

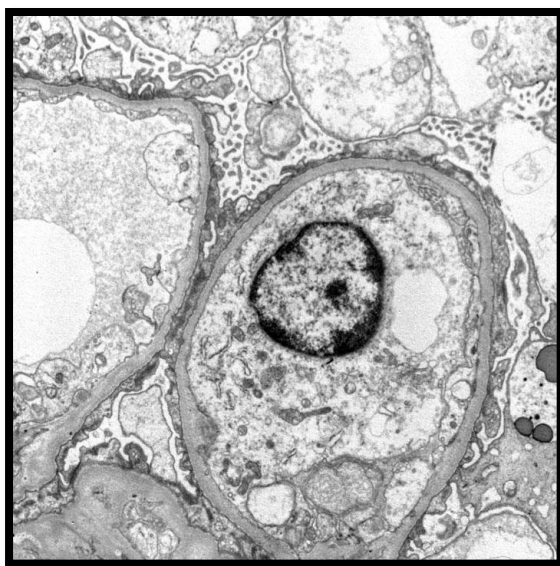
Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMINETO

SUB-UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO

SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

**“GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA
ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN”**



Elaborado por: Equipo Técnico de la Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico	Revisado por: <ul style="list-style-type: none">• Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento• Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico• Unidad de Gestión de la Calidad	Aprobado por: Dr. Antonio Ricardo Zopfí Rubio Director del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja
Fecha: Octubre del 2019	Código: GP-002/INSN- SB/ USDYT/SAP-V.02	Página 1 de 29

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

I.	Título	3
II.	Finalidad	3
III.	Objetivos	3
a.	Objetivos Generales.....	3
b.	Objetivos Específicos	3
IV.	Ámbito de aplicación	4
V.	Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT	4
VI.	Consideraciones Generales	4
a.	Definiciones Operativas.....	4
1.	Definición del Procedimiento	4
2.	Aspectos Epidemiológicos importantes.....	4
3.	Consentimiento Informado	4
b.	Conceptos Básicos.....	5
c.	Requerimientos Básicos	6
VII.	Consideraciones Específicas	8
a.	Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:.....	8
b.	Indicaciones:.....	20
c.	Riesgos o Complicaciones Frecuentes:.....	20
d.	Riesgos o complicaciones poco frecuentes Contraindicaciones:.....	20
e.	Contraindicaciones:.....	20
VIII.	Recomendaciones	20
IX.	Autores, Fecha y Lugar	21
X.	Anexos.....	22
XI.	Bibliografía.....	29

Fecha: Octubre del 2019	Código: GP-002/INSN- SB/ USDYT/SAP-V.02	Página 2 de 29
-------------------------	--	----------------

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

I. TÍTULO

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

II. FINALIDAD

Contribuir a la implementación de un instrumento técnico-administrativo para el manejo y procesamiento de muestras con indicación de estudios por Microscopia Electrónica de Transmisión realizados en el Servicio de Anatomía Patológica perteneciente a la Sub-Unidad de Soporte al Diagnóstico del INSNSB.

III. OBJETIVOS

a. Objetivos Generales

Proporcionar un instrumento técnico-administrativo para la práctica profesional del personal del Laboratorio de Procesamiento de Muestras de Microscopia Electrónica de Transmisión.

b. Objetivos Específicos

- Definir conceptualmente los procesos y terminología propia del área de Microscopia Electrónica de Transmisión para un mejor entendimiento y aplicación de la Guía de Procedimientos.
- Describir los procedimientos que competen al personal del Laboratorio de Procesamiento de Muestras de Microscopia Electrónica de Transmisión.
- Estandarizar los procedimientos ejecutados en el Laboratorio de Procesamiento de Muestras de Microscopia Electrónica de Transmisión.

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

IV. ÁMBITO DE APLICACIÓN

La presente Guía de Procedimientos es de aplicación a la práctica profesional del personal responsable del Laboratorio de Procesamiento de Muestras de Microscopía Electrónica de Transmisión.

