




Manual de Técnicas Histoquímicas Unidad Anatomía Patológica.



Elaborado por: Dr. Guillermo Pérez.
Fecha: 15 JUNIO 2015
Firma:

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 2 de 30

1. Objetivo:

Definir la metodología a seguir durante la realización de la técnica de histoquímica.

2. Alcance:

Este procedimiento aplica a muestras tejido fijadas en formalina e incluidas en parafina.

3. Definiciones:

- **U.A.P.:** Unidad de Anatomía Patológica.
- **T.M.:** Tecnólogo Médico.
- **A.P.:** Anatómo Patólogo.
- **HQ:** Histoquímica.
- **M.O:** Microscopio Óptico.
- **IT:** Instructivo.

4. Responsabilidades:

Actividad	AP	TM
Solicitud	E/D	
Corte		E/D
Realización de la técnica		E/D
Registro		E/D
Contraste y montaje		E/D


A.P.: Anatómo Patólogo
T.M.: Tecnólogo Médico

E: Ejecuta
D: Decide

5. Descripción de la actividad:

5.1. Fundamento:

La histoquímica es una técnica que permite la identificación y localización de compuestos o radicales químicos en las células y tejidos. Esto se consigue provocando reacciones que dan productos insolubles que son coloreados o electrodensos y visibles por el M.O.

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 3 de 30

Su objetivo es poner de manifiesto una molécula o familia de moléculas presentes en una sección histológica y estudiar su distribución tisular.

5.2. Equipos:

- Procesador de tejidos
- Centro de inclusión
- Micrótopo
- Micropipetas de 2, 20 y 100 µl
- Microondas

5.3. Reactivos y Materiales:

- Navajas de micrótopo
- Portaobjetos con carga positiva
- Batería de desparafinación y deshidratación
- Soluciones empleadas para cada técnica (ver IT respectivos)
- Cubreobjetos
- Medio de montaje


5.4 Inclusión y Corte:

• Inclusión:

Se aplica a la inclusión de todo tipo de muestras fijadas y procesadas a través de deshidratación en alcohol e impregnación con xilol-parafina y parafina.

Proceso:

- Sacar el canastillo con las muestras del procesador de tejidos.
- Traspasar las muestras al depósito del centro de inclusión.
- Preparar los cassetes a incluir, verificar el número consignado y hacer una marca en el registro de laboratorio con el objeto de que queden registradas todas las inclusiones.
- Abrir el cassette, verificar la integridad de la muestra y número de fragmentos consignados en registro.
- Revisar los bordes, la tapa y recesos del cassette y comprobar que no haya ningún trozo de tejido.
- Seleccionar un molde acorde con el tamaño de la muestra y llenarlo con parafina líquida (a 65°C).
- Determinar cuál será la superficie de corte y orientar el tejido con ésta hacia abajo.

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 4 de 30

- Depositar el molde con la muestra en el punto frío del centro de inclusión y comprimir levemente con la pinza a fin de poner los distintos fragmentos al mismo nivel.
- Poner el cassette en el molde y aplastar.
- Una vez realizada la inclusión, colocarla en la platina fría del centro de inclusión hasta que esté fría y se pueda sacar del molde.

En el caso de muestras que vienen numeradas, éstas deben incluirse en forma ordenada, disponiendo los trozos de tejido de izquierda a derecha y dejando el trozo número uno a una distancia mayor como medida de seguridad para poder reconocer la numeración de las muestras. Poner el cassette con el número hacia abajo, para que al poner la inclusión con el número hacia arriba en el micrótomo, las muestras queden ordenadas de izquierda a derecha.

Inclusión por tipo de muestra:

Estructuras tubulares:

Como vaso deferente, venas, arterias y oviducto deben incluirse en una forma tal que la navaja corte a través de la luz tubular. La orientación debe ser lo más vertical posible, para que la navaja haga los cortes en forma perpendicular al eje longitudinal del tubo.

Superficies epiteliales:

Como piel, intestino, vesícula biliar, vejiga urinaria y útero, deben colocarse en forma tal que el plano de corte pase a través de todas las capas del tejido. La superficie epitelial debe colocarse en la parte más alta del bloque para que así sea la última en ser cortada, esto minimiza la presión que es causa de distorsión de la capa epitelial. El cortar la capa de queratina al final, reduce la compresión, los rasguños y las cortadas de las capas subcutáneas.


Los especímenes cuando son múltiples deben ser incluidos uno al lado del otro con sus superficies epiteliales orientadas en la misma dirección.

