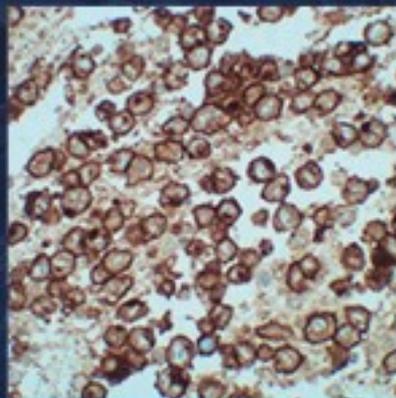
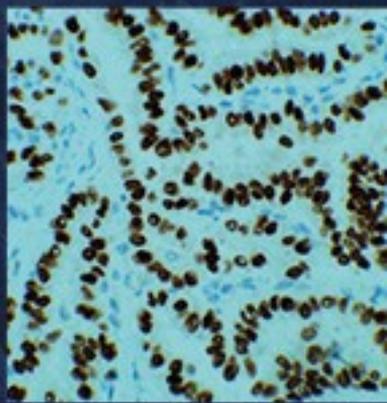
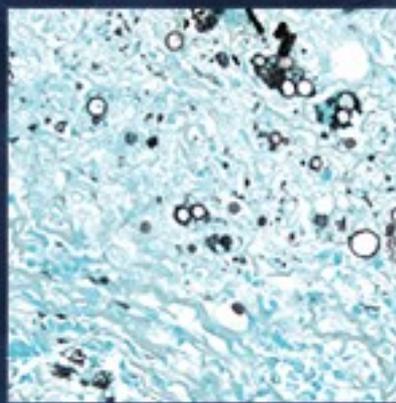
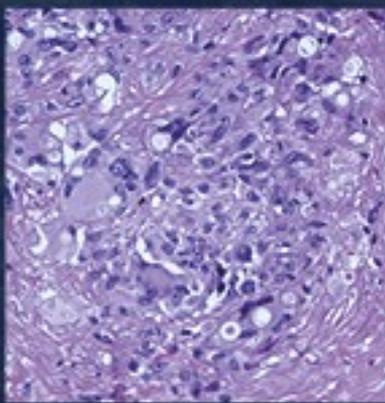


MANUAL DE BUENAS PRÁCTICAS EN PATOLOGÍA



EMILIO ASSIS
editor



Sociedade
Brasileira de
PATOLOGIA

MANUAL
DE BUENAS PRÁCTICAS
EN PATOLOGÍA

MANUAL DE BUENAS PRÁCTICAS EN PATOLOGÍA

EDITOR
EMILIO ASSIS



Sociedade
Brasileira de
PATOLOGIA

Copyright©2021 Sociedade Brasileira de Patologia

Todos los derechos reservados y protegidos por la Ley 9.610 del 16/02/1998.

Ninguna parte de este libro, sin autorización previa por escrito de la editora (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA) responsable y/o titular de esta obra, podrá ser reproducida o transmitida por cualquier medio: electrónico, mecánico, fotográfico, grabado o cualquier otro.

Obra: Manual de Buenas Prácticas en Patología

ISBN Impreso: 978-65-88327-01-2

ISBN Digital: 978-65-88327-00-5

Producido por:

Livraria e Editora Livromed Paulista Eirelli

Rua Mons. vitorino G. Mendes, 84

CP: 02563080

Atención al cliente:

+55 11 5575-3194/+55 11 94506-3769

livromed@livromedpaulista.com.br

Revisión, diagramación y portada:

Thaty Furtado | Primeira Edição Soluções Editoriais

AS848m Assis, Emilio

Manual de Buenas Prácticas en Patología / Emilio Assis. Sao Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 2020.

92 p.; il. ; 24 cm.

ISBN 978-65-88327-01-2

1. Medicina. 2. Patología. 3. Enfermedades, patologías y entrenamientos. I. Assis, Emilio. II. Título.

CDD 616

CDU 616

Realizada por la bibliotecaria Clarissa Padovani Mussoi CRB
10/1775

Índice para catálogo sistemático:

1. Patología: 616

Sociedade Brasileira de Patologia
Dirección: R. Topázio, 980 - Vila Mariana, São Paulo - SP, 04105-063
Teléfono: +55 11 5080-5298
www.sbp.org.br

DIRECCIÓN

2020-2022 – Consolidación del camino de la nueva Patología

Presidente	Katia Ramos Moreira Leite
Vicepresidente p/ Asuntos Académicos	Isabela Werneck da Cunha
Vicepresidente p/ Asuntos Profesionales	Emilio Augusto C. P. de Assis
Secretaria General	Marina De Brot
Subsecretario	Romulo Loss Mattedi
Tesorero	Carlos Augusto Moreira Silva

Coordinadores de los Departamentos

Comunicación	Gerusa Biagione Tiburzio
Social	Igor Campos da Silva
Especialidades	Maria Dirlei F.S. Begnami
Científicas	Felipe D'Almeida Costa
Enseñanza	Fábio Daniel Molinari
Informática	Thiago Barreto Frederigue
Defensa Profesional	Larissa Cardoso Marinho
Control de Calidad	Fábio Rocha Fernandes Távora
Relaciones	
Internacionales	

2020-2022 – Transparencia

Consejo Fiscal	Daniel Cury Ogata Valquíria de Araújo Verônica Resende Lima
Consejo Fiscal: Suplente	Raquel Silva Araujo
Consejo Consultivo	Clóvis Klock Fernando Augusto Soares Renato Lima de Moraes Jr.

Asesorías Especiales:

AMB
CFM

Denis Itiro Kobayashi
Clóvis Klock

Comunicación Social
Medios Sociales
Graduación
Ligas Académicas
SUS
PICQ
Coordinador Acreditación
CNRM

Aline Caldart Tregnago
Raimundo Gerônimo da Silva Jr.
Monique Freire Santana
Juliana Arôxa Pereira Barbosa
Clóvis Klock
Maurício Barcelos Costa
Renato Lima de Moraes Jr.
Fernando Augusto Soares
Antônio Hugo José F. M. Campos
Ellen Caroline T. do Nascimento
Rosemary Nascimento
Regina de Paula Xavier Gomes
Luciana Schultz Amorim
Glícia Campanharo Malheiros

Posgraduación
ANS
S.V.O.
Relaciones Internacionales
Representantes de los
residentes

Surgical and Experimental Pathology

Editor Encargado

Fernando Augusto Soares

Comisión del Título de
Especialista

Aloísio Souza Felipe da Silva
Ângela Cristina Gouvêa Carvalho
Daniel Cury Ogata
Felipe D'Almeida Costa
Giuliano Stefanello Bublitz
Mariana Petaccia de Macêdo
Nathalie Henriques Silva Canedo

Comisión PACQ

Larissa Cardoso Marinho
Renato Lima de Moraes Jr
Alex Moisés Pimenta
Celina Santaella Rosa
Emilio Augusto C. P. de
Assis Beatriz Hornburg
Carlos Augusto Moreira Silva
Denis Itiro Kobayashi

Comisión PICQ

Maurício Barcelos Costa
Daniel Cury Ogata
Giuliano Stefanello Bublitz
Jefferson Crespigio
Karla Patrícia Casemiro
Luiz Guilherme C. A. de Lima
Raimundo Geronimo da Silva Jr.
Siderley Araújo

Agradecimiento a los patrocinadores

Astrazeneca do Brasil Ltda.

Bristol Myers Squibb Farmacêutica S/A



Dedicatoria

Dedicamos esta publicación a nuestros pacientes; les agradecemos por confiar en nosotros y honraremos esta confianza haciendo nuestro mejor esfuerzo.

Autores

Emilio Assis - Editor

Profesor de la Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud de Juiz de Fora, MG, Brasil.

Isabela Werneck da Cunha

Coordinadora Médica de Patología de la Red D'OR-São Luiz, SP.

Clóvis Klock

Director Médico del Grupo Infolaudado - Medicina Diagnóstica - RS y SC

Fernando Augusto Soares

Director Médico de Anatomía Patológica - Red D'Or São Luiz y Profesor Titular de Patología General FOUSP

Katia Ramos Moreira Leite

Profesora de la Disciplina de Urología en el Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad de Sao Paulo (FMUSP). Patóloga Responsable del Laboratorio de Investigación Médica de la Disciplina de Urología de la FMUSP.

Mariana Petaccia de Macedo

Patóloga en el Laboratorio de Patología del Hospital Sírio Libanês

Renato Lima de Moraes Jr.

Médico patólogo

Miembro del consejo consultivo de SBP Miembro de la Comisión de la Acreditación de PACQ

Prefacio versión portuguesa

La difusión de las buenas prácticas en Anatomía patológica y Citopatología siempre ha sido una característica constante de la Sociedad Brasileña de Patología a través de sus informes y de su participación en la redacción de normas y resoluciones junto a los distintos órganos federales, agencias y autarquías.

Junto al PICQ (programa de proficiencia), PACQ (programa de acreditación de laboratorios) y sus publicaciones como el Manual de Informes y el Manual de Instrucciones para CHPM, luego de un arduo trabajo, se publica este Manual de Buenas Prácticas en Patología.

Varios colegas participaron en este Manual, quienes dedicaron horas de su tiempo para que se realizara. Se han consultado muchos documentos y su bibliografía es extensa. Entre ellos, se trabajó mucho en conjunto con el Centro de Vigilancia en Salud del Estado de Sao Paulo para desarrollar un manual para los Laboratorios de Patología que está pendiente de publicación. Una excelente publicación realizó el Dr. Jorge Michalany. Su libro *Técnica Histológica em Anatomia Patológica* (1980), ya muestra una gran preocupación por el área preanalítica.

Esta publicación de la Sociedad Brasileña de Patología, con el apoyo de Astrazeneca do Brasil y Bristol Myers Squibb Farmacêutica, viene a llenar un gran vacío en la orientación de los médicos en general y en particular de los patólogos y de todos los colaboradores que trabajan en patología, sobre las buenas prácticas tanto en el área preanalítica, en donde es fundamental la relación con los colegas médicos de otras especialidades, como en las áreas analíticas y posanalíticas, en las que se procesan las muestras y se emite el informe del procedimiento diagnóstico que orienta a los médicos solicitantes acerca de la mejor conducta para el paciente.

Uno de los principales puntos de discusión es el almacenamiento de muestras procesadas (bloques y láminas) y la eliminación de residuos, lo que se destaca en este manual.

La preocupación por el paciente es el foco de la Patología, el Manual de Buenas Prácticas fue diseñado teniendo en cuenta la seguridad del patólogo y, en especial, la del paciente en todos los procesos, para que tenga un diagnóstico seguro, correcto y en el momento adecuado brindándole el mejor enfoque terapéutico.

Además de todos los compañeros patólogos que participaron en la redacción de este Manual, es válido agradecer a todos los colaboradores de la Sociedad Brasileña de Patología, quienes con su trabajo apoyan todos los logros de la dirección.

La Sociedad Brasileña de Patología cumple con este Manual otro de sus propósitos estatutarios al ofrecer a los médicos y otros profesionales de la salud una excelente herramienta para incrementar la calidad en los laboratorios de patología, además de crear una cultura de buenas prácticas en la ejecución de los procedimientos de diagnósticos.

Renato Lima Moraes Jr.

Prefacio versión en español

En Patología, el reporte de las biopsias y citologías es un reflejo de la competencia del patólogo, basado en la precisión y precisión involucrada. La parte clínica es importante, sin embargo, la base del conocimiento en nuestra especialidad es predominantemente observacional. Pero, nos estamos moviendo de un marco de diagnóstico fenotípico-clínico a una dimensión fenotípica-molecular-clínica.

Es por estas razones que el esfuerzo hecho por la Sociedad Brasileña de Patología para hacer este manual es muy importante, porque define cómo hacer el abordaje correcto de las muestras de Patología, desde que se toma hasta que se diagnostica. Este manual nos permite definir adecuadamente todas las etapas del manejo de muestra y define en forma correcta la manera moderna de trabajar en un Laboratorio de Patología.

Se enfatiza en los elementos de calidad, que incluyen seguridad, efectividad, eficiencia, oportunidad, equidad y el enfoque centrado en el paciente. Esto permite que se tenga una estandarización del abordaje de la Patología en Latinoamérica y nos permita compararnos entre sí. Especialmente con los esfuerzos que se están haciendo para incorporar las pruebas moleculares como elementos en el diagnóstico de la Patología Quirúrgica. La calidad y cuidado de las muestras de Patología son esenciales para la parte molecular, lo cual se enfatiza en este manual.

Estas guías van a ser de gran provecho para el ejercicio de la Patología en Latinoamérica y es un gran honor por su calidad y contenido profesional, la presentar este documento.

