
Responsable: Tecnólogo médico
Tiempo de Ejecución: se realizará luego de comprobar la buena fijación de los tejidos

- El procesamiento técnico y la coloración son los convencionales para los especímenes quirúrgicos. Se procederá a procesar los tejidos en el procesador de tejidos, se incluirá en parafina, se cortará en secciones de 4 micras de grosor, tinción con hematoxilina-eosina y montaje de láminas.
- Se podrá realizar estudios especiales como la Inmunohistoquímica u otros.

8.- DIAGNÓSTICO FINAL
Responsable: médico patólogo
Tiempo de Ejecución: se realizará en el lapso del mes siguiente, luego de haberse agotado todos los estudios especiales pertinentes

9.- TIPEADO
Responsable: secretaria o digitador
Tiempo de Ejecución: inmediatamente que el médico entregue el protocolo debidamente llenado

10.- ARCHIVO Y ESTADISTICA
Responsable: Secretaria
Tiempo de Ejecución: se realizará mensualmente la casuística por producción y semestralmente por diagnóstico
Se realizará la presentación del caso al final de cada mes

FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE NECROPSIAS

BIBLIOGRAFIA

1. Sánchez JL, Viesca C, de la Torre Rendón F. La disección anatómica, las autopsias y su legislación en México durante los siglos XVI y XVII / Anatomic dissection, autopsies and legislation in Mexico during the XVI and XVII centuries. Patología 1997;35(1):13-21.
2. Newton D, Coffin Ch, Clark E, Lowichik A. How the Pediatric Autopsy Yields Valuable Information in a Vertically Integrated Health Care System. Archives of Pathology & Laboratory Medicine: November 2004, Vol. 128, No. 11, pp. 1239-1246.
3. Sanne J. Gordijn, Jan Jaap H.M. Erwich, T. Yee Khong. The perinatal autopsy: Pertinent issues in multicultural Western Europe. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2007; 132:1; 3-7
4. Ley General de Salud. Ley N° 26842. 1997
5. Stocker JT, Dehner LP. Pediatric Pathology, Segunda Edicion.
6. Lozano F, Rodríguez G. Obito Fetal; Guia de manejo para Montevideo. 2007 Montevideo.
7. Fernandez F, Val Bernal JF. Protocolos de Diagnostico: La Autopsia Clinica, Hospital Universitario Marquez de Valdecilla Santander 1999 vol 32 N°2
8. Estebez A, Fernandez F. La Autopsia Clinica en la Web: Aspectos generales, Pagina Web del Club de Autopsias de la Sociedad Española de Anatomía Patológica,. 2003 Vol 36
9. Handbook of Pediatric Autopsy Pathology, Enid Gilbert Barness, Diane E Debich- Spicer.
10. Sheaff MT, Hopster DJ. Post morten Technique Handbook. Segunda Edicion. Editorial Springer
11. Color Atlas of Forensic Pathology
12. Rutty GN. Essential of Autopsy Practice,
13. Eckert WG.Introduction to Forensic Sciencies. Segunda edicion,
14. Ley general de salud Ley N° 26842 . 1997
15. INEN. Manual de Procedimiento de indentificacion y Disposicion de Cadáveres. Resolución Directoral N° 092-DG-INEN del 09 de mayo del 2006
16. Burnett D. Acreditación del laboratorio clínico,.