Especímenes grandes y sólidos:

Las muestras rectangulares grandes o sólidos como el útero, la próstata, la glándula tiroidea, y el tejido óseo deben ser incluidos con un ligero ángulo en relación al borde de la navaja, minimizando la vibración e inestabilidad del bloque o navaja.

Muestras múltiples:

Tejidos múltiples de muestras blandas y ganglios linfáticos deben colocarse uno junto al otro con suficiente espacio entre ellos. La organización metódica de los tejidos hace que la lámina sea más fácil de estudiar.

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 5 de 30

Tejidos rectangulares pequeños deben ser orientados con su eje longitudinal casi paralelo al borde de la navaja para minimizar los pliegues y la distorsión causados por presión.

Estructuras quísticas:

Después de la bisección, los quistes pequeños adoptan una forma de cúpula. Por lo tanto, los quistes deben ser incluidos con la superficie de corte hacia abajo para que la navaja corte a través de todas las capas de la pared del quiste. Debe asegurarse de que la cúpula quística no atrape burbujas de aire.

Identificación de márgenes y superficies:

Los tejidos que tienen los márgenes marcados con colorante, deben ser colocados de manera tal que la tinta se pueda ver en el borde del corte. Si hay muestras múltiples, estas deben incluirse con la tinta siempre mirando hacia el mismo lado del bloque para que las láminas queden mejor organizadas y se facilite su estudio microscópico.


Si se ha marcado toda una superficie con colorante, entonces ésta debe incluirse en forma opuesta a la superficie que se va a cortar con la navaja, por lo tanto la tinta no se va a ver en los cortes.

- **Corte:**

El corte de inclusiones en parafina se realiza en micrótopo Leica RM 2245. Consiste en cortar la inclusión de parafina para obtener secciones de los tejidos en micras, haciendo posible la obtención de monocapas celulares para evidenciar las características de los tejidos, dando origen así al corte histológico. Este proceso es realizado por Tecnólogos Médicos y una Auxiliar de Laboratorio de lunes a viernes de 9:00 a 13:30 hrs, priorizando el corte de biopsias con indicación de desgastes, niveles, técnicas especiales e inmunohistoquímica solicitadas.

Materiales:

- Micrótopo rotatorio
- Baño de flotación termorregulador, con agua corriente a $\pm 45^{\circ}\text{C}$
- Navajas desechables
- Portaobjetos esmerilados
- Lápiz grafito
- Goma
- Piceta con alcohol de 30°
- Vidrios para estirar cortes
- Sondas dentales
- Cubetas con hielo (Hieleras)
- Canastillos de placas

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 6 de 30

Grosor de los cortes:

El grosor de los cortes es variable según la tinción.

- Hematoxilina & Eosina: Cortes de 3 μ .
- Tinciones especiales: El corte se realiza según las especificaciones de la técnica.
- Inmunohistoquímica: Cortes de 6 μ .


Procedimiento:

- Eliminar el exceso de parafina de las inclusiones raspándoles con un cuchillo los bordes.
- Tallar con una gilette de tal forma de dejar la menor cantidad posible de parafina alrededor del tejido.
- Enfriar las inclusiones en freezer a -20°C a lo menos 5 minutos.
- Sacar inclusiones a cortar y poner en platina fría, idealmente ordenadas por caso.
- Encender micrótomo y poner en modo desgaste. Siempre colocar una navaja de desgaste
- Poner la inclusión a cortar en la pinza del micrótomo. Ubicar el taco de manera que la zona más blanda de la muestra enfrente primero la navaja, ajustar y comenzar a desgastar hasta que salga toda la superficie de corte.
- Poner el micrótomo en modo corte, colocar navaja de corte, ajustar a $3\mu\text{m}$ y hacer girar el mango rotatorio hasta obtener una cinta de cortes. Si se obtiene una cinta levemente plegada, puede estirarse previamente con alcohol de 30° en un vidrio. Se retira el corte suavemente con el portaobjeto una vez que estos estén estirados.
- Con cuidado, estirar esta cinta sobre un baño con agua a 45°C .
- Seleccionar los cortes mejores y recogerlos en una lámina portaobjetos previamente rotulada con el número de la biopsia.
- Depositar este corte en un canastillo
- Juntar 15 cortes en el canastillo y poner a secar en una estufa a 60°C durante 30 minutos.

5.5 Técnicas Histoquímicas:

Las técnicas histoquímicas solicitadas por los staff de médicos Anatómos Patólogos, son las siguientes (ANEXO 1):

- Tricrómico Masson
- Azul de Prusia (Perls)
- Azul Alcian pH 2.5
- Fite Faraco


	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 7 de 30

- Fontana Masson
- Giemsa
- Gram
- Grocott
- Orceína
- PAS
- Retículo
- Rojo congo
- Van Gieson
- VG Elástica
- Von Kossa
- Zielh Nielsen
- Whartin Starry.