Dr. Fernando Brenes Pino, MSc
Presidente
Sociedad Latinoamericana de Patología

Índice

■ INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO. ...	13
GLOSARIO Y CONCEPTOS BÁSICOS.	14
SECTORES DEL LABORATORIO.	17
■ CAPÍTULO I - ETAPA PREENALÍTICA. .	23
FORMOL Y FIJACIÓN.	24
INCLUSIÓN Y CORTE.	28
TINCIÓN DE RUTINA.	30
TINCIONES HISTOQUÍMICAS.	32
TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.	32
TÉCNICAS PARA LA PATOLOGÍA MOLECULAR.	34
■ CAPÍTULO II - ETAPA ANALÍTICA.	43
■ CAPÍTULO III - POSANALÍTICA.	49
■ CAPÍTULO IV - ELIMINACIÓN.	57
■ ANEXOS.	65
■ SOLUCIONES Y REACTIVOS.	73



INTRODUCCIÓN

Glosario

- **MUESTRA:** Material recolectado del paciente con el propósito de realizar un análisis para la emisión de un informe.
- **BIOPSIA:** Muestra de una parte de un órgano o lesión con el propósito de realizar un diagnóstico y definir una conducta.
- **BLOQUE DE PARAFINA:** Bloque de parafina que contiene una muestra biológica después del procesamiento histológico.
- **CITOLOGÍA:** Muestra de un órgano o lesión para realizar un mejor análisis morfológico.
- **CLIVAJE:** Acto de selección y corte de muestras macroscópicas que serán enviadas para el procesamiento histológico.
- **TINCIÓN DE RUTINA:** Es el tinte utilizado para realizar un mejor análisis del material de rutina. En muestras histológicas (biopsias y piezas quirúrgicas) se utiliza la tinción con Hematoxilina y Eosina (H.E.); en Citología, Papanicolaou.
- **TINCIÓN ESPECIAL:** Son tinciones histoquímicas, tintes diferentes al utilizado en la tinción de rutina que interactúan con la muestra revelando sus componentes ultraestructurales de manera que complementan el análisis morfológico habitual.
- **DIAGNÓSTICO CRÍTICO:** estas son situaciones en las que no se puede esperar a que el médico tratante reciba el informe; el patólogo debe comunicarse de inmediato.
- **FORMALINA:** Es formol al 37 % diluido en una proporción de 9:1 para interactuar mejor sin dañar demasiado la muestra biológica del paciente. Debe estar tamponada para conservar mejor la muestra.
- **FORMOL:** Es un aldehído (formaldehído) que se puede utilizar de diferentes formas; en patología se utiliza como fijador universal. Se puede encontrar en varias

concentraciones comerciales, normalmente a 37 % (se considera formol concentrado).

- **INMUNOHISTOQUÍMICA:** Procedimiento de diagnóstico complementario al análisis morfológico de rutina que revela la expresión (o ausencia) de ciertos antígenos en el órgano o tumor, determinando o contraindicando un tratamiento específico.
- **INCLUSIÓN:** Acto de incluir la muestra biológica después del procesamiento histológico en parafina.
- **MACROSCOPIA:** Acto de realizar un análisis macroscópico de muestras que percibe e informa las características iniciales de la muestra y selecciona lo que debe procesarse para el análisis microscópico.
- **MICROSCOPIA:** Análisis microscópico de la muestra.
- **PARAFINA:** Derivado del petróleo que tiene dureza y maleabilidad a temperaturas relativamente bajas, lo que permite su manipulación y la conservación de la muestra biológica. La parafina debe ser lo más pura posible. Si su producción contiene impurezas, su uso se ve perjudicado y en ocasiones es necesario utilizar espesantes para compensarlo; en estas situaciones, se prohíbe el uso de espesantes biológicos (como cera de abejas), ya que estos contienen ADN exógeno que influye en los procedimientos de patología molecular.
- **PATOLOGÍA MOLECULAR:** Procedimiento de diagnóstico complementario al análisis morfológico de rutina que revela la presencia (o ausencia) de cambios en las moléculas de ADN y/o ARN en la sangre o tejido, lo que indica o contraindica una conducta médica específica.
- **PIEZA QUIRÚRGICA:** Muestra de parte de un órgano, o de todo un órgano, extirpado en su totalidad, que permite el análisis de la lesión que contiene y su relación con sus límites.
- **PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO:** Serie de baños de inmersión en sustancias deshidratantes (habitualmente se usa etanol) y diafanizantes (habitualmente se usa xilol), que permiten que la parafina penetre en la muestra y que la tinción interactúe de manera adecuada.

LISTA DE VERIFICACIÓN RESUMIDA DE BUENAS PRÁCTICAS

- ✓ **ENTORNO LABORAL**
- ✓ **IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL**
- ✓ **GUIAR A MÉDICOS Y ENFERMERAS EN LA RECOLECCIÓN, PRECLIVAJE Y FIJACIÓN**
- ✓ **CALIDAD DE LAS LÁMINAS PORTAOBJETOS Y CUBREOBJETO**
- ✓ **CALIDAD DEL CORTE Y DE LA TINCIÓN**
- ✓ **CALIDAD DE LOS INSUMOS**
- ✓ **CANTIDAD DE PROFESIONALES ADECUADA PARA LA CARGA DEL SERVICIO**
- ✓ **TEMPERATURA DE LA PARAFINA**
- ✓ **TIEMPO DE LIBERACIÓN DEL INFORME**
- ✓ **TIEMPO DE PROCESAMIENTO**
- ✓ **USO DE FORMOL TAMPONADO**
- ✓ **VIGILAR EL TIEMPO DE FIJACIÓN**
- ✓ **CONTENIDO DEL INFORME (PROTOCOLOS Y MANUALES ADECUADOS PARA CADA DIAGNÓSTICO)**
- ✓ **CLARIDAD DEL INFORME**

1. SECTORES DEL LABORATORIO

1.1 - ÁREA FÍSICA

Un informe de patología es el resultado de la interacción de los distintos sectores del laboratorio actuando en conjunto. Esa actuación debe ser:

- 1- Sinérgica;
- 2- Complementaria;
- 3- Segura;
- 4- Estandarizada;
- 5- Verificada.

Cada conjunto de acciones es realizado por un sector. Para que estos sectores puedan desenvolverse adecuadamente, se debe contar primero con un área física adecuada que permita realizar las tareas de manera satisfactoria y una orientación administrativa consciente y comprometida con la acción realizada.

Existe un desacuerdo sobre el área física mínima para un laboratorio. Sin embargo, en nuestra opinión, para un laboratorio que procesa hasta 50.000 procedimientos de diagnóstico al año, su superficie se estima en unos 100 m². Esta superficie total debe ser redistribuida en función del tipo de actividad que se desarrollará en cada sector, tales como:

Recepción del material	6 m ²
Área técnica (incluye macroscopia)	30 m ²
Área médica	20 m ²
Administración	9 m ²
Secretaría/expedición	9 m ²
Archivo	9 m ²
Almacén	9 m ²
Baños (para ambos sexos)	8 m ²
Total	100 m ²

Es importante señalar que esta estimación de superficie no es una regla, debe adaptarse a cada realidad según el volumen de trabajo, la composición del personal y el diseño arquitectónico.

Como regla general, se debe tener las siguientes preocupaciones ambientales:

- Suficiente iluminación;
- Higienización;
- Ventilación/renovación del aire;
- Seguridad.

Al planificar la instalación del laboratorio, es fundamental considerar los siguientes aspectos:

- Área disponible;
- Distribución de las áreas en relación con los demás sectores;
- Capacidad operativa;
- Recursos humanos por nivel profesional y administrativo;
- Recursos materiales;
- Mantenimiento y conservación.

Además de estos aspectos, se deben considerar las siguientes características específicas:

- Ubicación de acuerdo con el diagrama de flujo del laboratorio;
- El área física debe estar correlacionada con el número de profesionales que trabajarán en el sector;
- Respecto a las condiciones del entorno:
 - El laboratorio debe ser agradable, cómodo y debe estar preferiblemente alejado de lugares ruidosos;
 - Debe tener buena ventilación e iluminación difusa de intensidad moderada;
 - En cuanto al mobiliario (mesa, encimera, silla, bancos, macizos y nivelados), el revestimiento de la mesa o de la encimera debe ser lavable, gris

o verde (con el objetivo de reducir la fatiga visual). Debe haber suficiente espacio para que el usuario pueda disponer fácilmente el material de soporte necesario.

Todo el equipo debe tener conocimientos básicos de cómo afrontar situaciones de emergencia en el laboratorio, así como estar familiarizado con el manejo y la ubicación de los equipos, como extintores de fuego, sistemas de alarma y alertas por la concentración de químicos permitida en el aire y síntomas que indiquen intoxicación y/o envenenamiento.

El laboratorio se compone de los siguientes sectores:

a) Recepción de muestras

En este sector, las muestras deben estar identificadas y acompañadas de las correspondientes solicitudes debidamente completadas (identificación completa del paciente, procedencia del material, datos clínicos y tipo de examen solicitado).

b) Macroscopia

En este sector, las biopsias y piezas quirúrgicas son nuevamente identificadas, descritas y clivadas y posteriormente se envían al sector de procesamiento técnico, luego de una adecuada fijación en solución de formalina tamponada.

c) Procesamiento técnico

En este sector, el ayudante o técnico de laboratorio verificará, antes de realizar el procesamiento necesario de las muestras, que cada muestra se corresponda con la respectiva solicitud. Luego, realizará el procesamiento técnico y remitirá las láminas y las solicitudes para el sector de diagnóstico microscópico.

d) Microscopía

En este sector, se procede a la visualización de las láminas y a su análisis dentro del contexto médico para la emisión del informe.

e) Archivos

Para este sector, se recomienda que las láminas de citología que arrojen un resultado positivo, así como las de histopatología, independientemente del diagnóstico, se archiven durante al menos 5 (cinco) años; para las láminas de citología negativas, es suficiente con que se archive solo la última; los bloques de parafina se archivan durante al menos 10 (diez) años. Las solicitudes y los resultados de los exámenes histopatológicos deben archivar de acuerdo con las técnicas recomendadas para el archivo de informes.

f) Secretaría

En este sector se registran los datos de los resultados de los exámenes (si no han sido registrados directamente por el patólogo) y se expiden los diagnósticos, así como se hace el registro del laboratorio.

Recursos humanos:

a) Composición del personal

- Por nivel profesional:
 - Auxiliar técnico;
 - Técnico de histología;
 - Citotécnico (técnico de citología)*;
 - Citopatólogo; Patólogo.*

*Se recomienda que por cada tres citotécnicos haya un citopatólogo; sin embargo, esta relación 1:3 entre el citopatólogo y el citotécnico puede sufrir cambios a medida que el personal técnico esté más

capacitado. Por lo tanto, en aquellos laboratorios que cuentan con profesionales con más experiencia en su plantilla, se espera que mejoren tanto la productividad como la calidad.

- Por nivel administrativo:
- Responsable del laboratorio (gerente);
- Auxiliar administrativo. Le corresponde al auxiliar técnico, al técnico y al citotécnico:
- Verificar que cada muestra coincida con la respectiva solicitud;
- Verificar la calidad del material que se procesará;
- Procesar muestras citológicas e histológicas;
- Enviar las láminas al sector de diagnóstico microscópico;
- Preparar las soluciones y reactivos;
- Realizar otras tareas relacionadas.

Le corresponde exclusivamente al citotécnico:

- Leer todas las preparaciones citopatológicas y enviar los casos positivos, los casos que tengan alteraciones en el examen físico o colposcopia o que generen dudas al citopatólogo con los campos debidamente marcados;
- Solicitar, cuando sea necesario, la orientación del citopatólogo;
- Participar activamente en la rutina del laboratorio en los sectores de recepción, procesamiento técnico, archivo y documentación.

El citotécnico también debe estar capacitado para la lectura de muestras según su horario laboral:

Trabajo diario	Volumen de trabajo
8 horas	100 láminas
6 horas	80 láminas
4 horas	60 láminas

El citopatólogo es el responsable del diagnóstico de todos los casos, sin embargo, la lectura inicial de las muestras la realiza el citotécnico.

Le corresponde al citopatólogo (como responsable de los diagnósticos citopatológicos):

- Verificar, al menos, el 10 % de los casos negativos y si los diagnósticos son correctos;
- Diagnosticar los casos de citología positiva previamente evaluados por los citotécnicos;
- Aclarar dudas de los citotécnicos;
- Separar los casos de interés científico para su estudio con el equipo del laboratorio;
- Supervisar el trabajo de los técnicos y auxiliares.

Le corresponde al patólogo (como responsable de los diagnósticos histopatológicos):

- Realizar y supervisar la descripción macroscópica y el clivaje de biopsias y piezas quirúrgicas y preparar los informes microscópicos;
- Realizar la correlación citohistopatológica de las lesiones cervicouterinas y de otras localizaciones;
- Separar los casos de interés científico para su estudio con el equipo del laboratorio;
- Supervisar el trabajo de los técnicos y auxiliares.



