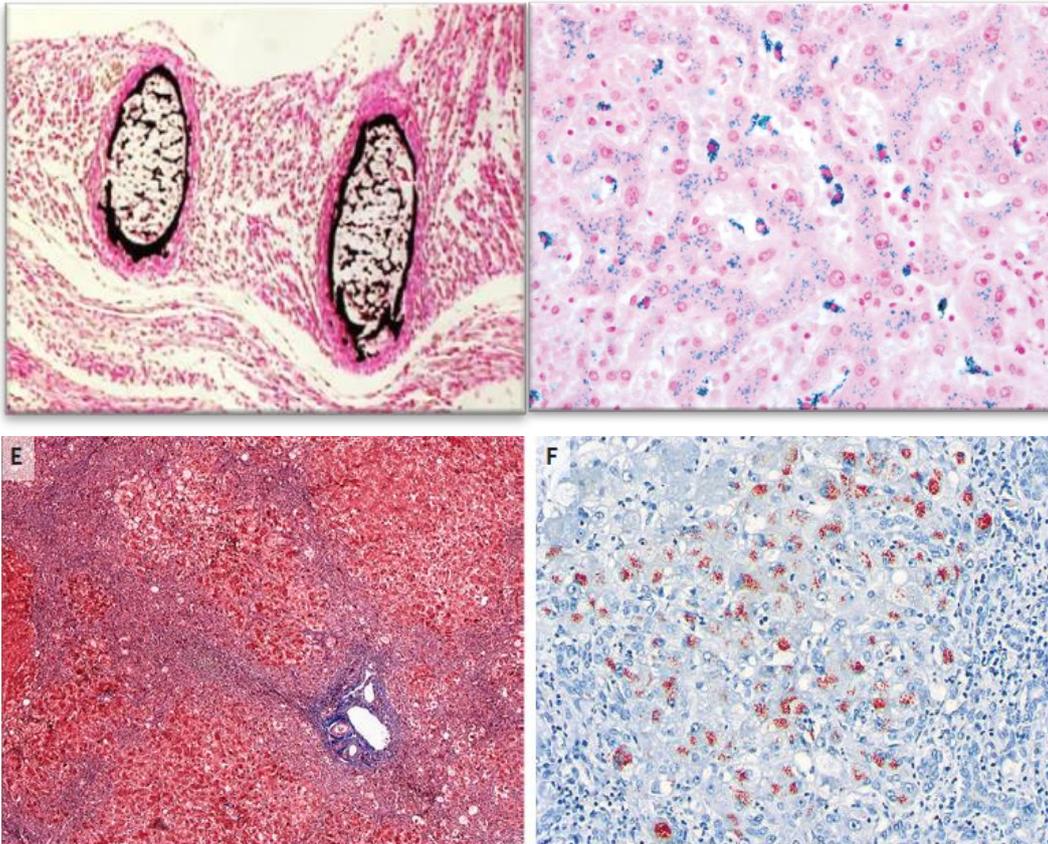


UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO**SUB UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO****SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA****“GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA
PARA COMPONENTES QUÍMICOS”**

Elaborado por: Equipo Técnico del Servicio de Anatomía Patológica de la Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico.	Revisado por: <ul style="list-style-type: none">• Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento.• Subunidad de Soporte al Diagnóstico.• Unidad de Gestión de la Calidad	Aprobado por: Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director del Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja
---	---	---

Fecha: Octubre 2019	Código: GP-006/INSN-SB/USDYT-V.01	Página 1 de 15
----------------------------	--	-----------------------



“GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA COMPONENTES QUÍMICOS”

- I. Título.....3
- II. Finalidad.....3
- III. Objetivos.....3
 - a. Objetivo General.....3
 - b. Objetivos específicos3
- IV. Ámbito de aplicación.....3
- V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT3
- VI. Consideraciones Generales.....3
 - a. Definiciones Operativas3
 - 1. Definición del Procedimiento.....3
 - 2. Aspectos Epidemiológicos importantes.....4
 - 3. Consentimiento Informado4
 - b. Conceptos Básicos4
 - c. Requerimientos Básicos.....5
- VII. Consideraciones Específicas.....5
 - a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento.....5
 - b. Indicaciones8
 - 1. Indicaciones Absolutas8
 - 2. Indicaciones Relativas.....8
 - c. Riesgos o complicaciones frecuentes8
 - d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes8
 - e. Contraindicaciones.....8
- VIII. Recomendaciones.....8
- IX. Autores, fecha y lugar.....9
- X. Anexos9
- XI. Bibliografía 115