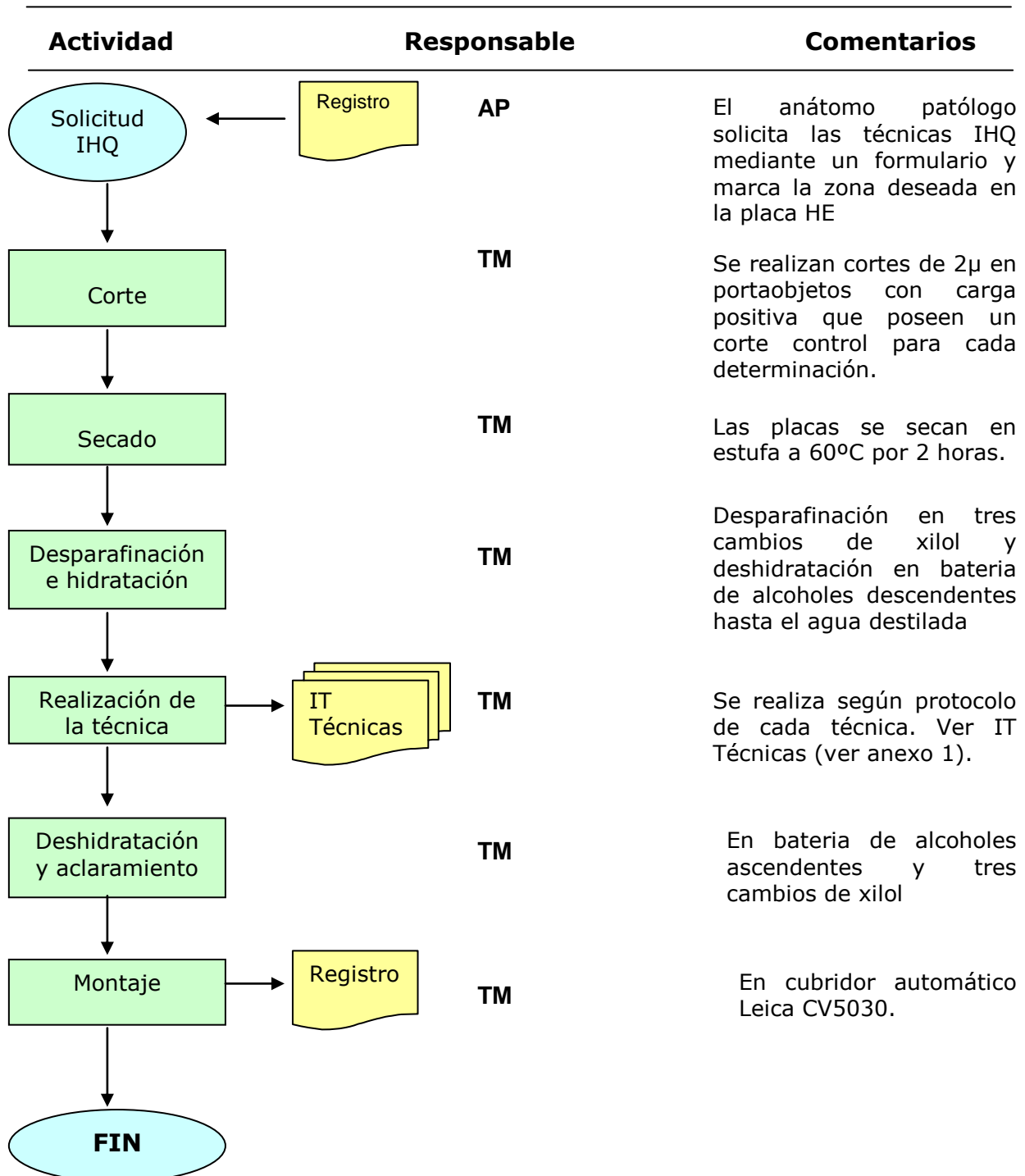
Estas técnicas se deben realizar a través de la preparación de soluciones, explicadas en **(ANEXO 2)**.


5.6 Bioseguridad:

- Evitar quemaduras por mala manipulación de equipos de inclusión y pinzas calientes.
- Evitar salpicaduras de parafina caliente por mala manipulación de muestras.
- Mantener conductas de trabajo adecuadas para evitar cualquier problema que afecte a la muestra.
- Uso obligatorio de:
 - Guantes
 - Lentes protectores
 - Pechera plástica.