V. NOMBRE DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR Y CÓDIGO CPT

- Microscopia electrónica; diagnostica - Pieza menor. Código **CPT 88348**
- Microscopia electrónica; diagnóstica - Pieza Mayor. Código **CPT 88348a**
- Microscopia electrónica; diagnóstica - Pieza Recuperada. Código **CPT 88348b**

VI. CONSIDERACIONES GENERALES**a. Definiciones Operativas****1. Definición del Procedimiento**

Es el conjunto de técnicas a las que son sometidos los tejidos o materiales biológicos para poder ser observados al Microscopio Electrónico de Transmisión (MET), el principal objetivo es conservar la morfología tisular de la muestra, preservando de forma similar a su estado “in vivo” la estructura intra y extracelular del tejido, hasta obtener cortes ultrafinos de la muestra que resistan el alto vacío y sean estables al haz de electrones, durante la observación en el MET (ANEXO N° 1).

2. Aspectos Epidemiológicos importantes

No aplica.

3. Consentimiento Informado

No aplica.

Fecha: Octubre del 2019	Código: GP-002/INSN- SB/USDYT/SAP-V.02	Página 4 de 29
-------------------------	--	----------------

b. Conceptos Básicos**1. Microscopio Electrónico de Transmisión:**

El microscopio electrónico de transmisión (MET) es un instrumento que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final sobre un dispositivo de carga acoplada (CCD) que puede tener miles de aumentos con una definición inalcanzable para cualquier otro instrumento. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes.

2. Fijación:

La finalidad del proceso de fijación es la de preservar la ultraestructura biológica. El fijador ideal debe ser capaz de detener el proceso de degradación autolítico durante el tiempo de la fijación. Además debe proteger a la muestra de posibles alteraciones durante los procesos de inclusión, corte y observación al microscopio electrónico. Fijador utilizado: Glutaraldehído al 2,5 – 2,8%.

3. Deshidratación:

La deshidratación es el proceso de sustitución del agua en la célula por un líquido que actúa como solvente entre el medio celular acuoso y la resina de inclusión (hidrofóbica). Los agentes de deshidratación más usados son el etanol y la acetona. Con este paso se pretende lograr el reemplazo del medio acuoso utilizando una serie de concentración ascendente del agente deshidratante. La serie comienza con una concentración de 20, 35% seguida por 50, 70, 80, 95 y 100% acetona.

Fecha: Octubre del 2019	Código: GP-002/INSN- SB/ USDYT/SAP-V.02	Página 5 de 29
-------------------------	--	----------------

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

4. Inclusión:

Es el proceso que consiste en la sustitución de la mezcla resina: compuesto intermediario por resina pura que polimerizará bajo ciertas condiciones, proporcionando a la muestra el soporte físico necesario para la obtención de cortes finos (60-90 nm).

5. Ultramicrotomía:

Procedimiento de obtención de secciones ultrafinas a partir de una muestra previamente incluida en resina con el fin de observarlas al MET. Para obtener los cortes finos a ser observados al MET, es necesario efectuar las siguientes operaciones usando el ultramicrotomo.

- a. Tallar (trimming) el bloque en forma de pirámide truncada.
- b. Obtener cortes gruesos (0,1-0,5 μm aprox.) para confirmar la calidad de la inclusión y seleccionar la región donde se obtendrán los cortes finos.
- c. Obtener los cortes finos.
- d. Recoger los cortes en rejillas preparadas con membrana de soporte.

c. Requerimientos Básicos**1. Equipos Biomédicos.**

- Ultramicrotomo digital automático marca Leica EM UC7
- Máquina para fabricar cuchillas de vidrio marca Leica EM KMR3
- Platina calentadora marca Leica EM MP
- Potenciometro marca Thermo Scientific, Orion Dual Star (pHmetro)
- Microscopio óptico marca Leica DM 750
- Platina Caliente marca Thermo Scientific (Hotplate)
- Balanza Analítica marca A&D, FX300
- Esterilizador a calor seco marca Memmert, SNE 200 (capacidad 22 litros)
- Campana extractora de gases marca ESCO modelo ADC-4C3

Fecha: Octubre del 2019

Código: GP-002/INSN- SB/
USDYT/SAP-V.02

Página 6 de 29

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

2. Materiales Médicos no Fungibles.

- Pinzas Tweezer self closing EMS (Referencia: 78319-4X y 78518-3C)
- Asa de recolección (Perfect Loop EMS, referencia: 70944)
- Cronometro 3 tiempos.
- Lápices permanentes
- Pipetas automáticas marca eppendorf (10,100,200,1000 uL)
- Cápsulas Petrie con divisiones
- Recipientes para pesar reactivos
- Tijeras
- Embudo de vidrio
- Probeta de 100 mL
- Vaso precipitado de vidrio de 100, 200, 1000 mL
- Dispensador agua destilada
- Mechero de alcohol