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA COMPONENTES QUÍMICOS

“GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA COMPONENTES QUÍMICOS”

I. Título

Guía de Procedimiento: Histoquímica para Componentes Químicos

II. Finalidad

Establecer los lineamientos correctos para un adecuado procesamiento de las muestras que requieran la técnica de Histoquímica para componentes químicos garantizando un procesamiento de calidad para un diagnóstico definitivo.

III. Objetivos

a. Objetivo General

Estandarizar los procedimientos en la técnica de Histoquímica, uniformizar el proceso y asegurar la calidad del mismo.

b. Objetivos específicos

Conocer los fundamentos de las coloraciones y reacciones químicas.

IV. Ámbito de aplicación

La presente Guía de Procedimiento de Histoquímica para Componentes Químicos tiene como ámbito de aplicación al área de Inmunohistoquímica del Servicio de Anatomía Patológica del INSNSB.

V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT

CPT 88318 Histoquímica determinativa para identificar componentes químicos

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

Las técnicas de histoquímica se basan, en la tinción específica de elementos celulares o tejidos, mediante el empleo de reacciones químicas coloreadas, permitiendo la

Fecha: Octubre 2019	Código: GP-006/INSN-SB/USDYT-V.01	Página 3 de 15
---------------------	-----------------------------------	----------------



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA COMPONENTES QUÍMICOS

identificación y localización de componentes orgánicos, químicos o de microorganismos. Dentro de las técnicas para identificación de componentes químicos, tenemos:

- Azul de Prusia
- Von kossa
- Rodamina

2. Aspectos Epidemiológicos importantes

No Aplica

3. Consentimiento Informado

No Aplica

b. Conceptos Básicos

Azul de Prusia: Esta coloración se utiliza para visualizar depósitos de iones férricos en muestras de tejido. Un exceso de hierro depositado en órganos como el hígado, el bazo y la médula ósea puede ser resultado de una hemocromatosis. Estos depósitos interfieren en el funcionamiento del órgano afectado y pueden ser fatales. Este procedimiento se basa en los trabajos de Perls.

La hemosiderina representa las reservas de hierro del cuerpo, el cual se encuentra en estado férrico; el hierro se puede visualizar por su liberación de la hemosiderina con ácido clorhídrico, formando cloruro férrico; el hierro reacciona con el ferrocianuro de potasio para formar ferrocianuro férrico, esto es un compuesto azul insoluble conocido como azul de Prusia o azul de Berlín, la intensidad del color da una indicación en cuanto a cantidad, pero es sólo cualitativa. Otras fuentes de hierro férrico también serán visualizadas.

Von Kossa: Las sales de calcio están presentes normalmente en los huesos, dientes y sangre aunque en ocasiones también aparecerán áreas de calcificación en tejidos desprovistos de ellas. En general las sales que con mayor frecuencia se depositan son carbonatos, oxalatos y fosfatos.

Rodamina: El cobre es un oligoelemento esencial para el ser humano. La detección de cobre se utiliza para el diagnóstico de la enfermedad de Wilson, ésta se presenta con acúmulos de cobre en el hígado, córnea y sistema nervioso. Para su detección se utiliza el método de Rodamina.

c. Requerimientos Básicos**➤ Equipos Biomédicos**

- Micrótopo
- Baño de flotación
- Estufa
- Microscopio

➤ Materiales NO Fungibles

- Pinzas
- Canastillas
- Pizeta

➤ Materiales Fungibles

- Agua destilada
- Láminas
- Pipetas pasteur
- Ferrocianuro de Potasio
- Ácido Clorhídrico
- Nitratato de plata
- Tiosulfato de Sodio
- 5-p-dimetilminobencilidina rodanina
- Alcohol absoluto
- Formalina al 40%
- Acetato de sodio
- Eosina
- Hematoxilina de Mayer
- Láminas cargadas
- Tips
- Lamillas
- Guantes de nitrilo