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 8 de 30

5.7 FLUJOGRAMA:



 <p>HOSPITAL REGIONAL RANCAGUA</p>	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 9 de 30

6. Referencias:

- Manual de Bioseguridad, Unidad Anatomía Patológica.

7. Registros:

- 7.1 PE-AP-01/RG: Registro técnicas especiales.

8. Anexos:

ANEXO 1:

INSTRUCTIVO TÉCNICAS ESPECIALES:

TRICRÓMICO DE MASSON

✓ Alcance:

Este instructivo se aplica todas muestras de biopsias fijadas en formalina, incluidas en parafina las que requieran una tinción diferencial para el tejido conjuntivo y componentes celulares.


✓ Descripción de actividades:

1. SOLUCIONES:

1.- Hematoxilina Férrica de Weiggert

2.- Solución de Biebrich Scarlet-Fucsina Ácida:

- Biebrich Scarlet 1% acuoso 90 ml

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 10 de 30

- Fucsina Ácida 1% acuosa 10 ml
- Ácido Acético Glacial 1ml

3.- **Solución de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico**

- Ácido Fosfotúngstico 2.5g
- Ácido Fosfomolibdico 2.5g
- Agua Destilada 100 ml


4.- **Solución de Azul de Anilina**

- Azul de Anilina hidrosoluble (C.I. 42755) 2.5 g
- Ácido Acético glacial 2 ml
- Agua Destilada 100 ml

5.- **Solución acuosa de Ácido acético Glacial al 1%**

2. PROCEDIMIENTO

- 1.- Cortes de 4 μ .
- 2.- Desparafinar hasta el agua destilada.
- 3.- Mordentar en Bouin por 30' (30" en MW).
- 4.- Lavar en agua corriente hasta que desaparezca el color amarillo.
- 5.-Colorear con hematoxilina de Weiggert por 15' en placa .
- 6.-Lavar en abundante agua corriente.
- 7.-Teñir en la solución de Biebrich scarlet 20' .
- 8.-Lavar en agua destilada.
- 9.-Diferenciar en Solución de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico, controlar al microscopio.
- 10.-Sin lavar, teñir en Solución de Azul de Anilina 10'

 <p>HOSPITAL REGIONAL RANCAGUA</p>	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 11 de 30

11.- Lavar rápidamente en Solución acuosa de Ácido acético al 1% (1 o 2 dipping)

12.- Lavado rápido en agua destilada

12.-Deshidratar desde OH 95°, aclarar y montar.

3. RESULTADOS:


Núcleos: Negros

Citoplasma, queratina, fibras musculares: Rojo-Rosado

Colágeno y Retículo: Azul

Notas:

- Preparar 1 ml de Hematoxilina de Weigert en un tubo (0,5ml solución A + 0,5ml solución B), sobreteñir y diferenciar. Controlar al microscopio la intensidad de la tinción.
- **La diferenciación en** Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico debe ser hasta que los espacios porta del control queden rosado claro.
- Si el lavado en ácido acético acuoso al 1% es muy prolongado, el azul de anilina pierde intensidad.

 <p>HOSPITAL REGIONAL RANCAGUA</p>	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 12 de 30

AZUL DE PRUSIA (PERLS)

✓ **Alcance:**

Este instructivo se aplica a todas las muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina en las que se requiera la demostración de depósitos de hierro inorgánico.

✓ **Descripción de Actividades:**

1.- SOLUCIONES:

1.1.- Ferrocianuro de Potasio 2% acuoso

1.2.- Ácido Clorhídrico 2% acuoso

1.3.- Solución de trabajo

Ferrocianuro de K 2% _____ 25ml


HCL 2% _____ 25ml

2.- PROCEDIMIENTO:

1. Cortes desparafinados e hidratados, hasta agua destilada.
2. Teñir los cortes con sol. de trabajo, por 30 min.
3. Lavar con agua destilada, 6 cambios.
4. Contrastar.
5. Deshidratar, aclarar y montar.

3.- RESULTADOS:

Hemosiderina y depósitos de hierro _____ azul.
Núcleos _____ rojos.

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 13 de 30

AZUL ALCIAN PH 2.5

✓ **Alcance:**

Este instructivo se aplica a todas las muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina en las que se requiera la demostración de mucopolisacáridos ácidos.

✓ **Descripción de Actividades**

1.- SOLUCIONES:

1.1.- Solución de ácido acético 3% acuoso.

1.2.- Solución de Azul Alcían:

Azul alcían, 8gx _____ 1 gr.
Solución de Ác. Acético 3% _____ 100 ml.