CAPÍTULO I
ETAPA
PREANALÍTICA

FIJACIÓN

Es un requisito previo la fijación de los frotis, biopsias o piezas quirúrgicas con el objetivo de preservar la estructura celular y preservar los detalles, con un mínimo de distorsiones y artefactos.

Las soluciones que se utilizan para este fin se denominan “fijadores” y su elección depende del material que será examinado, de lo que se pretende estudiar y de la técnica de tinción que se utilizará.

a) Para los exámenes citológicos:

- Alcohol absoluto o alcohol al 95 %;
- Solución fijadora líquida a base de polietilenglicol y alcohol al 95 %, en forma líquida, para uso en “gotas” o *spray*.

Se recomienda que:

- La fijación se realice de forma rápida y adecuada, para evitar el secado con distorsión celular y la pérdida de afinidad del tinte. El tiempo de fijación varía, en promedio, de 10 a 60 minutos. Sin embargo, la muestra puede permanecer en la solución fijadora durante unos días sin sufrir daños;
- Los fijadores deben filtrarse y renovarse periódicamente;
- Use, de preferencia, etanol;
- Los frotis deben estar completamente sumergidos en el recipiente que contiene las soluciones fijadoras.

Cuando los frotis presentan una fijación defectuosa, por ejemplo, se secan, la corrección debe realizarse siguiendo las siguientes pautas:

- Coloque la lámina en un recipiente que contenga glicerina y agua destilada durante 3 minutos; luego báñela en alcohol al 95 % y en agua durante 15 minutos y, finalmente,

fíjelo en alcohol al 95 % durante 10 minutos. Envíelo para la tinción.

b) Para los exámenes histológicos:

La solución fijadora de rutina para la histopatología, biopsia y pieza quirúrgica es formalina tamponada (formol tamponado al 10 %). La muestra debe sumergirse inmediatamente después de su extracción en un recipiente que contenga el agente fijador. El tiempo medio ideal de fijación es de 6 a 48 horas, lo que varía según el índice de fijación. En general, se recomienda que las muestras de 1 mm de espesor permanezcan en el fijador durante 8 horas.

La fijación tiene como objetivo:

1. *La preservación de la morfología del tejido;*
2. *La preservación de los antígenos del tejido.*

Para que esto suceda, el mejor fijador es la formalina (formaldehído al 37 % diluido en una proporción de 9:1).

El formaldehído con el tiempo se oxida y se convierte en ácido fórmico, el que corroe los antígenos de los tejidos, de ahí la necesidad de tamponar el formol, el que conserva el pH entre 7-7,3 y no daña el tejido.

El tiempo de fijación también influye en el resultado. Para que los antígenos se conserven, la fijación debe ser de al menos 6 horas y como máximo de 72 horas; menos de ese tiempo no lo fijará adecuadamente y más que ese tiempo alterará los resultados de la tinción histoquímica, inmunohistoquímica y posibles estudios genéticos o moleculares.

Tiempo de fijación	Estado	Lo que hacer
Menos de 6 horas	No fijado	Esperar que se fije
De 6 a 12 horas	Fijado, pero no está óptimo	Si es posible, espere; si es urgente, procese
12 a 24 horas	Fijación óptima	Procesar lo antes posible
24 a 36 horas	Fijación óptima	Procesar lo antes posible
36 a 48 horas	Fijación óptima	<i>Procesar inmediatamente</i>
48 a 60 horas	Fijado, pero no está óptimo	<i>Procesar inmediatamente</i>
60 a 72 horas	Fijado, pero no está óptimo	<i>Procesar inmediatamente</i>
Más de 72 horas	Súper fijado	<i>Procesar inmediatamente</i>

Entonces es fácil ver el impacto que tiene la recolección correcta y que la fijación sea adecuada. La etapa preanalítica (como todas las etapas) puede definir e influir en el resultado con impacto y cambiar el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento del paciente. Por ello, se recomienda que el laboratorio se ponga en contacto con las unidades clínico-quirúrgicas con las que suele tener relación e informe la forma correcta de almacenaje con el fin de evitar artefactos preanalíticos que, en ocasiones, puede no ser posible corregirlos o minimizarlos.

a) Recepción

Se reciben muestras, fragmentos y piezas quirúrgicas fijadas en formalina tamponada y acompañadas de la “Solicitud de examen”, debidamente completada en los campos:

- Nombre del(la) paciente*;
- Edad/Fecha de nacimiento:
- Sexo (M/F)*;

- Nombre de la madre, cuando sea posible;
- Documento de identificación/Número de historia clínica;
- Material que se examinará*;
- Tipo de examen solicitado (AP, CP, IHQ, IF, PM)*;
- Hipótesis de diagnóstico clínico, cuando sea relevante*;
- Datos de exámenes complementarios;
- Fecha y hora de la recolección, nombre del médico solicitante y su número de matrícula en el Consejo de Medicina (CRM)*;
- Número de frascos.

Registros de las muestras:

Las muestras deben estar registradas. Se sugiere que este registro indique qué procedimiento de diagnóstico se realizará. (Coloque las letras B o PQ antes del número de registro [biopsia o pieza quirúrgica]. B-142/85; PQ-148/85, por ejemplo). El registro solo debe realizarse después de verificar el estado del material que se examinará.

b) Macroscopia

Descripción/selección de las muestras:

Debe realizarse en un ambiente adecuado y con material de soporte específico: guantes, pinzas, tijeras, bisturí, regla, recipientes con soluciones de fijación, lápices, etc. Esta es una tarea médica, pero eventualmente puede ser realizada por un técnico debidamente capacitado, sin embargo, el patólogo es el responsable.

El material se describe en relación a su tamaño, peso, espesor, dimensión, consistencia, tinción y características macroscópicas relevantes. El manejo del material debe ser firme, pero realizado con delicadeza.

Envasado de fragmentos:

Una vez completado el paso anterior, el material se envasa en recipientes adecuados con orificios que permiten la entrada de las soluciones y se sella con una tapa. Luego el material se envía para su procesamiento histológico.

c) Procesamiento histológico

El procesamiento histológico deshidrata y aclara la muestra. Su tiempo puede variar según el tamaño del material, tipo de material, equipos e insumos utilizados. Es fundamental que exista una estandarización en el laboratorio para asegurar que las diferentes muestras lleguen todas con el mismo perfil para el proceso de corte y tinción.

INCLUSIÓN Y CORTE

INCLUSIÓN

Después del procesamiento histológico, el técnico recolecta las muestras y luego las incluye en parafina para que se puedan realizar cortes histológicos. La inclusión debe realizarse de acuerdo con los protocolos de cada muestra y el propósito del diagnóstico, de manera que permita al patólogo evaluar microscópicamente las características necesarias para el informe.

Es importante tener en cuenta algunos puntos:

- Temperatura de la parafina.
 - Se recomienda que esta se controle constantemente y no supere los 68°.
- Pureza y calidad de la parafina
 - Las parafinas impuras pueden ser muy maleables o muy duras, lo que dificulta su manipulación sin necesidad de utilizar agentes espesantes; si es necesario utilizarlos, evite los que contengan ADN exógeno (cera de abejas).

- Identificación de la muestra
 - La inclusión debe hacerse con sumo cuidado y atención de tal manera que no haya cambios en las identificaciones y que sea posible mantener la rastreabilidad de la muestra.
- Cantidad de fragmentos por bloque.
 - Se debe prestar atención a la cantidad de fragmentos por bloque para que sea posible recortar la muestra de forma que se pueda analizar en su totalidad, sin perder algún área.
 - En biopsias con aguja (pulmón, próstata y mama, por ejemplo), no se recomienda que haya más de 3 fragmentos por bloque.

CORTES HISTOLÓGICOS:

Los bloques se someten a cortes, lo que requiere el uso de microtomo y un juego de cuchillas. El bloque se coloca sobre el soporte y, para el corte, debe de haber un ángulo de inclinación adecuado. El conjunto bloque/microtomo se somete al corte, inicialmente para desbastar y nivelar su superficie, de manera que quede alineado y permita cortar una secuencia de bloques en el mismo ángulo, con el fin de ahorrar la muestra.

Después de nivelar los bloques, se realizan cortes histológicos con otro cuchillo. El espesor medio de cada corte es de unos 3 micrómetros. Los cortes, una vez esparcidos, se "pescan" en láminas previamente limpiadas e identificadas. Después de esta etapa, los cortes se secan y luego se desparafinan.

El espesor del corte puede variar según la tinción que se vaya a hacer, el espesor de 3 μm anterior se refiere a la tinción de rutina (HE), pero para el Rojo Congo, por ejemplo, es necesario que sea más grueso, alrededor de 10 μm .

TINCIÓN DE RUTINA

Un laboratorio de patología utiliza múltiples métodos de tinción, cada uno diseñado para una función. La denominada tinción de rutina es la más utilizada. En los procedimientos histológicos se utiliza la tinción basada en hematoxilina y eosina y, en citología, la tinción de Papanicolaou.

Citopatología

Las muestras se procesan según la técnica de Papanicolaou:

- Alcohol etílico al 80 %;
- Alcohol etílico al 70 %: de 6 a 8 inmersiones en cada recipiente;
- Alcohol etílico al 50%;
- Agua destilada: de 20 a 30 segundos (hasta que el agua fluya naturalmente de la lámina);
- Hematoxilina de Harris: de 1 a 3 minutos (tinte nuclear);
- Agua: eliminar el exceso de tinte;
- Solución saturada de carbonato de litio;
- Solución de HCl al 1 %: de 6 a 8 inmersiones en cada recipiente;
- Agua corriente: 6 minutos;
- Alcohol etílico al 50%;
- Alcohol etílico al 70 %: de 6 a 8 inmersiones en cada recipiente;
- Alcohol etílico al 80 %;
- Alcohol etílico al 95%;
- Orange G 6: 1 minuto y 30 segundos;
- Alcohol etílico al 95 %: 1 minuto;
- Alcohol etílico al 95 %: 1 minuto;
- EA – 26;
- Alcohol etílico al 95 %: 1 minuto;
- Alcohol etílico al 95 %: 1 minuto;
- Alcohol etílico al 100%: 1 minuto;
- Xilol: 1 minuto;

- Xilol: 1 minuto;
- Xilol: 1 minuto;
- Montaje de las láminas

Otra opción es la técnica de Shorr “modificada”:

- Alcohol etílico al 80 %;
- Alcohol etílico al 70 %: de 6 a 8 inmersiones en cada recipiente;
- Alcohol etílico al 50%;
- Agua destilada: de 20 a 30 segundos (hasta que el agua fluya naturalmente de la lámina);
- Hematoxilina de Harris: de 6 a 10 minutos (tinte nuclear);
- Agua: eliminar el exceso de tinte;
- Tinte "Shorr": 1 minuto;
- Alcohol etílico al 95 %: 1 minuto;
- Alcohol etílico al 95 %: 1 minuto;
- Xilol: 1 minuto;
- Xilol: 1 minuto;
- Montaje de las preparaciones.

Histología

La técnica de tinción de rutina es la de HE (Hematoxilina - Eosina). La lámina que contiene el corte ya desparafinado e identificado debe ser sometida al siguiente proceso:

- Agua destilada: de 6 a 8 minutos; Hematoxilina: 10 minutos;
- Agua: eliminación del exceso de tinte;
- Solución de HCl al 1 %: de 6 a 8 inmersiones;
- Agua corriente (control del tinte del núcleo/microscopio);
- Eosina: de 1 a 2 minutos;
- Alcohol etílico al 95 %: de 6 a 8 inmersiones;
- Xilol;
- Xilol – Montaje.

Tras el proceso de tinción, en cualquiera de las técnicas, las láminas se secan, se sumergen en xilol, se clarifican y se diafanizan. El montaje se realiza con bálsamo de Canadá o similar y xilol.

Se debe etiquetar con el número del registro del laboratorio después de verificar que coincida la preparación con la solicitud del caso.

TINCIONES HISTOQUÍMICAS (ESPECIALES)

Hay muchos tintes especiales posibles; es imposible enumerarlos a todos, cada tinte tiene un propósito específico: búsqueda de agentes infecciosos (hongos, B.A.A.R, bacterias, etc.), búsqueda de metales e iones (Perls, Rodanina para hierro y cobre; por ejemplo), búsqueda de glucógeno (PAS, por ejemplo).

Al final del manual, tenemos una recopilación de cómo preparar la mayoría de las tinciones (de rutina y especiales) en un laboratorio, y se recomienda dar preferencia al uso de kits preparados, por la facilidad de su estandarización. Si la tinción se realiza *in house*, será necesario validarla antes de su uso, así como comprobar los tiempos de inmersión antes de la rutina.

TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Cuando apareció por primera vez la técnica de inmunohistoquímica, se difundió enseguida y revolucionó la patología. Esta revela la expresión proteica del tejido, lo que permitió profundizar en el conocimiento de las neoplasias, refinar sus subclasificaciones y, con ello, personalizar cada vez más los tratamientos con resultados cada vez mejores. Existen varias técnicas de inmunohistoquímica, con pequeñas variaciones de una a otra, sin embargo, sus pasos básicos involucran:

1. Fijación adecuada:
 - a. La muestra debe fijarse en formol tamponado al 10 %, durante un periodo no inferior a 6 horas e idealmente no superior a las 72 horas;

- b. La muestra no debe tener isquemia fría durante más de una hora;
 - c. La muestra debe procesarse lo antes posible.
2. Procesamiento histopatológico adecuado;
 - a. La muestra, bien fijada, pasará por los procesos de deshidratación y diafanización; si esto no es adecuado, la conservación del tejido **no será adecuada posteriormente y puede dañar la muestra almacenada en el bloque de parafina.**
3. Selección de anticuerpos;
 - a. La inmunohistoquímica es una herramienta de precisión y no una ametralladora rotatoria, es necesario tener claro el objetivo del procedimiento y seguir los pasos y protocolos, y muchas veces son varias reacciones, una tras otra, según la dirección del diagrama de flujo.
4. Desparafinado y recuperación antigénica;
 - a. Es necesario permitir el contacto íntimo del anticuerpo con el antígeno que se está estudiando, y para eso, el antígeno debe conservarse (fijación) y exponerse. El proceso de fijación “oculta” los epítomos antigénicos y se pretende que la recuperación antigénica quede expuesta, lo que permite que se produzca la reacción antígeno-anticuerpo.
5. Incubación del anticuerpo;
 - a. Con el antígeno preservado y expuesto, el anticuerpo se incuba para que se produzca la reacción con el antígeno;
 - b. Se elimina su exceso y luego se agrega el polímero para amplificar el desarrollo del cromógeno; también se eliminan los excesos.
6. A continuación, la muestra se contratiñe con hematoxilina y la lámina se ensambla de la forma habitual para la lectura.

Es importante destacar la estandarización de las reacciones. Aunque la mayoría de los anticuerpos hoy en día están listos para usarse, esto no significa que la estandarización sea la misma. Múltiples factores influyen e impactan en esto, por nombrar algunos:

- Temperatura;
- Humedad;
- Presión atmosférica;
- Tiempo de incubación;
- Calidad del agua;
- Inclinación de la encimera;
- Almacenamiento de insumos;
- Fijación de la muestra;
- Procesamiento de la muestra;
- Calidad de la parafina de la muestra;
- Almacenamiento de los bloques;
- ...

Como se dijo, la inmunohistoquímica es una continuación del procedimiento habitual, por lo que la calidad de esta impacta directamente en su resultado.

TÉCNICAS PARA LA PATOLOGÍA MOLECULAR.

Objetivo:

- Buenas prácticas para que los laboratorios incorporen a su flujo de trabajo de la anatomía patológica en la rutina habitual en todos los casos, teniendo en cuenta que el material se utilizará para pruebas moleculares;
- Conceptos para la selección de materiales por parte del patólogo para pruebas moleculares;
- No tiene como objetivo describir técnicas moleculares.

Conceptos:

- La mayoría de las pruebas moleculares en oncología se realizan en tejido fijado en formalina e incrustado en parafina, por lo que es necesario un cuidado especial en todas las etapas que implican el procesamiento de un espécimen anatomopatológico para garantizar la calidad y la viabilidad de la realización de una prueba molecular;
- Como prueba molecular, se consideran aquellas que utilizan moléculas de ADN y/o ARN mediante técnicas de secuenciación, PCR y sus variantes, metilación, expresión génica, hibridación *in situ* de ADN y/o ARN. También incluye biomarcadores estudiados en estudios inmunohistoquímicos y, por tanto, proteínas;
- Hay que considerar que cualquier muestra puede potencialmente estar indicada para su uso en pruebas moleculares, en el momento presente o futuro, en el escenario de diagnóstico de rutina con fines de tratamiento o investigación, con el consentimiento del paciente y es responsabilidad del laboratorio que procesó el espécimen garantizar la integridad de las moléculas de ADN/ARN y proteínas;
- El flujo solo será incorporado por todos los sectores del laboratorio si los empleados se comprometen con los conceptos básicos mínimos de la patología molecular, su importancia y aplicaciones;
- Algunos conceptos se abordaron previamente dentro de cada tema específico de este manual (por ej.: fijación, corte, etc.), pero se reforzarán y complementarán aquí para el contexto específico de la prueba molecular;
- El cuidado relacionado con la prueba molecular incluye tanto el flujo del laboratorio, apuntando a la preservación/integridad de las moléculas, como el concepto de contaminación entre especímenes, que en el escenario molecular puede ser mucho más microscópico que en el escenario de rutina de la evaluación de HyE.

Cuidado preanalítico con la muestra para su uso en pruebas moleculares

Tiempo de isquemia (tiempo entre la extracción del espécimen del paciente y su inserción en un fijador):

- Después de la remoción, el material debe colocarse inmediatamente en formalina tamponada, con un tiempo ideal de hasta 10 min y un tiempo aceptable de hasta 1 hora.

Fijación:

- Uso de formalina tamponada al 10 % con un pH entre 6,9 y 7,1.
 - Es necesario obedecer las recomendaciones generales sobre el volumen de fijación para el volumen de tejido de al menos 5:1 y preferiblemente 10:1;
 - Se debe sumergir el tejido completamente en el fijador;
 - Se debe establecer el flujo en quirófanos y/o laboratorios para clivaje de los especímenes grandes para su fijación si la macroscopia no se va a realizar de forma inmediata;
 - Tiempo de fijación: mínimo 6 horas, máximo 24-48 horas según el tipo de tejido.

Macroscopia:

- Hay que prestar atención a las posibilidades de contaminación cruzada en muestras macroscópicas, incluidas las biopsias pequeñas y las piezas grandes. Cuidado en el uso de pinzas y cuchillas limpias entre los casos y refuerzo de limpieza de la encimera de trabajo;
- El espesor de los cortes de las piezas quirúrgicas para permitir una adecuada fijación y un adecuado procesamiento histológico. En general, un máximo de 4-5 mm de espesor;
- Protocolo de separación de fragmentos de biopsias en macroscopia en más de un bloque para optimizar el uso de la muestra entre las diversas necesidades de estudios complementarios.

Descalcificación:

- Para las pruebas moleculares, lo ideal es evitar la descalcificación siempre que sea posible, ya que se sabe que las soluciones descalcificantes dañan los tejidos y provocan una mayor degradación de las moléculas. En un intento por evitar daños en los tejidos, se debe intentar hacer lo siguiente antes de descalcificar:
 - Raspado/frotis/“*imprinting*” de biopsias óseas en el momento del procedimiento para obtener una muestra de células citológicas sin descalcificación para su uso en pruebas moleculares. Estos se pueden fijar en alcohol;
 - Separación macroscópica de la parte ablandada de la parte endurecida del material para su inclusión en diferentes bloques con y sin descalcificación.
- Antes de ser sometido a cualquier proceso de descalcificación, se debe fijar el material previamente;
- Ante la necesidad de realizar la descalcificación, el uso de EDTA es más adecuado que otros tipos de ácidos. Se debe prestar atención a:
 - Evitar la exposición prolongada no necesaria. Individualizar el tiempo de exposición a la solución descalcificante con controles frecuentes y no solo siguiendo el tiempo estándar;
 - Se debe lavar adecuadamente el fragmento después de la descalcificación y antes de procesamiento.

Procesamiento histológico

- Si es de procesamiento manual, se debe contar con mecanismos de control para garantizar los intervalos de tiempo para cada paso;
- Si es automático de “sistema abierto”, se debe contar con mecanismos de seguridad en caso de falla del dispositivo, como, por ejemplo, usar el dispositivo solo cuando hay personas en el laboratorio;
- Si es automático de “sistema cerrado”, se debe asegurar de que el mantenimiento preventivo y el intercambio de reactivos sean adecuados de acuerdo con las instrucciones del fabricante;
- Control de calidad, pureza y frecuencia del cambio de reactivos.

Inclusión:

- Uso de parafina de alta calidad (baja temperatura de derretimiento, se recomienda por debajo de 60°C) para evitar que se someta el tejido a altas temperaturas y la consiguiente degradación de las moléculas;
- No se debe mezclar ni agregar otros tipos de sustancias a la parafina;
- No se debe reutilizar la parafina (hay riesgo de contaminación de las muestras);
- Se debe intentar desechar las posibilidades de contaminación en el proceso de inclusión, como el cuidado con la pinza y la encimera del inclusor, entre otros.

Microtomía:

Aquí, consideraremos los detalles de la rutina de microtomía para los cortes que se utilizarán con fines moleculares.

- Contaminación:
 - Es necesario realizar cuidados intensos para eliminar la posibilidad de contaminación entre los casos. Lo ideal es que se capacite a un técnico para esta rutina específica, se debe apartar un momento de la rutina y un microtomo específico para el uso de los cortes con propósito molecular;
 - Se recomienda para los casos en los que se realizará la extracción de moléculas (ADN y/o ARN), si es posible:
 - Es necesario evitar el uso de agua corriente y reemplazarlo con agua destilada y/u otros tipos de agua purificada;
 - Se debe usar una cubeta separada de baño maría en relación a la rutina general, con intercambio de agua entre los casos;
 - Se debe usar de cuchilla individual para cada caso;
 - Uso de guantes por parte del técnico para manipular el material;
 - Uso de soluciones que contienen ADNasas y ARNasas para limpiar el microtomo y las superficies entre los casos.

- Tipos de láminas y/o tubos:
 - Pruebas de hibridación *in situ*: láminas cargadas;
 - De uso para extracción de ADN y/o ARN: láminas sin carga. Tubo eppendorf estéril.

- Espesor del corte:
 - El espesor del corte dependerá del tipo de prueba que se vaya a realizar y de la señalización previa del patólogo sobre el tipo de corte que se deba hacer:
 - Pruebas de hibridación *in situ* (FISH/CISH/SISH):
 - FISH: cortes de 3-7 micras según el tejido.
 - Para una extracción posterior de ADN y/o ARN:
 - Si luego de la indicación del patólogo de que será necesario enriquecer el área del bloque con una disección manual (“scrapping”), se debe realizar cortes en las láminas sin carga con un espesor de 5 a 10µm, dependiendo de la experiencia y validación del laboratorio. Es ideal colocar solo un corte de tejido por lámina;
 - Si luego de la indicación del patólogo de que no será necesario enriquecer el área del bloque, sino que se utilizará el área total del tejido, se debe realizar cortes de 5 a 10µm (“rodillo”) y colocarlos directamente en un tubo Eppendorf estéril:
 - Es necesario prestar atención al volumen excesivo de parafina en el tubo.

- Almacenamiento de láminas y/o tubos después del corte:
 - Láminas para pruebas de hibridación *in situ*: hasta que se realice la reacción, el cuidado del almacenamiento de las láminas debe seguir las mismas indicaciones que el de las láminas para el estudio inmunohistoquímico. Puede conservarse a temperatura ambiente y con baño de parafina;
 - Láminas para su uso en la extracción de ADN y/o ARN: dejar secar. Después del secado, se puede almacenar a temperatura ambiente durante unos días;

- En ambas situaciones, lo ideal es intentar cortar las láminas solo con el uso previsto.

Archivo/Almacenamiento de bloques:

- Los bloques de parafina deben garantizar que se almacenen en lugares:
 - Sin humedad;
 - Sin exposición directa a la luz solar;
 - Libres de la posibilidad de contaminación por agentes biológicos externos, como hongos y bacterias;
 - Temperatura ambiente (18°C - 25°C).