VII. Consideraciones Específicas**a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento****➤ RECEPCIÓN DE SOLICITUD**

1. Recepcionar la solicitud de estudios especiales para Histoquímica de componentes químicos. (Anexo 2)

Fecha: Octubre 2019	Código: GP-006/INSN-SB/USDYT-V.01	Página 5 de 15
---------------------	-----------------------------------	----------------



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA COMPONENTES QUÍMICOS

2. Verificar el código AP de la solicitud (Ej. 19PQ-150) y los estudios solicitados. (Anexo 2)
3. Registrar en la bitácora del área de Histoquímica lo solicitado. (Anexo 3)

➤ PROCESAMIENTO PARA PRUEBA DE HISTOQUÍMICA

1. Protocolo para procesamiento de muestras para identificar componentes químicos.

Los bloques de parafina deben ser cortados en el micrótopo (**Anexo N°4**). Las láminas deben ser desparafinadas e hidratadas antes de la coloración (**Anexo N°5**). Terminado el procedimiento llenar el cuaderno de entrega de láminas de HQ a microscopía (**Anexo N 7**) y entregar láminas al patólogo.

2. Histoquímica determinativa para identificar componentes químicos

✓ AZUL DE PRUSIA, FIERRO, O PERLS

Procedimiento:

- a. Desparafinar e hidratar. (**Anexo 5**)
- b. Mezclar Ferrocianuro de potasio al 10% en una proporción 1:1 con la solución de HCl al 10%.
- c. Agregar la mezcla a la lámina por 30 minutos.
- d. Lavar con agua destilada.
- e. Contrastar con Eosina de 5 a 10 segundos.
- f. Lavar
- g. Deshidratar y montar. (**Anexo 6**)

Resultado:

- Depósitos de Hierro (hemosiderina), algunos óxidos y sales de hierro: **color azul.**
- Núcleos y citoplasma: **color rosado.**

✓ VON KOSSA

Soluciones de trabajo

- Solución acuosa de nitrato de plata al 5%
 - Nitrato de plata..... 5gr
 - Agua destilada100 ml

Fecha: Octubre 2019	Código: GP-006/INSN-SB/USDYT-V.01	Página 6 de 15
---------------------	-----------------------------------	----------------



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA COMPONENTES QUÍMICOS

- Solución de tiosulfato sódico al 2.5%
 - Tiosulfato de Sodio-----2.5gr
 - Agua destilada-----100ml

Procedimiento:

- a. Desparafinar e hidratar **(Anexo 5)**
- b. Colocar solución de nitrato de plata al 5% en la muestra por 60 minutos o más bajo luz incandescente directa.
- c. Lavar con agua destilada
- d. Lavar en solución tiosulfato 2.5% repetidas veces.
- e. Lavar con agua destilada
- f. Contrastar con Eosina de 5 a 10 segundos.
- g. Deshidratar y montar **(Anexo 6)**

Resultados

- Iones de calcio o calcificación: **negro**
- Núcleos y citoplasma: **rosado**

✓ RODANINA

Soluciones de trabajo:

- Solución de rodanina al 0.2%
 - 5-p-dimetilminobencilidina rodanina..... 0.2 gr
 - Alcohol etílico absoluto.....100 ml
- Solución estabilizadora de acetato pH 8 – 8.3:
 - Formalina al 40%..... 5ml
 - Acetato de sodio..... 20 gr
 - Agua destilada..... 1 000ml
- Solución de Hematoxilina de Mayer

Procedimiento:

- a. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada. **(Anexo 5)**
- b. Se introduce en la solución diaria de Rodanina a 37°C, por 18 horas.
- c. Enjuagar con solución estabilizadora 3 veces.
- d. Hematoxilina de Mayer por 10 minutos para contrastar
- e. Enjuagar con solución estabilizadora 3 veces.
- f. Deshidratar y montar. **(Anexo 6)**

Fecha: Octubre 2019	Código: GP-006/INSN-SB/USDYT-V.01	Página 7 de 15
---------------------	-----------------------------------	----------------

**Resultados:**

- Cobre: **negro**
- Núcleos: **rojo**

3. Entrega de Láminas

- Entregar láminas al Médico Patólogo correspondiente. **(Anexo 7)**
- Entregar los bloques de parafina a archivo.

b. Indicaciones**1. Indicaciones Absolutas**

La Histoquímica es una técnica utilizada como apoyo al diagnóstico Médico especializado. Es indicada para la tipificación de diferentes enfermedades y como estudio complementario de casos que cuentan con cierta complejidad.