1.3.- Hematoxilina de Harris

2 PROCEDIMIENTO:

1. Cortes desparafinados e hidratados.
2. Poner en sol. de ácido acético al 3% por 3 min.
3. Teñir en sol. de azul alcían por 15 min. a T^o ambiente.
4. Lavar con agua corriente, por 8 min.
5. Contrastar
6. Lavar con agua corriente.
7. Deshidratar, aclarar y montar.

3 RESULTADOS

Mucinas ácidas, mucinas sulfatadas ácidas _____ calipso.
Núcleos _____ azul.

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 14 de 30

FITE FARACO

✓ **Alcance:**

Este instructivo se aplica a todas las muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina en las que se requiera la demostración de microorganismos alcohol ácido resistentes sensibles a los solventes orgánicos, como la *Mycobacterium leprae* y la *Mycobacterium lepromatosis*. Dichas bacteria son mucho menos alcohol ácido resistente que el bacilo de la tuberculosis, por lo tanto el alcohol es eliminado de los pasos de hidratación y deshidratación y se utiliza ácido sulfúrico al 10% como decolorante en vez de alcohol ácido. Las láminas son desparafinadas utilizando xilol y aceite vegetal.

✓ **Descripción de Actividades:**

1.- SOLUCIONES

1.1.-Fucsina de Ziehl Neelsen:

Fucsina Básica	1g
Alcohol Absoluto	10ml
Agua Fenicada 5%	100ml

1.2.- Ácido sulfúrico 10%:


Agua destilada	90ml
Ác. Sulfúrico PA	5ml

1.3.- Azul de Metileno Acetificado:

Azul de Metileno (CI 52015)	0.25 g
Agua destilada	99ml
Ácido acético glacial	1ml

2.- PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar en solución 2:1 de xilol y aceite vegetal por 15'.
2. Secar y lavar en agua. Repetir el paso 1 si se observan restos de xilol/aceite.

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 15 de 30

3. Teñir en la solución de fucsina, SIN CALENTAR, por 20'.
4. Lavar en agua corriente.
5. Diferenciar en ácido sulfúrico 10% por 2'.
6. Lavar bien en agua corriente y después en agua destilada.
7. Tinción de contraste con Azul de Metileno por 20 segundos. Es importante no sobreteñir, ya que no será posible retirar el exceso de colorante en alcohol.
8. Lavar y secar. NO DESHIDRATAR EN ALCOHOL.
9. Aclarar en Xilol, repetir hasta que la lámina se vea clara y limpia.
Montar.

3.- RESULTADOS:

Bacilos, folículos pilosos:	rojo brillante.
Eritrocitos:	rosado claro.
Núcleos:	azul.

FONTANA MASSON

✓ **Alcance:**


Este instructivo se aplica a todas las muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina en las que se requiera identificar pigmentos melanínicos y gránulos argentafines.

✓ **Descripción de Actividades:**

1.- SOLUCIONES

1.1.- SOLUCIÓN DE GRAM:

- Yodo 1gr

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 17 de 30

GIEMSA

✓ **Alcance:**

Este instructivo se aplica a todas las muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina en las que se requiera una tinción diferencial entre los elementos del tejido hematopoyético.

✓ **Descripción de actividades:**

1.- SOLUCIONES:

1.1.- Solución de trabajo Giemsa


- Agua destilada_____ 6 ml
- Sol. Giemsa_____ 2 ml

1.2.- Agua Acetificada

- Agua destilada_____ 100 ml
- Ácido Acético_____ 0.25 ml

2.- PROCEDIMIENTO

1. Las placas desparafinadas se llevan al agua destilada y se tiñen en solución de trabajo durante 30 minutos
2. Diferenciar en agua acetificada unos pocos segundos.
3. Pasar por alcohol 96º unos segundos y controlar al microscopio, si falta diferenciación, repetir el paso anterior.
4. Deshidratar sumergiendo las placas en 2 cambios de isopropanol concentrado.
5. Aclarar en tres cambios de xilol, montar

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 18 de 30

3.- RESULTADO:

- **DNA-RNA: Azul (basófilo)**
- **Sustancias acidófilas: Naranja rojizo**
- **Mucopolisacáridos ácidos: Rojo-violeta**

Alternativas de tiempos de tinción:

- Reducción de tiempo a 20' si se colocan los 20 ml de solución en un borrel y se completa con agua destilada. (1:1)
- Reducción a 5' tiñendo con la solución concentrada de giemsa y lavando muy bien con agua destilada.

GRAM

✓ **Alcance:**

Este instructivo se aplica a todas las muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina en las que se requiera diferenciar entre microorganismos Gram Positivos y Gram negativos.