Selección de casos para pruebas moleculares por parte del patólogo:

- Elección de la muestra que se estudiará:
 - Debe realizarse junto al entendimiento de la prueba solicitada y con el médico solicitante y considerar los siguientes elementos:
 - Biopsia o pieza quirúrgica;
 - Antes o después de determinado tratamiento (quimioterapia, tratamiento con fármaco objetivo, radioterapia);
 - Primario o metástasis;
 - Tumores sincrónicos;
 - Edad de los especímenes y condición de almacenamiento del material.
- Elección del bloque que se tratará dentro de un espécimen:
 - Debe realizarse junto al entendimiento de la prueba. Para los casos en los que se requiere una muestra de tumor para la extracción de ADN y/o ARN, considere:
 - Muestra con una combinación de mayor volumen tumoral y pureza tumoral (celularidad tumoral). Para este ítem, considere el porcentaje de núcleos tumorales en relación con los núcleos no tumorales (linfocitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliales, vasos, estroma, etc.). Un error frecuente es considerar

- al área ocupada por el tumor en detrimento del contenido de esa área;
- Se debe evitar las áreas de necrosis, pigmentación intensa, exceso de mucina y áreas con artefactos de fijación.
 - Elección del método del corte que se va a realizar para la extracción de ADN y/o ARN:
 - Es posible utilizar el corte completo del bloque (tubo) para la extracción o los cortes en láminas histológicas (*scrapping*) para la disección manual cuando es necesario el enriquecimiento de la célula tumoral en la muestra:
 - El corte total se puede realizar cuando la celularidad tumoral obedece a la mínima necesidad establecida para la realización de la prueba molecular. Cada prueba molecular tiene una necesidad específica de un porcentaje de celularidad tumoral. Las técnicas más modernas, como la secuenciación de nueva generación (NGS), generalmente se validan para probar los casos con un mínimo de celularidad tumoral de hasta el 20 %;
 - Las láminas para la disección manual se realizan cuando se considera que el uso del corte total del bloque no obedece a la cantidad mínima de pureza tumoral necesaria para la prueba o daría lugar a la inclusión de muchas áreas de necrosis, mucina, pigmento, entre otras. Para ello, el patólogo selecciona en la lámina de HyE el área que debe ser diseccionada por el técnico en el laboratorio de patología molecular.



CAPÍTULO II
ETAPA
ANALÍTICA

ETAPA ANALÍTICA

La etapa analítica tiene como objetivo concretar el producto del análisis del patólogo. La medicina es un arte basado en la estadística y en los modelos matemáticos, cuya parte subjetiva es la interpretación de los signos y síntomas que presenta y reporta el paciente, transformándola en datos brutos y diagnósticos.

La patología, más que otras especialidades, se basa en y sufre con eso. Muchas de nuestras evaluaciones tienen un gran sesgo de subjetividad y, por lo tanto, pueden variar ampliamente. Debido a esto, existe una recomendación para algunos cuidados universales:

- Cada muestra debe tener una identificación única, la que permita su identificación y ubicación durante todo el proceso;
- La muestra completa siempre debe estar correlacionada con los diagnósticos previos;
- Siempre que sea posible (principalmente en diagnósticos que involucran neoplasias malignas), se debe verificar el diagnóstico;
- Antes de iniciar la rutina de tinción y esta sea revisada y, si es necesario, ajustada;
- Cada lectura de lámina debe realizarse dentro de los límites de la institución:
 - Límite físico de la estructura del laboratorio convencional;
 - Límite virtual; con el advenimiento de la telepatología, los límites se han extendido más allá de lo físico, pero cuidado, no se permite realizar la lectura en cualquier computadora y en cualquier lugar. La telepatología no es más que una nueva herramienta para realizar la misma especialidad, por lo tanto, requiere las mismas precauciones de rutina (agregadas a otras específicamente relacionadas con el entorno digital/virtual), el entorno debe contar con un permiso sanitario, debe ser un ambiente tranquilo que permita la consulta de referencias bibliográficas.

- Los procedimientos de laboratorio deben estar organizados y formalizados (la nomenclatura estándar para estos documentos es POE - Procedimientos Operativos Estandarizados);
- Es necesario estar atento y ser cuidadoso con la carga de trabajo de los colaboradores, para que no se sobrecarguen y puedan dedicarse de manera adecuada;
- Se debe utilizar la estandarización de los informes de la OMS, la que se puede complementar con protocolos específicos (SBP, CAP, RCP, etc.).
- Diagnósticos críticos. Es una de las pocas situaciones de emergencia en patología. Una situación de riesgo de muerte para el paciente o una situación en la que sea necesario actuar lo antes posible. A continuación, se presentan algunas situaciones y consideraciones posibles sobre su peso, impacto y sugerencias para tomar medidas.

Diagnóstico crítico

El diagnóstico crítico se define como cualquier situación que:

- Pueda indicar riesgo de muerte para el paciente;
- Hallazgos inesperados en condiciones triviales;
- Hallazgos discrepantes en relación a exámenes o diagnósticos previos, con posible alteración de la conducta clínica.

Condición	Descripción
Casos con consecuencias clínicas inmediatas.	Material de vísceras en punciones de cavidades huecas.
	Grasa en muestras de curetaje.
	Células mesoteliales en biopsia cardíaca.
	Grasa en mucosectomías.
	Signos de rechazo agudo en trasplantes.
	Glomerulonefritis crescéntica.
	Vasculitis leucocitoclástica.
	Curetaje por aborto sin vellosidades ni células trofoblásticas.
	Neoplasias malignas en síndromes de vena cava superior.
	Infiltraciones neoplásicas que causan parálisis.
Inflamatorios o infecciosos.	Neoplasias hematopoyéticas de alto grado de malignidad.
	Microorganismos en el líquido cefalorraquídeo.
	Microorganismos en lavados broncoalveolares.
	Hongos por punción de aguja fina
	Colonias bacterianas en válvulas cardíacas.
	Herpesvirus en la citología cervicovaginal.
	Material abscedido inesperado.
	Enfermedad granulomatosa crónica no sospechada.
	Cuerpos extraños en piezas quirúrgicas.
	Hallazgos inesperados o discrepantes.
Desacuerdo mayor entre los hallazgos citológicos de la punción por aspiración y el material tisular.	
Desacuerdo mayor entre la evaluación <i>in situ</i> y el resultado definitivo en los procedimientos de intervención.	
Neoplasias en localizaciones poco comunes (sacos herniarios, disco intervertebral, productos para hemorroidectomía, amigdalectomías o	
Ausencia de material anatómico mencionado en la solicitud de examen.	
Frascos sin su material detectable.	
No confirmación del diagnóstico en un paciente con cirugía programada que implique un procedimiento quirúrgico diferente.	

Neoplasias

Hallazgo o confirmación de neoplasias en procedimientos diagnósticos.

Desacuerdo entre la impresión clínica de la neoplasia y su ausencia en el material histopatológico.

Presencia de neoplasia maligna en casos de diagnóstico clínico de neoplasia benigna.

Procedimientos para la confirmación de metástasis.

Desacuerdo entre el diagnóstico original y la revisión del caso, interna o externa.



CAPÍTULO III
ETAPA
POSANALÍTICA

ETAPA ANALÍTICA

La fase posanalítica es el cuidado que se toma después de que se publica el informe, como por ejemplo:

- Informe emitido dentro del plazo acordado;
- Si se ve que habrá un retraso, es necesario notificar al paciente de manera oportuna;
- La entrega de los resultados debe realizarse a través del protocolo de entrega;
- Un contenido del informe adecuado, que traiga al menos:
 - Nombre del paciente, edad, sexo y su registro de identificación en la institución (número operativo) y otro parámetro de identificación siempre que sea posible;
 - Nombre del médico/profesional que solicita el examen;
 - Legible, en español, fechado y firmado por un patólogo o citopatólogo responsable;
 - Debe contener la identificación de la institución, con dirección completa y número de teléfono en un área visible;
 - Nombre y registro en el Consejo de Medicina (CRM) del Responsable Técnico de la institución;
 - Debe tener la fecha de recolección (cuando se registre en la solicitud médica) y el ingreso de la muestra a la institución;
 - Debe tener la fecha de emisión del informe;
 - Especificación del tipo de examen realizado, el sitio anatómico de donde se obtuvo la muestra;
 - Metodología utilizada para realizar el examen, cuando corresponda;
 - Descripción de la macroscopia, con designaciones específicas de bloques de acuerdo con el clivaje en las piezas donde hay más de una región/sitio anatómico (obligatorio), descripción de la microscopía (opcional);
 - Conclusión diagnóstica;
 - Observaciones pertinentes a la interpretación del informe, cuando sea aplicable.
- Si se requiere una rectificación, y esto se encuentra en un área crítica, no se puede cambiar. Se deben conservar los datos anteriores

y se deben realizar complementos que permitan su rastreabilidad e identificación;

- Rastreabilidad y control de acceso y seguridad para los usuarios de TI.

SOPORTE

La patología es una rama de la medicina singular y única. Además de toda su complejidad técnica y de conocimientos (que tienen todas las áreas), debido a la necesidad de las etapas y los procesos, es obligatoriamente una actividad multidisciplinar y multiprofesional. Es, por tanto, obligatoriamente una empresa.

Y, como toda empresa, es necesario contar con lo que se denomina un área de soporte. Las áreas de soporte son todas las áreas y sectores de la empresa que no están directamente vinculados a la actividad principal, tales como:

- Facturación;
- Control de calidad;
- Digitación (en caso de haber);
- Dirección;
- RR.HH.
- Limpieza;
- Contabilidad;
- TI;
- Eliminación de materiales;
- Departamento Jurídico;
- Etc.

Aunque todas las áreas son necesarias para el desarrollo, algunas pueden ser subcontratadas y ejecutadas fuera de la empresa (el área contable y jurídica, por ejemplo).

Existen varios modelos y formas de dirigir una empresa; el que recomendamos para obtener un mejor sistema organizacional

es el Cuadro de Mando Integral (CMI, o algo equivalente).

El CMI es una metodología que demuestra la interconexión de los sectores de la empresa y su impacto. Su definición se obtiene mediante el mapa estratégico de la empresa.

El mapa estratégico está diseñado de la siguiente manera. En primer lugar, **se debe tener** un objetivo claro sobre hacia dónde se quiere ir, una visión de futuro por la que se quiere ser reconocido. Esta visión perfila, por tanto, la misión, su razón de existir, que está parametrizada por los valores (individuales de los fundadores y del colectivo de los colaboradores), la empresa trabaja insertada en un contexto y, por tanto, es necesario analizar el entorno en el que se inserta y, a partir de ahí, imaginar posibles escenarios futuros. Con los escenarios futuros establecidos, se trazan objetivos estratégicos que dirigen a la empresa **hacia** su visión previa establecida, y cada objetivo estratégico se logra mediante uno (o más) planes de acción.

- Visión;
- Misión;
- Valores;
- Análisis del ambiente (S.W.O.T.);
- Escenarios;
- Objetivos estratégicos;
- Plan de acción:
 - Planificado;
 - Desenvuelto;
 - Verificado;
 - Actuar.

Un plan de acción, para que pueda ser planificado, ejecutado y medido, debe seguir unas premisas básicas, debe tener su objetivo claro y establecido, un lugar de ejecución, un plazo para ejecutarlo, un responsable de su ejecución, y este responsable debe tener las herramientas adecuadas, un

presupuesto establecido y una razón (que esté alineada con los objetivos estratégicos)

¿Qué?	¿Dónde?	¿Plazo?	¿Quién?	¿Cómo?	¿Cuánto?	¿Por qué?
¡Iniciativa!	¡Local!	¡Periodo!	¡Responsable!	Herramienta	¡Costo!	Objetivos estratégicos

Los objetivos estratégicos pueden variar de un laboratorio a otro, pero, por regla general, **hay 4 áreas de actividad**:

1. Financiero 4;
2. Clientes 3;
3. Procesos 2;
4. Personal 1.

No hay ninguno que sea más importante que el otro, todos están interconectados y codependientes. Para que haya lucro, los médicos y pacientes deben confiar y buscar el laboratorio, y para que ellos confíen, los procesos deben estar actualizados y bien ejecutados y, para eso, se depende de personal capacitado, trabajando con herramientas adecuadas, en un ambiente armonioso y decente.

Con los objetivos estratégicos definidos, guiados por la visión y con planes de acción trazados, tenemos el mapa estratégico.

Mapa estratégico		
<i>Foco</i>	<i>Objetivo</i>	<i>Acción (de los planes de acción trazados)</i>
<i>Financiero</i>		
<i>Clientes</i>		
<i>Procesos internos</i>		
<i>Gestión de personas</i>		

Y con el mapa estratégico y los planes de acción, tenemos el CMI de la empresa:

Cuadro de Mando Integral					
<i>Foco</i>	<i>Objetivo</i>	<i>Indicadores</i>	<i>Meta</i>	<i>Iniciativas</i>	<i>Actual</i>
<i>Financiero</i>					
<i>Clientes</i>					
<i>Procesos internos</i>					
<i>Gestión de personas</i>					

Veán que en el CMI ha surgido un término de lo que quizás hayan oído hablar: indicadores. Son la forma de monitorear cómo se desarrollan los planes de acción, si las acciones tomadas son satisfactorias o si necesitan alinearse.

Las siguientes son algunas sugerencias para los indicadores en patología. Indicadores del proceso:

- Tiempo de liberación del examen:
 - Establecer metas;
 - Establecer parámetros aceptables.
- Relación de número de bloques/día:
 - Establecer unidad temporal.
- Relación de concordancia en las revisiones;
- Relación de concordancia en citología:
 - Interna;
 - Comparar con el esperado de Bethesda.
- Competencia en PICQ:
 - Externa (SBP);
 - Interna – mínimo del 80 %.
- Número de exámenes de doble verificación:
 - Meta (40 % reanalizar);
 - Parámetro aceptable.