3. Materiales Médicos Fungibles.

- Cuchilla de diamante 35° o 45° de 2,0 a 2,5 mm marca DIATOME
- Hojas de afeitar
- Cuchillas desechables
- Barras de vidrio 400 x 25 x 6.4 mm (Glass Strip)
- Barras de vidrio 400 x 25 x 8 mm (Glass Strip)
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Portaobjetos 25.4 x 76.2 mm
- Cubreobjetos 22 x 22, 22 x 40, 22 x 50 mm
- Parafilm
- Grillas de cobre 300 mesh
- Grillas de cobre con Fomvar

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

- Papel absorbente
- Detergente líquido
- Mascarillas
- Cera dental
- Dispositivo plástico para cuchilla de vidrio de 6.4 y 8 mm.
- Frascos de penicilinas tapa rosca 5 mL
- Pipetas de transferencia desechables 3 mL

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS**a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:****1. PROCESAMIENTO DE BIOPSIAS PARA ESTUDIO DE MET**

El siguiente procedimiento aplica para muestras categorizadas como:

- Código **CPT 88348**-Microscopia electrónica; diagnostica - Pieza menor.
- Código **CPT 88348a** -Microscopia electrónica; diagnóstica - Pieza Mayor.

1.1 Transporte y recepción de la muestra

En cuanto al transporte de la muestra, lo ideal es coordinar previamente con el Servicio de Anatomía Patológica para la entrega de un kit de fijación proporcionado por el personal del área de Microscopía Electrónica o quien se encuentre de turno. En los casos en que las muestras sean remitidas directamente sin previa coordinación, se recibirán si estas llegan en condiciones en las que se ha cuidado la conservación de la muestra.

En la recepción del Servicio de Anatomía Patológica se verificará los datos del paciente con la orden y se le asignará un código **ME**, luego se dará aviso al área de microscopia electrónica para que el médico patólogo y/o el tecnólogo médico de turno realice una valoración de la calidad y las condiciones en las que llega la muestra, también se deberá considerar otros aspectos, que incluyen: si llega o no en fijador, y si requiere otro tipo de

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

estudios, todos estos datos se deberán registrar en el formato de MACROSCOPIA de M.E (ANEXO N°2).

NOTA: *En los casos en que se reciba un frasco con una o dos muestra(s) y se solicite otros estudios aparte de ME (Ejm: IFI, PQ), se deberá seccionar la muestra previa evaluación macroscópica con el patólogo responsable del caso o el que se encuentre de turno.*

Las muestras serán inscritas en el libro de REGISTRO DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA de forma correlativa según número de biopsia, incluyendo un registro digitalizado paralelo creado en la carpeta compartida que sigue la ruta Z:\TECNOLOGIA MEDICA\MICROSCOPIA ELECTRONICA\BITACORA MUESTRAS MICROSCOPIA ELECTRONICA 2016.xlsx

1.2 Fijación

Las muestras deberán ser fijadas en glutaraldehído al 2,5% por al menos 24 horas a 4°C, antes de iniciar la post-fijación con Tetróxido de Osmio al 1%. Si la muestra hubiera sido transportada en formol al 10%, se puede cambiar a glutaraldehído al 2,5% previo lavado en buffer Veronal durante 5 minutos repitiendo 3 veces.

1.3 Post-fijación y tinción en bloque

Una vez fijadas las muestras, son lavadas en buffer Veronal por 15 minutos, luego se realiza una post-fijación con Tetróxido de Osmio al 1% por 1hr a 4°C (el Tetróxido de Osmio es un fijador clásico de ME preserva las lipoproteínas del tejido las cuales se tornan de un color negro característico), seguido de un lavado en agua destilada de 15 minutos y tinción en bloque con una solución de Acetato de Uranilo acuoso por 1 hora a 4°C.