✓ **Descripción de actividades:**

1.- SOLUCIONES:


1.1 Solución A Cristal Violeta

- Cristal Violeta CI 42555_____ 2g
- Alcohol 95%_____ 20ml

1.2 Solución B

- Oxalato de Amonio_____ 800 mg
- Agua destilada_____ 80 ml

1.3 Solución de trabajo Cristal Violeta

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 19 de 30

- 20 ml Solución A + 80 ml Solución B

1.4 Yodo de Weigert

- Yoduro de potasio _____ 2g
- Yodo _____ 1 g
- Agua destilada _____ 100 ml

1.5 Safranina 0.5%

2.-PROCEDIMIENTO

- Desparafinar e hidratar cortes hasta agua destilada
- Teñir 1 minuto en solución de trabajo de cristal violeta
- Lavar en agua destilada
- Poner placas 1 minuto en solución de yodo de Weigert
- Lavar en agua destilada
- Decolorar en acetona 10-15 segundos
- Lavar en agua destilada
- Teñir en solución de Safranina 30 segundos
- Lavar en agua destilada
- Deshidratar, aclarar en xilol y montar

3.- RESULTADOS


Bacterias Gram + _____
Núcleos _____
Bacterias Gram - _____
Citoplasma _____

Azul oscuro
Rojo oscuro
Rojo
Rosado

WARTHIN STARRY

✓ **Alcance:**

Este instructivo se aplica a todas las muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina en las que se requiera la demostración del microorganismo *Helicobacter pylori* y espiroquetas.

 <p>HOSPITAL REGIONAL RANCAGUA</p>	<p>Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica</p>	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 20 de 30

✓ **Descripción de Actividades:**

1.- SOLUCIONES:

1.1.- Agua acidulada: llevar a pH 4.0 con ácido cítrico 1%

1.2.- Nitrato de Plata 1% en agua acidulada

1.3.- Nitrato de Plata 2% en agua acidulada

1.4.- Gelatina al 5% en agua acidulada

1.5.- Hidroquinona al 0.15% en agua acidulada


2.- PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar hasta agua bidestilada
2. Poner los cortes en un borrel con agua bidestilada en un baño de agua a Tª máxima
3. Calentar todas las soluciones dejándolas en un baño de agua a Tª máxima
4. Impregnar en solución caliente de AgNO₃ al 1% por 30'. Mantener en el baño de agua caliente.
5. Revelar en una solución recién preparada de:

- Nitrato de Plata 2% 9ml
- Gelatina al 5% 22.5ml
- Hidroquinona al 0.15% 12ml

Hasta que los cortes tomen un color café amarillento

6. Lavar en abundante agua corriente caliente
7. Deshidratar, aclarar y montar.

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 21 de 30

3.- RESULTADOS:

Espiroquetas _____ **negro.**
Fondo _____ **dorado a café.**

Nota: Si los cortes han sido sobreteñidos, éstos pueden tratarse con iodina y tiosulfato de sodio para remover el color y ser entonces reteñidas.

ORCEÍNA DE UNNA-TANZER (FIBRAS ELÁSTICAS)

✓ **Alcance:**

Este instructivo se aplica a todas las muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina en las que se requiera identificar fibras elásticas.

✓ **Descripción de Actividades:**

1.- SOLUCIONES


1.1.- HEMATOXILINA DE HARRIS

1.2.- ORCEÍNA (según Tanzer):

- Orceína 1gr
- Alcohol 70% 100ml
- Ácido clorhídrico concentrado 1ml

2.- PROCEDIMIENTO:

3. Desparafinar e hidratar los cortes hasta alcohol al 70%
4. Teñir durante 30 minutos a 2 horas en solución de Orceína a temperatura ambiente, o durante 45 minutos a 37° C
5. Lavado en alcohol al 70%
6. Diferenciar en alcohol ácido al 1%
7. Lavado en abundante agua destilada
8. Tinción nuclear con Hematoxilina de Harris

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 22 de 30

9. Lavado en agua corriente
10. Deshidratar, aclarar y montar.

3.- RESULTADOS

Fibras elásticas
Núcleos

rojo ladrillo.
azules.

PAS

✓ **Alcance:**

Este instructivo se aplica a todas las muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina en las que se requiera la identificación de glucógeno, mucinas y algunas membranas basales

✓ **Descripción de actividades:**

1.-SOLUCIONES:

1.1.- Sol. de Ácido Peryódico al 0.5 %, acuoso.