Indicadores de la imagen:

- Número de reclamo de los clientes:
 - Internos;
 - Externos.
- Encuesta con clientes:
 - Médicos;
 - Pacientes;
 - Hospitales y clínicas;
 - Operadoras.
- Número de exámenes por médico.

Indicadores económicos:

- Costo por examen;
- Valor de compra del papel;
- Números de la segunda copia;
- Números de *glossa*.



CAPÍTULO IV

DESECHO

Tiempo de almacenamiento para cada tipo de material:

- 10 años para bloques de parafina y citologías cervicovaginales positivas;
- 3 meses para residuos de piezas quirúrgicas (a partir de la publicación del informe);
- 5 años para láminas (biopsias/piezas quirúrgicas/inmuno histoquímica y citología);
- 5 años para láminas de citología cervicovaginal negativas (pudiéndose conservar solo la última citología de la paciente y descartar las demás);
- Después de enviar el informe impreso al paciente/clínica/hospital donde se atiende al paciente, ya no existe la obligación de retener una copia impresa, sin embargo, la copia virtual/digital debe archivar permanentemente;
- Si no hay digitalización de documentos, los pedidos deben conservarse durante veinte (20) años;
- Si los documentos están digitalizados, con nivel de seguridad 2, los documentos pueden desecharse inmediatamente después de su uso. Sin embargo, se recomienda que se guarde por 5 años.

Al finalizar la actividad, las sobras deben tener un destino, se puede optar por reutilizar y reciclar lo posible (como xilol, por ejemplo), reventa (de xilol para empresas de tinta, por ejemplo) o su eliminación.

Cada residuo tiene sus propias reglas de almacenamiento y desecho, las cuales deben ser incluidas en el PGRS del laboratorio, siguiendo la legislación nacional, estatal y municipal. Por lo tanto, es imposible enumerar los estándares aquí si funcionan y se aplican de manera literal difusa. Sin embargo, es posible brindar pautas y cuidados básicos:

- **Residuos administrativos:**
 - Se debe desechar de acuerdo con la basura común y seguir los lineamientos, rutinas y flujos definidos por el PGRSS, considerando los colores recomendados por la recolección selectiva.

- **Residuos hospitalares:**
 - Se debe desechar en bolsas de plástico blancas, en las que se debe imprimir el símbolo de peligro biológico; solo debe llenarse hasta la mitad y cerrarse para evitar que se derrame su contenido. Estas bolsas deben depositarse en el lugar adecuado definido para lo contemplado en el PGRS.
- **Residuos punzantes/cortantes:**
 - Este grupo incluye las cuchillas enteras, las rotas, las láminas y otros objetos cortantes que deben desecharse en un recolector rígido (Descartex). El recolector debe colocarse cerca del lugar donde haya mayor probabilidad de rotura de las láminas;
 - Cuando el recolector alcanza su límite de carga (línea punteada negra cerca del borde superior de la caja) debe desecharse junto al sistema de recolección;
 - Las láminas que contienen muestras que han sido analizadas deben conservarse durante al menos 5 (cinco) años.
- **Residuos sólidos:**
 - Se deben desechar en una bolsa de plástico de color blanco lechoso que contenga un símbolo de peligro biológico; cuando sea posible, usar cajas duras para evitar que la bolsa se rompa y se derrame;
 - Cada caja debe estar identificada de tal forma que sea posible localizar el residuo de la muestra biológica hasta que se deseche:
 - *Año referente a las piezas analizadas;*
 - *Responsable del almacenamiento en cajas;*
 - *Fecha en que se lleva el material al archivo (almacenamiento secundario);*
 - *Periodo de entrada de piezas en el laboratorio;*
 - *Previsión de la eliminación (siempre a partir de los 90*

- **Residuos líquidos:**

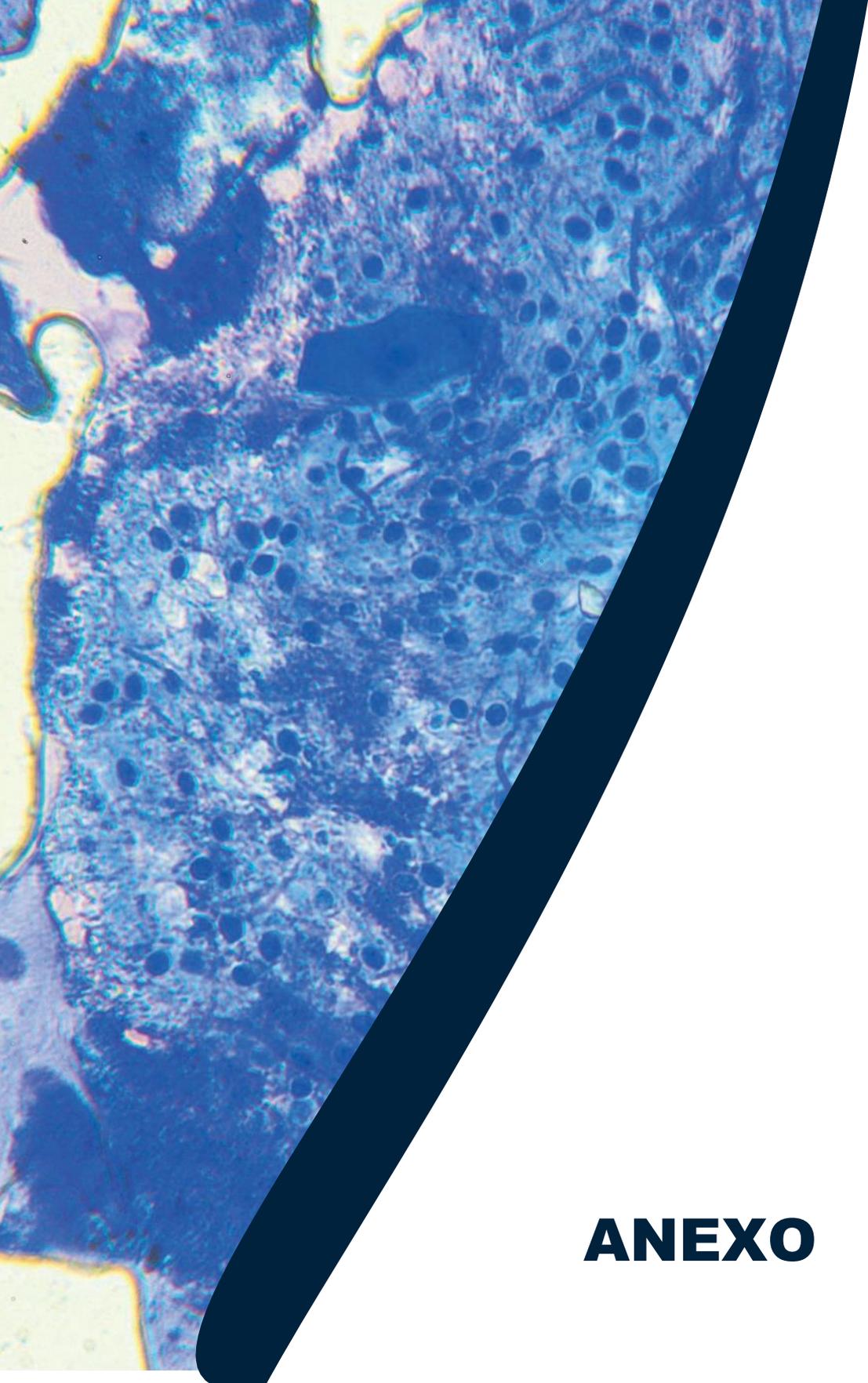
- Se deben desechar en recipientes vacíos, e identificar el tipo de producto (xilol, formol, etc.), manteniéndolo siempre tapado. No llenar completamente el recipiente, se deja un espacio para la acumulación de gases;
- Se debe mantener el ciclo de recolección de acuerdo al cronograma acordado con la empresa responsable de la recolección, según lo especificado en el PGRS.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- ANVISA. RDC 50, DE 21 DE FEBRERO DE 2002. Disponible en: [https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao?task=cal-element&format=raw&item_id=337&element=f-85c494b-2b32-4109-b8c1-083cca2b7db6&method=-download&args\[0\]=47a423c23b39f942eb3f171b9e71aeb8](https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao?task=cal-element&format=raw&item_id=337&element=f-85c494b-2b32-4109-b8c1-083cca2b7db6&method=-download&args[0]=47a423c23b39f942eb3f171b9e71aeb8). Accesado el: 21 feb. 2002.
- ANVISA. RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 302, DE 13 DE OCTUBRE DE 2005. Disponible en: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_302_2005_COMP.pdf/7038e853-afae-4729-948b-e-f6eb3931b19. Accesado el: 14 oct. 2005.
- DAKO. Immunohistochemical Staining Methods. Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08002_ihc_staining_methods.pdf. Accesado el: 7 abr. 2013.
- LEICA. Difficult Blocks and Reprocessing. Disponible en: https://www.leicabiosystems.com/fileadmin/biosystems/PDF/95.9890_Rev_C_Difficult_Blocks_and_Reprocessing.pdf. Accesado el: 20 ago. 2015.
- MICHALANY, Jorge. Técnica histológica em Anatomia Patológica: Com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 1. ed. Sao Paulo: EPU, 1980. p. 1-277.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Apoio diagnóstico e terapia. Disponible en: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/apoio_diagnostico_terapia_anatomia_patologica.pdf. Accesado el: 30 dic. 2005.
- GONÇALVES, Dalton. “Física”. Livro Técnico. 4ª edición/1967.
- EÇAK, Maria Luiza. “Biologia Moderna”. Nobel S.A. 2ª edición/1975.
- DE ROBERTIS, Nowinski e Saez. “Biologia Celular”. El Ateneo do Brasil. 2ª edición/1974.
- LUNA, Lee G.: “Manual of Histologic Staining Methods”-MC Graw Hill Book Company-3ª edição/1968.

- SERAPIÃO, C. J.; SILVA, P. F. O. Demonstração de Treponemas em Tecidos.
- CONN, H. J.; DARROW, Mary A.; EMMEL, Victor M. "Staining Procedures". The William & Wilkins Company. 2ª edición/1960.
- KRAJIAN, Aran A.; GRADWOHL, R. B. H. "Histopathological technic". The C.V. Mosby Company. 2º edición/1952.
- SERAPIÃO, C. J.; SERAPIÃO, M. J.; SANTANA, L. L. Curso Intensivo de Histotecnología, Manaus, 1976. Div.Nac.Câncer.
- COMPTON, C. C.; ROBB, J. A.; ANDERSON, M. W. et al. Preanalytics and Precision Pathology: Pathology Practices to Ensure Molecular Integrity of Cancer Patient Biospecimens for Precision Medicine. Arch Pathol Lab Med. 2019;143(11):1346-1363. doi:10.5858/arpa.2019-0009-as.
- CREE, I. A.; DEANS, Z.; LIGTENBERG, M. J. et al. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. J Clin Pathol. 2014;67(11):923-931. doi:10.1136/jclinpath-2014-202404.
- ENGEL, K. B.; MOORE, H. M. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Arch Pathol Lab Med. 2011;135(5):537-543. doi:10.1043/2010-0702-RAIR.
- GROENEN, P. J.; BLOKX, W. A.; DIEPENBROEK, C. et al. Preparing pathology for personalized medicine: possibilities for improvement of the pre-analytical phase. Histopathology. 2011;59(1):1-7. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03711.x
- HEWITT, S. M.; LEWIS, F. A.; CAO, Y. et al. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Arch Pathol Lab Med. 2008;132(12):1929-1935. doi:10.1043/1543-2165-132.12.1929
- Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Critical Diagnoses (Critical Values) in Anatomic Pathology. Am J Clin Pathol 2006; 125:815-7.

- NAKHLEH, R. E. et al. Consensus Statement on effective communication of urgent diagnosis and significant, unexpected diagnoses in surgical pathology and cytopathology and Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Arch Pathol Lab Med 2012; 136:148-154.



ANEXO

MICROSCOPIO

La elección del microscopio es fundamental. Si, por un lado, se recomienda tener cuidado a la hora de elegir el dispositivo, por otro lado, también merece atención la zona destinada para la macroscopía, para que esté debidamente planificada.