2. Indicaciones Relativas

No aplica

c. Riesgos o complicaciones frecuentes

Verificar los reactivos a utilizar, para evitar una mala reacción de la coloración.

d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes

No aplica

e. Contraindicaciones

Muestras ya coloreadas están contraindicadas para realizar esta técnica pues éstas puede que no reaccionen de forma adecuada.

VIII. Recomendaciones

- La fijación debe ser suficiente para que la muestra quede bien fijada pero no excesiva para evitar deterioros o alteraciones del tejido.
- La validación de los resultados de Histoquímica se debe realizar con la observación de la reacción de los controles de calidad positivos de cada uno de las coloraciones solicitadas.
- Los resultados de Histoquímica deben ser correlacionados con los resultados obtenidos en la coloración de hematoxilina y eosina así como estudios de Inmunohistoquímica, Inmunofluorescencia y microscopía electrónica, si fuera necesario, para un adecuado diagnóstico.
- Cada vez que se cambie de casa comercial y/o lote de reactivos de determinada coloración pueden presentarse cambios en los protocolos estandarizados por lo cual este debe ser estandarizado nuevamente para un óptimo resultado.

Fecha: Octubre 2019	Código: GP-006/INSN-SB/USDYT-V.01	Página 8 de 15
---------------------	-----------------------------------	----------------



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA COMPONENTES QUÍMICOS

IX. Autores, fecha y lugar

Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja
Sub Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Servicio de Anatomía Patológica
Fecha de Elaboración: Octubre 2019
Vigencia: 02 años a partir de su aprobación con R.D.

Autores:

1. Lic. T.M. Susan Ramos Meza

sramosm@insnsb.gob.pe

X. Anexos

- Anexo N° 01: Flujograma de Histoquímica
- Anexo N° 02: Solicitud de Estudio de Coloraciones Especiales
- Anexo N° 03: Bitácora de Histoquímica
- Anexo N° 04: Corte Histológico en Micrótomo
- Anexo N° 05: Desparafinado e Hidratado en Láminas
- Anexo N° 06: Montaje de Láminas
- Anexo N° 07: Registro de entrega de Láminas a Microscopía