1.4 Deshidratación e impregnación

La deshidratación del tejido se realiza en Acetona a diferentes concentraciones

Fecha: Octubre del 2019	Código: GP-002/INSN- SB/ USDYT/SAP-V.02	Página 9 de 29
-------------------------	--	----------------

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

ascendentes (20%; 35%; 50%; 70%; 85% y 95%) durante 10 minutos en cada una, luego se tratan con acetona 100% en 2 cambios de 15 minutos cada uno. Finalmente, las muestras se dejan en una mezcla de EPON-Acetona en proporción 1:3 por al menos 1 hora, seguido de una mezcla 1:1 dejándola por toda una noche, finalmente al día siguiente se destapa el frasco a primera hora para que la acetona se evapore y la muestra siga impregnándose de resina, también se puede optar por cambiar la última mezcla por resina EPON que se utilizará en la inclusión.

1.5 Inclusión en resina epóxica

Se utilizan moldes de inclusión de polipropileno, se procede a identificar los moldes con el código ME asignado en el registro de recepción. Se procede a vaciar la mezcla de Epon (resina) en los moldes de inclusión (La mezcla de EPON que es preparada con antelación, debe presentar una consistencia muy homogénea, la cual se obtiene al agitar la mezcla por un tiempo mínimo de 12 minutos y puesto en una campana de vacío por media hora).

Se deposita la cantidad necesaria de mezcla de EPON para llenar el molde hasta la mitad, evitando la formación de burbujas en el fondo del molde, dejar reposar a temperatura ambiente por media hora. Posteriormente, se introduce el tejido en el fondo del molde alcanzado la posición y orientación deseada, y se completa de resina hasta llenar el molde.

Los moldes conteniendo las muestras serán llevadas a la estufa a 70°C durante 48hrs para su polimerización.

1.6 Corte semifino

Para la obtención de cortes semifinos para MET, previamente se debe realizar un tallado del bloque a cortar con la finalidad de retirar el exceso de resina del perímetro de la muestra. Para ello, se monta el bloque de resina en el portamuestras y se coloca sobre el adaptador de corte del ultramicrotomo *Leica EM UC7* (Fig. 1). Los bloques son tallados con cuchillas de perfil alto desechables eliminando el exceso de resina.

Fecha: Octubre del 2019	Código: GP-002/INSN- SB/ USDYT/SAP-V.02	Página 10 de 29
-------------------------	--	-----------------

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

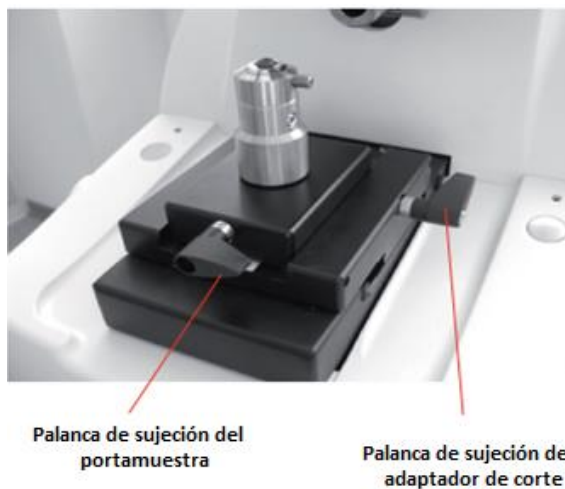


Fig. 1: Posición del portamuestra para realizar tallado

El portamuestra es montado en el arco segmentado y la cuchilla de vidrio de 6,4 o 8 mm. (fabricada en el equipo *Leica EM KMR3*), se coloca en el bloque portacuchilla (Fig. 2).



Fig. 2: Disposición del portacuchilla en ultramicrotomo *Leica EM KMR3*

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

Los cortes semifinos son de un grosor que oscila entre 0,3 a 1 μ , determinado por la dureza del tejido, se debe procurar obtener los cortes más delgados posibles. Una vez obtenidos los cortes son colocados sobre una lámina portaobjeto con ayuda del asa de recolección “Perfect Loop” (Fig. 3) en una gota de agua destilada los cuales son secados en la platina caliente a 70°C (Hot Plate Thermo Scientific) y teñidos con azul de toluidina al 1%.