1.2.- Agua Sulfurosa

HCl 1N _____ 5ml
 Metabisulfito de Sodio 10% _____ 5ml
 Agua destilada _____ 100ml

1.3.- Reactivo schiff de Coleman :

Hervir 200 ml de Agua Destilada, añadir 1g de Fucsina Básica . Enfriar a 50°C y filtrar. Agregar 20ml de HCl 1N, enfriar a 25°C y agregar 1g de Metabisulfito de Potasio, mezclar y almacenar por 24 hrs en oscuridad. Añadir 1g de Carbón activado, agitar y filtrar (la solución debe ser transparente).

1.4.- Hematoxilina de Harris.

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 23 de 30

2.- PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar e hidratar los cortes , hasta agua destilada.
2. Oxidar en sol. de Ac. Peryódico durante 15 min.
3. Lavar en 2 cambios de agua destilada.
4. Incubar en reactivo Schiff de Coleman , por 15 – 20 min.
5. Lavar en dos cambios de 5 min de agua sulfurosa.
6. Lavar en agua destilada y corriente
7. Contrastar con hematoxilina de Harris , por 20 seg.
8. Lavar con agua corriente , por 8 min.
9. Deshidratar , aclarar y montar.

3.- RESULTADOS:

Glucógeno, mucina, algunas membranas basales.____rojo a púrpura.
Hongos_____rojo a púrpura.
Núcleos_____ azul.

RETICULINA

✓ Alcance

Este instructivo se aplica a todas las muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina en las que se requiera visualizar la disposición y organización reticular.


✓ Descripción de Actividades:

1.- SOLUCIONES

1.1.- Permanganato de potasio 0.5% Ácido

Permanganato de Potasio 0.5% _____ 95ml
 Ácido Sulfúrico 3% _____ 5ml

1.2.- Ácido oxálico 1%

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 24 de 30

1.3.- Alumbre férrico 2.5%

1.4.- Formol 10%

1.5.- Cloruro de oro 0.2%


1.6.- Hiposulfito de Sodio 2.5%

1.7.- Solución de plata amoniacal:

A 5 ml de nitrato de plata al 10% acuoso agregar amoníaco puro gota a gota hasta disolver el precipitado que se forma. Agregar 5 ml de NaOH 3%. Agregar amoníaco puro gota a gota hasta que la solución quede transparente. Completar a 50 ml con agua destilada.

2.- PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar e hidratar hasta el agua destilada
2. Oxidar en permanganato de potasio 0.5% por 10 minutos
3. Lavar en agua corriente y destilada
4. Decolorar en Ácido oxálico 1% por 1 minuto
5. Lavar en agua corriente y destilada
6. Sensibilizar en Alumbre férrico por 10 minutos
7. Lavar en agua corriente y destilada varios cambios
8. Impregnar en solución de plata amoniacal 1.5 minuto
9. Lavar en agua destilada
- 10.Reducir en formol 10% por 2 minutos
- 11.Lavar en agua destilada
- 12.Virar en Cloruro de Oro 0.2% por 2 minutos
- 13.Lavar en agua destilada
- 14.Fijar en Hiposulfito de Na por 2 minutos
- 15.Lavar en agua destilada
- 16.Deshidratar, aclarar y montar.

 <p>HOSPITAL REGIONAL RANCAGUA</p>	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 26 de 30

2.- PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar hasta el agua destilada
2. Tinción nuclear con hematoxilina de Harris
3. Colocar los cortes en alcohol 80° saturado con NaCl por 20 minutos
4. Sin lavar poner los cortes en la solución de trabajo de rojo congo 20 minutos
5. Deshidratar partiendo del alcohol de 95°, aclarar y montar

3.- RESULTADOS:

Amiloides _____ **rosado a rojo, verde manzana bajo luz polarizada.**
Núcleos _____ **azules.**

TRICROMICO DE VAN GIESON

✓ **Alcance:**

Este instructivo se aplica a todas las muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina en las que se requiera una tinción diferencial entre el tejido conjuntivo y los componentes celulares.


✓ **Descripción de actividades:**

1.- SOLUCIONES

1.1.- Hematoxilina de Weiggert

1.2.- Solución acuosa de Ácido Pícrico saturado:

- Ac. Pícrico 12 g

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 27 de 30

- Agua Destilada 100 ml

1.3.- Solución de Ponceau S

-Ponceau S 1g
 -Agua Destilada 100ml
 - Ac. Acético 5% 0.5ml

1.4.- Solución de Van Gieson

- 10ml de solución 3.1.2 y 100 ml de solución 1.3

2 PROCEDIMIENTO:


- 1.- Cortes de 4 μ
- 2.- Desparafinar e hidratar hasta agua destilada
- 3.- Tinción nuclear con hematoxilina férrica de Weiggert por 10 min
- 4.- Lavar en agua corriente y destilada
- 5.- Tinción en solución de Van Gieson 3 min.
- 6.- Lavar en OH 95° y continuar deshidratación
- 7.- Aclarar y montar.