Fecha: Octubre 2019

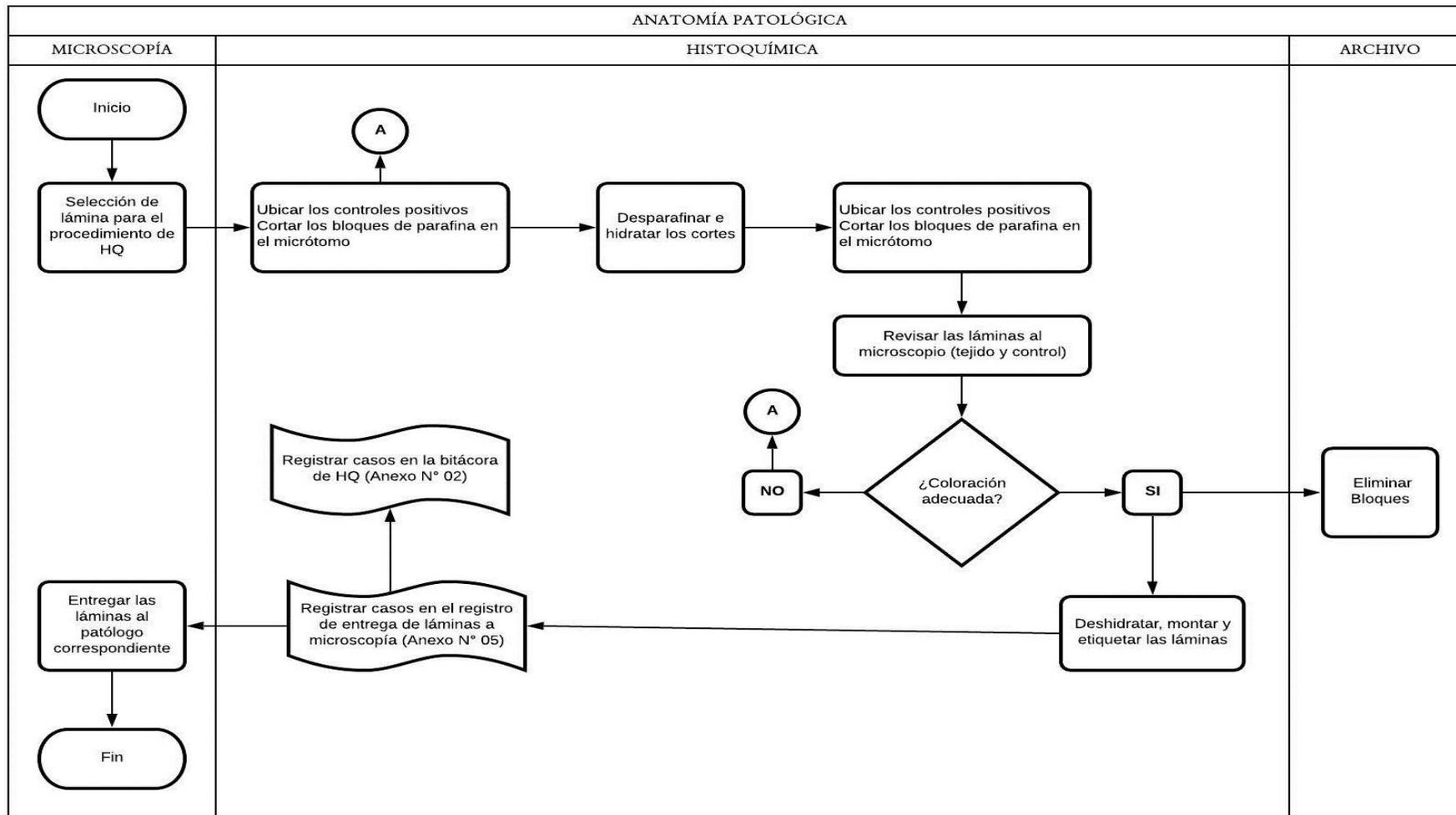
Código: GP-006/INSN-SB/USDYT-V.01

Página 9 de 15



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA COMPONENTES QUÍMICOS

Anexo N° 01: Flujograma de Histoquímica





GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA COMPONENTES QUÍMICOS

Anexo N° 02: Solicitud de Estudio de Coloraciones Especiales



SOLICITUD DE ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO	DATOS DEL PACIENTE				CODIGO AP:
	APELLIDOS Y NOMBRES				
SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA	EDAD	SEXO	SERVICIO	HC	FECHA DE SOLICITUD

INMUNOHISTOQUÍMICA

ANTICUERPO	ANTICUERPO	ANTICUERPO	ANTICUERPO
Actina	CD33	EBV	Myosin Smooth
AFP	CD34	E-cadherina	Myo01
Bcl2	CD35	EMA	Neurofilamento
Bcl6	CD43	FLI-1	NSE
Calretinina	CD45	GFAP	OCT-4
Cytomegalovirus	CD56	GLUT1	Olig-2
CD3	CD61	GlycophorinA	Pax 5
C4d	CD68	GranzymeB	PLAP
CD1a	CD79a	HCG	Podoplanin
CD4	CD99	HLA-DR	p53
CD5	CD117 c-kit	Herpes Simplex virus	SV40
CD7	CD138	Melanosoma (HMB-45)	Synaptophysin
CD8	CD163	IgG4 Rmab	S-100
CD10	CD246 (ALK)	IgM	TDT
CD13	CEA	INI-1	TIA-1
CD15	CK CoCktail (AE1-AE3)	Kappa light chain	Vimentin
CD19	CK5 Rmab	Ki-67	Von Willebrand
CD20	CK7	Lambda light chain	WT-1
CD1	CK19	Langerin	
CD23	CK20	Neu-N	
CD30	Collagen Type IV	Mieloperoxidasa	
CD31	Desmin	Myogenin	

OBSERVACIONES:

INMUNOFLUORESCENCIA

DIRECTA

ANTICUERPO
C1Q
C3c
IG A
IG G
IG M
KAPPA
LAMBDA
FIBRINOGENO

INDIRECTA

ANTICUERPO
C4D
COLAGENO IV
COLAGENO VII
CK 14
INTEGRINA B-4
LAMININA
PLECTINA

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Microscopía Electrónica: Diagnóstica Pieza Menor
Microscopía Electrónica: Diagnóstica Pieza Mayor
Microscopía Electrónica: Diagnóstica Pieza Recuperada
Microscopía Electrónica: Diagnóstica Líquidos, suspensiones y otros

HISTOQUÍMICA

AURAMINA	DESPIGMENTACION DE MELANINA	PERLS	VERHOEFF
ALCIAN BLUE	FONTANA DE MASSON	RETICULINA	VON KOSSA
AZUL DE TOLUIDINA	METEN PLATA	RODANINA	WARTHIN STARRY
CRISTAL VIOLETA	OIL RED	ROJO CONGO	ZIELH NEELSEN
GIEMSA	PAS	SUDAN III o IV	
GRAM	PAS/ALCIAN BLUE	TRIC MASSON	
GROCOTT	PAS DIASTASA	VAN GIESON	

Anexo N° 04: Corte Histológico en Micrótopo

1. Ubicar los bloques de parafina de la muestra problema y controles positivos. Enfriar los bloques en la plancha de enfriamiento -20°C.
2. Rotular las láminas de acuerdo al estudio solicitado.
3. Realizar los cortes de la muestra problema en el micrótopo con un grosor de 2 micras.
4. Recoger el corte de tejido con una pinza y colocar en un recipiente con agua fría.
5. Recoger con la lámina el corte de tejido y colocar en baño de flotación. Temperatura del agua: 50°C +/- 2 °C.
6. Recoger nuevamente el corte de tejido con una inclinación de 45°, evitar formar burbujas. Centrar el tejido en la lámina y dejar secar por 10 a 15 minutos.
7. Repetir los pasos desde el punto N°3 al N°6 para los controles positivos y colocar los cortes en la parte inferior de la muestra problema.
8. Registrar en Galenos los casos con las pruebas solicitadas.

Anexo N° 05: Desparafinado e Hidratado en Láminas

1. Colocar las láminas en la estufa (70°C).
2. Dejar por un máximo de 50 minutos para que se adhiera el tejido a la lámina.
3. Tratar los cortes en xilol 1, durante 5 minutos.
4. Regresar a la estufa por 5 minutos.
5. Tratar los cortes en xilol 2, durante 5 minutos.
6. Tratar los cortes en alcohol absoluto 1, durante 1 minuto.
7. Tratar los cortes en alcohol absoluto 2, durante 5 minutos.
8. Tratar los cortes en alcohol corriente 96°, durante 1 minuto.
9. Lavar en agua corriente 1 minuto.

Anexo N° 06: Montaje de Láminas

1. Realizar la deshidratación con alcoholes de menor a mayor concentración:
Un alcohol corriente de 96°C y un alcohol absoluto 99.6°C por 30 segundos cada uno.
2. Realizar el aclaramiento de las muestras con xilol o sustituto de xilol.
3. Colocar las laminillas cubre objeto en la mesa y agregar una gota de solución de montaje (Entellan).
4. Tomar una lámina con la muestra hacia abajo y presionar lentamente sobre la laminilla y centrarla.
5. Limpiar con una tela el exceso de solución de montaje.
6. Etiquetar las láminas según el código correspondiente.

Fecha: Octubre 2019	Código: GP-006/INSN-SB/USDYT-V.01	Página 13 de 15
----------------------------	--	------------------------



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: HISTOQUÍMICA PARA COMPONENTES QUÍMICOS

XI. Bibliografía

1. Jinsong Zhou. Histochemistry. 1era Edición. Germany. De Gruyter. 2017.
2. Ricardo M, Raquel G. Fundamentos teóricos y prácticos de la Histoquímica. 1era Edición. España. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 2008
3. Richard H, Gustav F. Histochemistry: An explanatory outline of histochemistry and biophysical staining. Germany. Butterwoths. 1982.