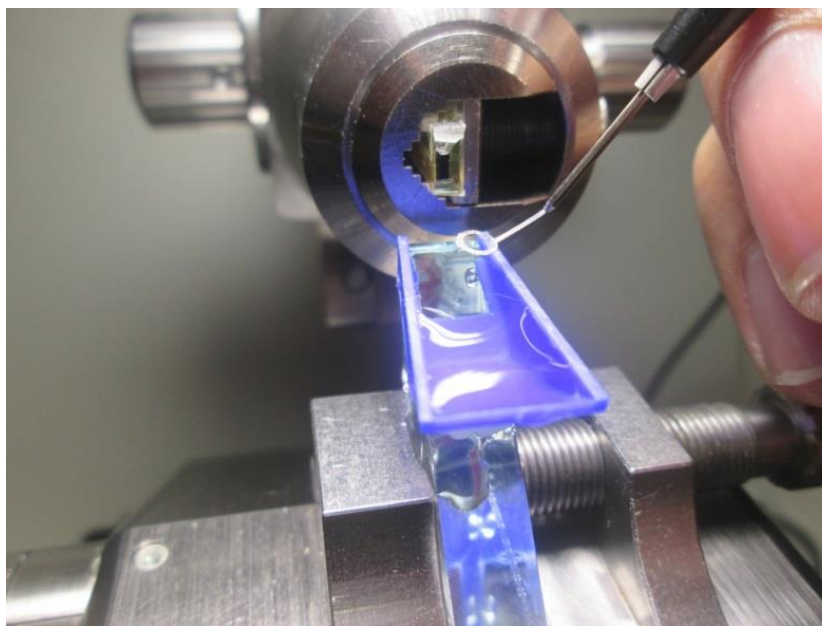


Fig. 3: Recolección de cortes semifinos con asa Perfect Loop

La lámina debe ser rotulada con el código ME. Se observa el corte semifino en el microscopio óptico con el médico patólogo para delimitar la zona más útil y apropiada para efectuar el corte ultrafino. (ANEXO N°4). Este proceso se repite desgastando la muestra las veces que sea necesario, incluyendo desgaste de las otras inclusiones del mismo caso, hasta encontrar la zona apropiada para efectuar el o los cortes ultrafinos.

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

1.7 Corte ultrafino

Previamente a realizar el corte ultrafino, se vuelve a colocar el bloque de resina en el portamuestra y con ayuda de una cuchilla desechable se talla una pirámide truncada en el extremo de la inclusión hasta delimitar un área de forma trapezoidal, cuadrada o rectangular, manteniéndola seleccionada para estudio en el corte semifino, esto se lleva a cabo con la finalidad de obtener cortes seriados en forma de cinta cuando se proceda al corte ultrafino (Fig. 4).

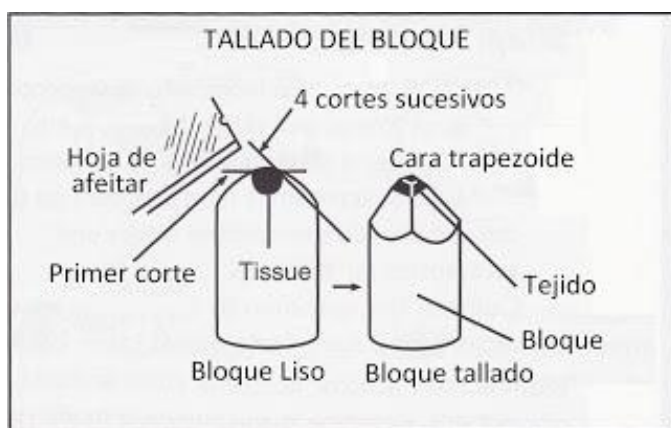


Fig. 4: Ilustración del tallado del bloque.

El corte ultrafino se realiza en el ultramicrotomo Leica EM UC7 en modo automático, con cuchilla de diamante de 35 o 45° o en su defecto con cuchilla de vidrio de 6,4 mm de espesor. Para conseguir cortes de un espesor aproximado de 70 nm (color plateado hasta amarillo rojo), se dispensa agua bidestilada sobre el área cóncava de la cuchilla de diamante, y si es una cuchilla de vidrio en la balsa formada entre la cuchilla y el dispositivo plástico los cortes, la superficie del agua debe formar un espejo plateado en la del área descrita, antes de poner en marcha el modo automático se debe ajustar en la Unidad de control avanzada de la pantalla táctil los valores de velocidad y espesor de corte (speed and feed), y ajustar el inicio y final de la ventana de corte (star and end).