Del microscopio

El microscopio es un instrumento óptico, mono o binocular, formado por varios componentes, tanto mecánicos como ópticos, que se agrupan en cuatro sistemas:

- De soporte;
- De aumento;
- De iluminación;
- De ajuste.

a) Sistema de soporte

Se compone de:

- Base o pie: soporta el propio dispositivo;
- Columna o varilla: soporta el tubo y la fuente de iluminación en la parte superior e inferior, respectivamente;
- Revólver: es una parte móvil donde se ubican los objetivos;
- Platina: está destinada a recibir el objeto de estudio, tiene pinzas o tornillos Charriot, lo que permite el movimiento del objeto de forma lenta y regular en las direcciones horizontal y transversal;
- Tubo: trae la parte superior de las lentes oculares y la parte inferior de las lentes ubicadas en el revólver.

Además, el sistema cuenta con dos tornillos (macro y micrométrico) que permiten enfocar el objeto; el primero con movimiento rápido y el segundo con movimiento lento. El prisma

ubicado dentro del tubo trabaja con los rayos que emanan de la fuente de luz.

Con referencia al tubo, se recomienda 160 mm como distancia ideal entre el ocular y el objetivo. Vale la pena recordar que el espesor del “portaobjetos” es de 17 mm.

b) Sistema de aumento

Está compuesto por lentes oculares y objetivos:

- Los lentes oculares: están destinados al observador y con aumentos de 4x, 6x y 10x;
- Los lentes objetivos: están pensados para el objetivo y tienen varios aumentos:
 - Entre 1x e 2,5x – lupa;
 - 4x – menor aumento;
 - 10x – pequeño aumento;
 - 40x – gran aumento;
 - 100x – de inmersión.

Cada objetivo debe estar marcado con NA (apertura numérica), que presenta las siguientes variaciones (p. Ej.):

- 0,30 en el objetivo de 10x;
- 0,65 en el objetivo de 40x;
- 130 en el objetivo de 100x.

La mayor medida que puede aumentar la NA se llama PR (poder de resolución). El poder de resolución* máximo ideal en la rutina de laboratorio es de 0,25 mm.

c) Sistema de iluminación

- Fuente de luz;
- El condensador: se ubica entre la fuente de luz y la platina; sirve para captar los rayos luminosos en la dirección de un foco dado del objeto que se va a examinar. Su ajuste y

ubicación central, cuando se eleva, permite al observador obtener la máxima iluminación, ocurre lo contrario cuando se baja;

- Diafragma: amplía o reduce el ángulo, regula la luz que entra al condensador. Cuanto más abierto está, mayor es el aumento del ángulo y mayor la apertura numérica; en consecuencia, se observarán los detalles más pequeños, siempre que se reduzca el contraste;
- Filtro: cuando están presentes, suelen ser azules. Su uso es opcional.

d) Sistema de ajuste

Consiste en:

- Cremallera (o macrométrico), de avance rápido, para acercarse al foco;
- Micrométrico, de avance lento, completa el enfoque;
- Tornillo para ajustar el condensador;
- Tornillo para centrar el condensador en la parte delantera, izquierda o derecha. La centralización se realiza en relación con el objetivo;
- El elevador de diafragma, unido al condensador, cierra y abre el diafragma, reduce y amplía el ángulo y la intensidad luminosa;
- El regulador de la “platina mecánica” está diseñado para mover el objeto. Su uso es fundamental en la lectura de preparaciones microscópicas;
- El condensador se ajusta hasta que el círculo de luz esté exactamente en el centro del campo microscópico.

Cuidados básicos con el microscopio.

El mantenimiento y conservación del equipo es fundamental, tanto para mantener un buen nivel de diagnóstico como para reducir el desgaste del dispositivo, otorgándole una mayor vida útil. Se recomienda que se haga una revisión técnica semestral, así como el mantenimiento y la conservación diarios, realizados por el microscopista.

También le corresponde a él, al final de la jornada laboral:

- Apagar la fuente de luz;
- Girar el revólver, dejando los objetivos libres y limpios (retirar el aceite de inmersión);
- Bajar el soporte mecánico de la platina;
- Cubrir el dispositivo con una funda protectora.

Estos cuidados básicos deben reforzarse alertando al patólogo sobre:

- **No** limpiar la parte óptica con etanol;
- **No** colocar objetivos sumergidos en xilol;
- **No** usar hisopos de algodón o algodón para limpiar;
- **No** usar xilol en la platina.

BALANZA DE PRECISIÓN

La sensibilidad de una balanza está indicada por la masa más pequeña que se puede pesar con precisión.

Una balanza de precisión clásica consta de:

- Eje central/eje de suspensión, fijado a la base de la balanza;
- Travesaño con los dos brazos de la balanza apoyados en la cuchilla o prisma;
- Fiel: es la aguja o puntero que indica el verdadero equilibrio de una balanza, se ubica perpendicular a la línea del travesaño y el eje de oscilación;
- Cuchillas (2), con los bordes hacia arriba, sobre las que se encuentran los ganchos que sostienen los platos;
- Platos (2), uno para material y otro para las pesas;
- Varios tornillos reguladores.

Procedimientos de pesaje:

- La sustancia que será pesada debe colocarse a la izquierda de la balanza, papel o recipiente;

- A la derecha están las pesas necesarias para que coincida con el peso del recipiente o papel y la sustancia que se va a pesar.

Técnica de pesaje:

- Con la mano izquierda, se levanta el recipiente, empujando hacia abajo (la etiqueta debe mirar hacia arriba);
- Con la mano derecha, se impulsa el depósito hacia abajo (la etiqueta debe mirar hacia arriba);
- Con la mano derecha, se impulsa el depósito, haciendo que la sustancia (polvo o cristal) caiga lentamente;
- La espátula, bien limpia, ayuda a pesar pequeñas cantidades.

Cuidados necesarios:

- **No** se pesan cantidades de sustancias que superen la carga máxima de la balanza;
- **No** se pesan sustancias colocadas directamente sobre el plato;
- **No** se levantan las pesas con las manos (usar pinzas);
- **No** se deja la balanza desbloqueada, solo se hace al momento de pesar.

Es necesario sistematizar los siguientes datos:

- Las sustancias que se van a pesar están a la derecha de la balanza;
- Las que no se pesaron, a la izquierda;
- Al pesar, se debe verificar la sustancia antes de retirar el recipiente;
- Al pesar, se debe verificar la etiqueta;
- Después de pesar, se debe cerrar el recipiente, colocándolo a la derecha.

ESTUFA

La estufa está equipada con un termostato (que regula la temperatura), una lámpara piloto (de advertencia) y un termómetro.

El técnico es el responsable de mantener regulada la estufa. Para ello, se debe identificar plenamente con los pasos necesarios para obtener la estabilización de temperatura deseada, que son:

- Girar la perilla del termostato hasta la temperatura máxima de la estufa;
- Verificar, en aproximadamente dos horas, que la temperatura registrada en el termostato se mantenga correctamente;
- Comprobar si la lámpara piloto se apaga o se enciende según suba o baje la temperatura;
- Con la estufa regulada a temperatura máxima, se debe girar la perilla del termostato a la temperatura deseada;

Recordamos que una estufa simple y de tamaño medio satisface plenamente a cualquier laboratorio de citohistopatología.

CENTRÍFUGA

La centrifugación consta de un eje central, de gran velocidad, un cabezal fijo y tubos colectores.

Existen varios tipos de centrífugas, desde las más sencillas, de tipo manual, de uso limitado, en la que requiere mucha atención por parte del técnico, para evitar daños, hasta las eléctricas, que, en general, pueden tener dos tipos de cabezales: oscilante y oblicuo.

Las centrífugas están equipadas con un cronómetro, que regula el tiempo estimado para el movimiento centrifugador y un tacómetro, que marca la velocidad de rotación por minuto.

Procedimientos para la centrifugación convencional:

- Los tubos se deben colocar uno frente al otro (ejemplo: 1: 2, 3: 4, 5: 6, etc.);

- Se debe encender y aumentar gradualmente la velocidad hasta alcanzar el grado deseado;
- Se debe proceder de la misma forma para interrumpir la centrifugación, es decir, disminuir gradualmente en sentido contrario;
- Se debe retirar con cuidado los tubos y decantar el exceso;
- Se debe invertir el sedimento en el centro de la lámina (previamente limpia, albuminizada o no) y, utilizando el propio tubo, preparar el frotis en dirección desde la parte central hasta el final, ocupando un área de 2,4 cm x 3,2 cm;
- Se debe secar rápidamente las preparaciones a temperatura ambiente y fijarlas en alcohol al 95 %.

Centrífuga en capa única.

Este dispositivo cuenta con cronómetro y tacómetro automáticos y permite el procesamiento simultáneo de 12 (doce) muestras.

La concentración celular en cada una de las capas se obtiene mediante la citocentrífuga diseñada para separar las células y otros elementos suspendidos en el medio líquido, los que se llevan a la superficie de una lámina durante la rotación del aparato. La parte líquida es absorbida por un papel de filtro que encaja perfectamente entre el tubo colector de polietileno y la lámina. El colector tiene un orificio de 0,6 cm de diámetro en la lateral, que corresponde al orificio idéntico del papel de filtro, lo que hace que la parte líquida sea absorbida por el papel de filtro y el concentrado celular se disponga en la lámina. Después de este proceso, las preparaciones deben secarse rápidamente, a temperatura ambiente, y luego fijarse en alcohol al 95 %.

Recomendaciones generales

Al final de la centrifugación, por cualquiera de las técnicas, se debe limpiar los residuos de los tubos, lubricar el equipo, apagarlo y protegerlo adecuadamente con un cobertor.



SOLUCIONES Y REACTIVOS

1. TÉCNICA DE TINCIÓN DE PAPANICOLAOU

- Hematoxilina de Harris:
 - Hematoxilina (cristal) 5 g;
 - Alcohol etílico al 95 % 100 ml;
 - Alumbre de potasio 100 g;
 - Óxido de mercurio de 2,5 a 3 g;
 - 1000 ml de agua destilada;

Preparación (solución - stock):

- Disolver la hematoxilina en alcohol (solución 1);
- Disolver el sulfato de alumbre de potasio en agua caliente (solución 2);
- Mezclar las soluciones 1 y 2. Llevar a hervir;
- Aplicar rápidamente el óxido de mercurio;
- Mezclar la solución hasta que adquiera un color rojo oscuro;
- Dejar enfriar en agua o en el frigorífico;
- Colocar en vasos de color oscuro, etiquetar y fechar;
- Cuando esté frío, agregar 8 ml de ácido acético;

Preparación de la solución de batería:

- Agregar partes iguales de la solución de stock y agua destilada;
- Orange G-6 (solución acuosa de Orange G al 10 %):
 - Dejar reposar varios días (solución 1);
 - Preparación para la solución Orange G-6:
 - Solución 1: 50 ml;
 - Alcohol etílico al 95 % 950ml;
 - Ácido fosfotúngstico 0,015 g.

Luego de preparar la solución, se debe colocar en vidrio oscuro, se debe rotular, poner la fecha y almacenar para su uso oportuno.

2. TÉCNICA DE TINCIÓN DE SHORR “MODIFICADA”

- Hematoxilina de Harris

Solución de tinte de Shorr:

- Alcohol etílico al 95 % 100 ml;
- Bierbrich Scarlat, 0,5 g de solución acuosa;
- Orange G 0,25 g;
- Fast Green 0,075 g;
- Ácido fosfotúngstico 0,5 g;
- Ácido fosfomolibdico 0,5 g;
- 1 ml de ácido acético;

Resultados:

- Núcleo: azul;
- Citoplasma: rojo o verde.

3. TÉCNICA DE TINCIÓN: HEMATOXILINA E EOSINA

- Hematoxilina de Harris:

- Solución de Eosina 0,5 g;
- 10,0ml de agua destilada;
- Alcohol al 95 % 90 ml;
- Ácido acético (opcional) 1 gota.

Solución diferenciadora:

- Alcohol al 95 % 100ml;
- Ácido clorhídrico 5 gotas.

Resultados

- Núcleo: azul;
- Citoplasma: rosa.

EA-36 O EA-65

EA-36

- 0,5 % Light Green SF en alcohol a 95 % 45 ml; 0,5 % de Bismark Brown en alcohol al 95 % 10 ml; 0,5 % de Eosina en alcohol al 95 %, 45 ml;
Ácido fosfotúngstico 0,2g;
Solución acuosa de carbonato de litio (saturada) 1 gota.

EA-65

Para preparar esta solución, simplemente reduzca el porcentaje de Light Green en la solución EA-36 a 0,25 ml.

2. Eosina (solución madre)

➤ Solución:

Eosina.....	5 g
Agua.....	200 ml
Alcohol absoluto.....	800ml

➤ Método de preparación:

Disolver la eosina en agua y completar con alcohol.

Nota: En el momento de su uso, diluir 50 ml de la solución madre en 150 ml de alcohol y agregar 1 ml de ácido acético.