VAN GIESON ELÁSTICA

✓ Alcance:

Este instructivo se aplica a todas las muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina en las que se requiera identificar fibras elásticas.

✓ Descripción de Actividades:

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 28 de 30

1.- SOLUCIONES

1.1.- ACIDO PERYÓDICO 0.5%

1.2.- HEMATOXILINA DE VERHOEFF

- Hematoxilina crist. Al 5% en OH absoluto 10ml
- Cloruro Férrico al 10% acuoso 4ml
- Lugol 2ml

Se prepara en el momento de usar

1.3.- HIPOSULFITO DE SODIO 2%

1.4.- CLORURO FERRICO 2% ACUOSO


1.5.- SOL. DE PICROFUCSINA DE VAN GIESON

2.-_PROCEDIMIENTO:

- 11.Desparafinar los cortes hasta el agua destilada
- 12.Oxidar en ácido Periódico por 30 min
3. Lavar en agua destilada
4. Teñir en la solución de Verhoeff por 12 min
5. Lavado en agua corriente y destilada
7. Pasar por hiposulfito de Sodio por 3 min
8. Lavar en agua destilada
9. Diferenciar en Cloruro Férrico 2%
- 10.Lavado en abundante agua destilada
- 11.Teñir con la solución de Van Gieson 3 min
- 12.Deshidratar, aclarar y montar.

3.- RESULTADOS

Fibras elásticas _____negras.
Colágeno _____rojo.
Núcleos _____negros.

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 29 de 30

Otras estructuras del tejido _____ amarillo.

VON KOSSA

✓ **Alcance:**

Este instructivo se aplica a todas las muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina en las que se requiera la demostración de depósitos de Calcio.

✓ **Descripción de Actividades:**

1.- SOLUCIONES :

1.1.- Nitrato de Ag 5 % , acuoso.

1.2.- Hiposulfito de Sodio 5% acuoso

2.- PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar e hidratar los cortes , hasta agua destilada.
2. Poner las láminas en nitrato de ag 5 % por 10 minutos. , cerca de una lámpara.
3. Lavar en agua destilada 4 veces
4. Poner en tiosulfato de Na 5 % , por 5 minutos
5. Lavar en agua corriente , por 2 min.
6. Contrastar con Hematoxilina Eosina.
7. Deshidratar, aclarar y montar.

4. RESULTADOS :


Huesos y sales minerales de ca (fosfatos) _____negros.

Carbonatos y oxalatos, hierro u otros iones.

Núcleos _____ azules

Citoplasmas _____ rosados.

Posible reacción falsa positiva.

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 30 de 30

ZIEHL NEELSEN EN MICROONDAS

✓ **Alcance:**

Este instructivo se aplica a todas las muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina en las que se requiera la demostración de microorganismos alcohol ácido resistentes.

✓ **Descripción de Actividades:**

1.- SOLUCIONES

1.1.-Fucsina de Ziehl Neelsen:

Fucsina Básica	1g
Alcohol Absoluto	10ml
Agua Fenicada 5%	100ml

1.2.- Alcohol Acido:

Alcohol 95°	95ml
Ácido Láctico	5ml


2.- PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar hasta el agua destilada
2. Teñir en la solución de fucsina, en placas. por 30' a 60°C o un minuto en microondas a potencia media, dejar reposar por 10' a T° ambiente.
3. Lavar en agua destilada
4. Diferenciar en alcohol ácido hasta que no caiga colorante
5. Lavar en abundante agua destilada
6. Tinción de contraste con hematoxilina
7. Deshidratar, aclarar y montar

3.- RESULTADOS:

Bacilos ácido – alcohol resistente

rojo brillante.

	Manual de Técnicas Histoquímicas Anatomía Patológica	Código: SGC-M-THQ/APA
		Fecha: 15 Junio 2015
		Versión: 3
		Vigencia: (5 años)
		Página: 31 de 30

**Eritrocitos
Núcleos**

**rosado.
azul.**

ANEXO 2

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

ALCOHOL 70°

Alcohol 95	736 ml
Agua destilada	264 ml

ALCOHOL 80°

Alcohol 95	842 ml
Agua destilada	158 ml

Ácido Nítrico 5%

Ácido nítrico	50 ml
Agua destilada	950 ml