Fecha: Octubre del 2019	Código: GP-002/INSN- SB/ USDYT/SAP-V.02	Página 13 de 29
--------------------------------	--	------------------------

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

El grosor de los cortes se determina según el color de interferencia:

Color de interferencia	Intervalo de espesor (nm)
gris	60
plateado	60-90
dorado	90-150
violeta	150-190
azul	190-240
verde	240-280
amarillo	280-320

Cortes semifinos con la cuchilla de vidrio deben ser de un grosor aproximado de 0.3 μm a 1 μm y los cortes ultrafinos van entre los 70 a 100 nm.

Los cortes ultrafinos que se van obteniendo a manera de cinta al pasar la superficie del bloque por el borde cortante de la cuchilla quedan flotando sobre la superficie del agua (Fig. 5), estos se recolectan sobre grillas de cobre que pueden ser con mallas (300 mesh) o fomvar, de acuerdo al tipo de muestra. Los cortes son recolectados en número variable según tamaño de la superficie de corte tallada en cada muestra, con un promedio de 2 a 6 cortes. Para cada muestra se prepara al menos 2 grillas, las que son depositadas en placas de Petri de plástico con 3 compartimientos sobre papel filtro rotulado con el número de ME. Las grillas deben ser manipuladas cuidadosamente con pinzas Tweezer self closing).

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

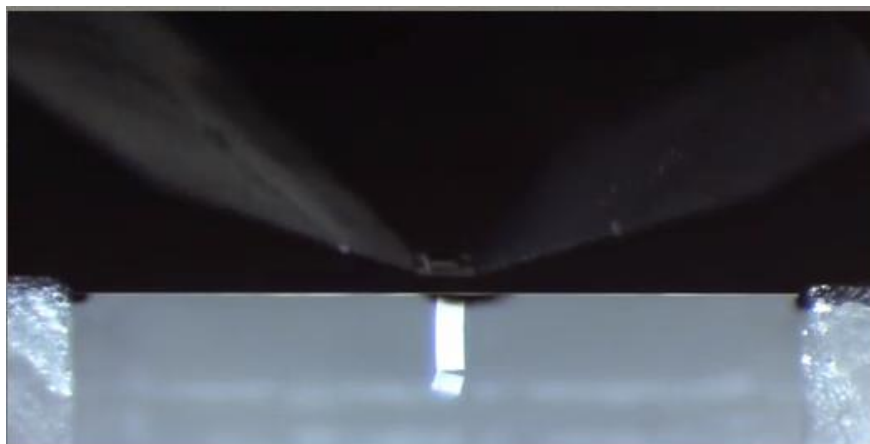


Fig. 5: Cortes ultrafinos en flotación

1.8 Contraste de grillas

El contraste de grillas debe realizarse en un ambiente limpio y bajo campana extractora de gases como medida de protección. La tinción consiste en impregnar el tejido con sales de metales pesados como Acetato de Uranilo o Permanganato de Potasio.

Como primer paso del contraste, la solución de Acetato Uranilo al 4% en metanol debe ser filtrada al momento de usar, y centrifugada en un tubo de polipropileno con tapa de 2 ml, a 6500 rpm x 10 minutos. Luego, las grillas son sujetadas con la pinza self-closing y sumergidas en la solución de Acetato de Uranilo por 10 a 15 minutos, protegiendo de la luz. Seguidamente, se debe enjuagar, sumergiendo las grillas en solución de metanol acetona 1:1, seguido de un lavado en agua bidestilada al chorro, las grillas son dejadas en la capsula de Petri sobre papel filtro por al menos 20 minutos a temperatura ambiente para su secado. Si hubiera problemas de desprendimiento de la muestra optar por lavar sólo con agua bidestilada.

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

Posteriormente, Las grillas son contrastadas con solución de Reynolds, para llevar a cabo este paso, se coloca un trozo de parafilm en una de las divisiones de la placa Petrie y se dispensa en el perímetro del parafilm lentes de Hidróxido de Sodio, para mantener el ambiente de tinción libre de humedad. En el resto de los compartimientos se ponen trozos cortados de papel parafilm sobre los que van dos gotas de la solución de Reynolds, dispensada con pipeta automática (la solución de Reynolds se obtiene atravesando con cuidado la vaselina que la protege por esto se debe tener la precaución de quebrar posteriormente la punta de la pipeta que estuvo en contacto con la vaselina) las grillas son depositadas con cuidado sobre las gotas de la solución de contraste, colocando la cara donde están los cortes en contacto con la superficie de la gota, y se dejan por 10 minutos en oscuridad. Luego se procede a lavar con agua bidestilada por inmersiones (2 ó 3 cambios) para arrastrar posibles precipitados que puedan tener las grillas.