3. Verde Luz

➤ Solución:

Eosina.....	2,25 g
Verde amarillento claro.....	2,25 g
Vesuvina.....	0,5g
Ácido fosfotúngstico.....	2g

➤ **Método de preparación:**

Se debe disolver la eosina en 450 ml de alcohol; el verde amarillento claro en 100 ml de agua y completar hasta 350 ml de alcohol; se debe disolver vesuvina en 100 ml de alcohol. Se debe mezclar en el siguiente orden: verde, vesuvina, eosina. Se debe agregar 10 gotas de carbonato de litio saturado y 2 g de ácido fosfotúngstico.

4. Orange

➤ **Solución:**

Orange 5 g;

Ácido fosfotúngstico.....0,15g

➤ **Método de preparación:**

Se diluye el Orange en 100 ml de agua y se completa hasta 900 ml de alcohol absoluto; se añade 0,15 g de ácido fosfotugástico.

5. Giemsa

➤ **Modo de preparación:** mezclar las siguientes soluciones:

Solución de May Grunwald. 50 %

Solución de Giemsa. 50 %

Nota: Cuando May grunwald esté en polvo, se mezcla 5/100 ml de alcohol.

➤ **Técnica de tinción:**

Hematoxilina tiempo de biopsia;

Lavar con agua corriente;

Solución (may+giemsa).00:10 min;

Lavar con agua corriente;

Secar en la estufa;

Xilol;

Montar.

6. P. A. S.➤ **Solución:**

Reactivo de Schiff:

Fucsina básica.	1g
Agua destilada;	200 ml
Bisulfito de sodio.	2g
Ácido clorhídrico normal.....	10ml
Carbón vegetal.....	1g

Nota: Dilución a 1 normal: ácido clorhídrico concentrado 83/1.000 ml de agua.

➤ **Método de preparación:**

Se disuelve la fucsina en agua hirviendo; se deja enfriar esta solución a 70°; se agrega bisulfito de sodio; se agita bien hasta que se enfríe; se agrega ácido clorhídrico normal; se sacude bien. Tapar y esperar 24h. Se agrega carbón, se revuelve y filtra.

Nota: Esta solución no debe quedar oscura.

➤ **Técnica de tinción:**

Desparafinado e hidratado;

Ácido periódico al 2 %..... 00:05 min;

Lavar con agua corriente;

Reactivo de Schiff: 00:40 min;

Lavar bien; Hematoxilina. tiempo de biopsia;

Lavar bien;

Deshidratar, aclarar y montar.

7. Alcian Blue

➤ Solución:

Alcian Blue 1g
 Ácido acético glacial;3ml
 Agua destilada;97ml

➤ Técnica de tinción:

Deshidratar y desparafinar;
 Solución de alcian blue. 1:00h;
 Lavar;
 Hematoxilina. tiempo de biopsia;
 Lavar con agua corriente;
 Deshidratar, aclarar y montar.

8. Palas Alcian Blue

➤ Técnica de tinción:

Desparafinado e hidratado;
 Solución de alcian blue.00:30 min;
 Lavar;
 Ácido periódico00:15 min;
 Lavar;
 Reactivo de Schiff:00:15 min;
 Lavar;
 Hematoxilina. tiempo de biopsia;
 Lavar;
 Deshidratar, aclarar y montar.

9. Rojo Congo Alcalino

➤ Solución (madre):

Rojo congo.....	1g
Cloruro de sodio.....	2g
Alcohol.....	200 ml
Disolver y filtrar	

➤ Solución (uso):

Solución madre.....	100ml
Hidróxido de sodio al 1 %.....	1ml

➤ Técnica de tinción

Desparafinar e hidratar;

Hematoxilina tiempo de biopsia;

Lavar;

Pasar en alcohol;

Solución de rojo congo..... 00:20 min;

Deshidratar en 3 baños de alcohol, aclarar y montar.

10. Gomory

➤ Solución:

Cromotrope 2r 0,6 g

Verde amarillento claro..... 0,5g

Ácido acético 1 ml

Ácido fosfotúngstico 0,8 g

Agua destilada; 1ml

➤ Técnica de tinción:

Solución 00:20 min;

Lavar;

Hematoxilina. tiempo de biopsia;
Lavar;
Deshidratar, aclarar y montar.

11. Sirius Red

➤ Solución ácida:

Ácido clorhídrico.83,5ml
Agua destilada;916,5ml

➤ Picrossirius

Sirus red. 0,2g
Ácido pícrico saturado.100ml

➤ Técnica de tinción:

Solución picrossirius.01:00h;
Solución ácida.....00:10 min;
Lavar;
Hematoxilina.....tiempo de biopsia;
Lavar;
Deshidratar, aclarar y montar.

12. Retículo

➤ Solución de plata amoniacal:

Diluir en 10 ml de agua destilada 1gr de nitrato de plata;
Diluir en 10 ml de agua destilada 1gr de hidróxido de potasio;

A 10 ml de nitrato de plata al 10 %, agregar 2,5 ml de hidróxido de potasio al 10 % en un frasco Erlenmeyer y en esta mezcla precipitada agregar de 26 a 28 gotas de hidróxido de amonio, siempre removiendo mientras gotea el hidróxido de amonio hasta que desaparezca el precipitado.

- **Solución de permanganato de potasio:**
 - Permanganato de potasio. 0,5g
 - Agua destilada; 100ml
- **Solución de metabisulfito de potasio:**
 - Metabisulfito de potasio..... 2,0g
 - Agua destilada; 100ml
- **Solución de formol:**
 - Formol 40 %..... 20ml
 - Agua destilada; 80ml
- **Solución de sulfato de amonio férrico:**
 - Sulfato de amonio férrico 2 g
 - Agua destilada; 100ml
- **Solución de cloruro de oro:**
 - Solución de cloruro de oro al 1 %. 20ml
 - Agua destilada; 80ml
- **Técnica de tinción**
 - Desparafinado e hidratado;
 - Se oxida en permanganato de potasio al 0,5 %... 00:05 min;
 - Lavar;
 - Diferenciar en metabisulfito de potasio al 2 %. 00:05 min;
 - Lavar;
 - Sensibilizar al 2 % de sulfato de amonio férrico... 00:05 min;
 - Lavar;
 - Impregnar en una solución de plata amoniacal... 00:02 min;
 - Pasar en alcohol; Reducir en formol al 20 % 00:03 min;
 - Lavar;
 - Pasar en cloruro de oro al 0,2 %..... 00:00:03seg;

Lavar;
 Pasar en metabisulfito de potasio00:05 min;
 Lavar;
 Pasar en tiosulfato de sodio al 2 %.....00:05 min;
 Lavar;
 Teñir con hematoxilina. Tiempo de biopsia;
 Lavar;
 Deshidratar, aclarar y montar.

13. Perl's

➤ **Solución de ferrocianuro:**

Ferrocianuro de potasio 10 g
 Agua destilada; 100ml

➤ **Solución de ácido clorhídrico:**

Ácido clorhídrico. 10ml
 Agua destilada; 100ml

➤ **Solución de sirius red:**

Sirius red..... 0,2g
 Ácido pícrico saturado. 100ml

Nota: En el momento de su uso, prepare: Ferrocianuro.

..... 50

%

Ácido clorhídrico. 50 %

➤ **Técnica de tinción:**

Solución de sirius red.....00:05 min;

Lavar;

Solución de ferrocianuro + ácido clorhídrico.00:05 min;

Lavar;
 Deshidratar, aclarar y montar.

14. Fite

➤ **Solución:**

Fucsina
 Fucsina básica 1 g
 Cristales de fenol. 5g
 Agua destilada; 100ml
 Alcohol absoluto..... 10ml

➤ **Método de preparación:**

Se disuelve la fucsina lentamente en agua; Se disuelve el fenol en alcohol;
 Se mezclan las dos soluciones, se filtran y se utilizan.

Diferenciador

Ácido clorhídrico..... 1ml
 Alcohol 100 ml

Verde

Verde luz 1 g
 Agua destilada; 100ml

➤ **Técnica de tinción:**

Desparafinado e hidratado;
 Fucsina (filtrar sobre la lámina). 00:20 min;
 Lavar;
 Pasar en alcohol;
 Diferenciar;

Verde luz.....00:00:15seg;
 Lavar;
 Deshidratar, aclarar y montar.

15. Verhoeff

➤ Solución hematoxilina:

Hematoxilina. 5
 g Alcohol absoluto.....100ml

➤ Solución de percloruro de hierro:

Cloruro férrico. 10g
 Agua destilada;100ml

➤ Solución de lugol fuerte:

Iodo..... 2 g
 de yoduro de potasio. 4g
 Agua destilada;100ml

➤ Solución de cloruro férrico:

Cloruro férrico. 2g
 Agua destilada;100ml

➤ Solución de hiposulfito de sodio:

Tiosulfato de sodio..... 5g
 Agua destilada;100ml

➤ Solución de hematoxilina de Verhoeff:

Hematoxilina madura.30ml
 Percloruro de hierro.12ml
 Lugol fuerte.....12ml

➤ **Tinte Van Gieson:**

- Solución A

Fucsina ácida 1g

Agua destilada; 100ml

- Solución B

Solución acuosa de ácido pícrico saturado.

Nota: Para su uso, 50 ml de solución saturada de ácido pícrico y 7,5 ml de fucsina.

➤ **Técnica de tinción:**

Desparafinado e hidratado;

Teñir con hematoxilina de Verhoeff..... 00:20 min;

Lavar;

Diferenciar en cloruro férrico;

Lavar;

Hiposulfito de sodio..... 00:05 min;

Lavar;

Solución van Gieson. 00:03 min;

No lavar;

Secar ligeramente sobre papel de filtro;

Deshidratar en alcohol, aclarar y montar.

16. Pasm

- Ácido periódico:

Ácido periódico..... 0,5g

Agua destilada; 100ml

- Metanamina:

Hexametilanetetramina. 3g

Agua destilada; 100ml

- Nitrato de plata:

Nitrato de plata..... 5g
 Agua destilada; 100ml

- Cloruro de oro 0,1 %.

Cloruro de oro.....20ml
 Agua destilada; 100ml

- Hiposulfito de sodio:

Tiosulfato de sodio 2 g
 Agua destilada; 100ml

- Borato de sodio (Borax):

Borato de sodio..... 5g
 Agua destilada; 100ml

➤ **Solución A:**

En el momento de su uso, se prepara:

Agua destilada;25ml
 Borax.2ml
 Metanamina.25ml
 Nitrato de plata.....2ml

➤ **Técnica de tinción:**

Desparafinado e hidratado;

Ácido periódico.00:10 min;

Lavar;

Solución A en el horno a 60° (comprobar hasta que esté caramelo);

Agua;

Cloruro de oro hasta quedar gris;

Lavar;

Hiposulfito de sodio..... 00:05 min;
 Lavar;
 Contrateñir con eosina;
 Deshidratar, aclarar y
 montar.

17. Grocoot

- Ácido crómico:

Ácido crómico..... 5g

Agua destilada; 100ml

- Bisulfito de sodio:

Bisulfito o disulfito de sodio..... 1g

Agua destilada; 100ml

- Nitrato de plata (conservar en la heladera):

Nitrato de plata..... 5g

Agua destilada; 100ml

- Metanamina (conservar en la heladera):

Hexametilanetetramina. 3g

Agua destilada; 100ml

- Solución de borax:

Borato de sodio..... 5g

Agua destilada; 100ml

- Cloruro de oro:

Cloruro de oro 0,5 %. 1 parte

Agua destilada; 4 partes

- Hiposulfito de sodio:

Hiposulfito de sodio o tiosulfato. 2g
 Agua destilada; 100ml

- Solución verde luz:

Verde luz..... 1 g
 Agua destilada; 100ml

Nota: En el momento de su uso, se prepara:

Agua destilada;25ml
 Solución de borax.2ml
 Metanamina.25ml
 Solución de plata.2ml

➤ **Método de tinción:**

Desparafinado e hidratado;

Oxidar para ácido crómico 00:10 min;

Lavar;

Decolorar hasta bisulfito de sodio.00:01 min;

Lavar;

Colocar en la solución de plata y colocar en la estufa
 (controlar hasta que adquiera un color caramelo);

Lavar;

Coloque en cloruro de oro hasta que se vuelva gris;

Hiposulfito de sodio.....00:05 min;

Lavar;

Contrateñir con verde luz.00:00:30seg;

Lavar;

Secar en la estufa;

Xilol y montar.

18. Fijadores

➤ Solución de formalina:

Solución de formol a 37 %	100 ml
Agua.....	900 ml

➤ Solución de formalina neutra:

Solución de formol a 37 %	100 ml
Agua.....	900 ml
Fosfato de sodio monobásico	4 g
Fosfato de sodio dibásico	6,5 g

➤ Fijador de Bouin:

Alcohol.	150 ml
Solución de formalina:...	60 ml
Ácido pícrico.....	1 g