Después del proceso de contraste, las grillas se almacenan y/o transportan en placas Petrie. Se registra la cantidad de grillas y el código ME en el **Formato de entrega de grillas y cortes semifinos a microscopia** (ANEXO N°3), y se entregan al tecnólogo médico a cargo del manejo del MET o al patólogo asignado a la revisión del caso.

NOTA: La tinción usada en este servicio es una tinción positiva, que aumenta el contraste del tejido biológico, debido al incremento de la dispersión de los elementos del haz primario que incide sobre la muestra.

El acetato de Uranilo tiñe específicamente estructuras que contienen ácidos nucleicos. El citrato de plomo (Solución de Reynolds) tiñe membranas, glicógeno, ribosomas y varios componentes tisulares. Además de intensificar la tinción de Uranilo (Ver preparación de soluciones en ANEXO 5).

1.9 Lectura y diagnóstico

La evaluación y captura de imágenes se realiza en el MET marca Tecnai modelo G2, este procedimiento se lleva a cabo por el médico patólogo designado para el diagnóstico del caso, con asistencia opcional del tecnólogo médico a cargo del manejo del MET.

Fecha: Octubre del 2019	Código: GP-002/INSN- SB/USDYT/SAP-V.02	Página 16 de 29
-------------------------	--	-----------------

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

1.10 Entrega de resultados

El diagnóstico será entregado a secretaria para su ingreso en el sistema y la entrega de resultados digitalizados.

1.11 Almacenamiento

Los tacos de resina son almacenadas en el área de procesamiento de microscopía electrónica.

Las láminas obtenidos en el corte semifino deben serán entregadas al responsable de almacén de tacos y láminas.

Las grillas que han sido entregadas al patólogo son colocadas en cajas portagrillas con se código de identificación ME y entregadas al responsable de almacén.

2. RECUPERACIÓN DE MUESTRAS INCLUIDAS EN PARAFINA

El siguiente procedimiento aplica para muestras categorizadas como:

- Código **CPT 88348b**-Microscopia electrónica; diagnóstica Pieza Recuperada.

Para la recuperación de muestras, se debe tener en cuenta las siguientes consideraciones:

Si se visualiza que el tejido ha sufrido desgaste al compararlo con el HE que acompaña el caso, se debe solicitar un nuevo corte al área de PQ, para tener una evaluación real del tejido.

El patólogo debe seleccionar la zona que será sometida a estudio, empleando un HE reciente y que conserve la integridad del tejido.

Con ayuda de una cuchilla desechable extraer la zona seleccionada del bloque de parafina.

El trozo de tejido a estudiar se debe desparafinar antes de someter al procesamiento convencional.

Fecha: Octubre del 2019	Código: GP-002/INSN- SB/ USDYT/SAP-V.02	Página 17 de 29
-------------------------	--	-----------------

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

2.1 Desparafinización

La desparafinización se realiza de la siguiente manera:

1. Colocar el tejido a procesar en un frasco de penicilina con tapa rosca, agregar xilol y dejar actuar por toda una noche.
2. A la mañana siguiente, realizar 2 cambios más de xilol por 15 min. cada uno. Eliminar decantando entre cada paso.
3. Agregar alcohol absoluto por 10 min., eliminar decantando y repetir este paso una vez más.
4. Se repite el paso anterior con alcoholes de 96° y 70°, una sola vez por cada alcohol.
5. Para finalizar se hidrata la muestra con Buffer Veronal pH 7,4.

Luego se continúa con el procesamiento convencional desde la post-fijación con Tetróxido de Osmio al 1% (no es necesario fijar nuevamente ya que el tejido fue fijado en formalina).

Este tipo de estudio se realiza por indicación del médico patólogo, ante la imposibilidad de obtener una nueva muestra con un procedimiento quirúrgico, o cuando la calidad de la muestra enviada para estudio de MET no permite un adecuado análisis.

3. PROCESAMIENTO DE CEPILLADO DE EPITELIO RESPIRATORIO PARA ESTUDIO DE CILIOS

El siguiente procedimiento aplica para muestras categorizadas como:

- Código **CPT 88348**-Microscopia electrónica; diagnostica - Pieza menor.

Para el procesamiento de muestras de cepillado de epitelio respiratorio, se debe tener en cuenta las siguientes consideraciones:

Las muestras obtenidas por cepillado deben ser fijadas en Glutaraldehído al 2,5%, proporcionado por el servicio de Anatomía Patológica INSNSB, en una cantidad que cubra la longitud del cepillo (Aprox. 2 cm).

Fecha: Octubre del 2019	Código: GP-002/INSN- SB/ USDYT/SAP-V.02	Página 18 de 29
-------------------------	--	-----------------

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

Una vez fijadas las muestras, se procede a raspar las cerdas del citocepillo con ayuda de una hoja de afeitar, para poder recolectar la mayor cantidad del tejido por arrastre.

Centrifugar la muestra a 3500 r.p.m. por 5 minutos, y eliminar el sobrenadante (fijador) con pipeta de transferencia descartable.

Luego se realiza 2 lavados en Buffer Veronal pH 7,4. Centrifugando entre cada lavado a 3500 r.p.m. por 5 minutos, eliminar el sobrenadante entre cada paso.

Continuar con el procesamiento convencional desde la post-fijación con Tetróxido de Osmio al 1%, teniendo en cuenta que entre cada paso se debe centrifugar y eliminar el líquido sobrenadante cuidadosamente, para evitar la pérdida de muestra.

4. PROCESAMIENTO DE CULTIVOS CELULARES, SUSPENSIONES DE BACTERIAS Y/O VIRUS

El siguiente procedimiento aplica para muestras categorizadas como:

- Código **CPT 88348** - Microscopia electrónica; diagnostica - Pieza menor.

Para el procesamiento de cultivos o suspensiones celulares, se debe tener en cuenta las siguientes consideraciones:

Las muestras de cultivos o suspensiones celulares ser fijadas preferentemente en Glutaraldehído al 2,5%, proporcionado por el servicio de Anatomía Patológica INSNSB.

Una vez fijadas las muestras, se procede a concentrar las muestras mediante centrifugación a 3500 r.p.m. por 5 minutos, eliminado el sobrenadante (fijador) con pipeta de transferencia descartable.

Luego se realiza 2 lavados en Buffer Veronal pH 7,4. Centrifugando entre cada lavado a 3500 r.p.m. por 3 minutos, eliminar el sobrenadante entre cada paso.

Continuar con el procesamiento convencional desde la post-fijación con Tetróxido de Osmio al 1%, teniendo en cuenta que entre cada paso se debe centrifugar y eliminar el líquido sobrenadante cuidadosamente, para evitar la pérdida de muestra.

Fecha: Octubre del 2019	Código: GP-002/INSN- SB/ USDYT/SAP-V.02	Página 19 de 29
-------------------------	--	-----------------

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

b. Indicaciones

El estudio de MET en el campo del diagnóstico anatomopatológico está indicado para el estudio de patologías renales, musculares, dermatológicas, discinesia ciliar entre otras.

c. Riesgos o Complicaciones frecuentes:

Exposición a productos químicos tóxicos e irritantes: Manipular el Tetróxido de Osmio y el Acetato de Uranilo con los implementos de bioseguridad recomendados, ya que son productos químicos con alta toxicidad. Trabajar bajo campana extractora de gases.

d. Riesgos o Complicaciones poco frecuentes:

No aplica

e. Contraindicaciones:

No aplica

VIII. RECOMENDACIONES

- Para un adecuado estudio de MET, es importante controlar las condiciones y parámetros de fijación de la muestra, ya que la calidad de las imágenes que se analizaran en el MET depende de la conservación de la ultraestructura celular.
- Realizar el procesamiento tomando las medidas de bioseguridad.
- Las imágenes obtenidas son monocromáticas y planas siendo necesario, en algunos casos, un tratamiento posterior mediante análisis de imágenes con un software especializado.

Fecha: Octubre del 2019	Código: GP-002/INSN- SB/USDYT/SAP-V.02	Página 20 de 29
-------------------------	--	-----------------



IX. AUTORES, FECHA Y LUGAR

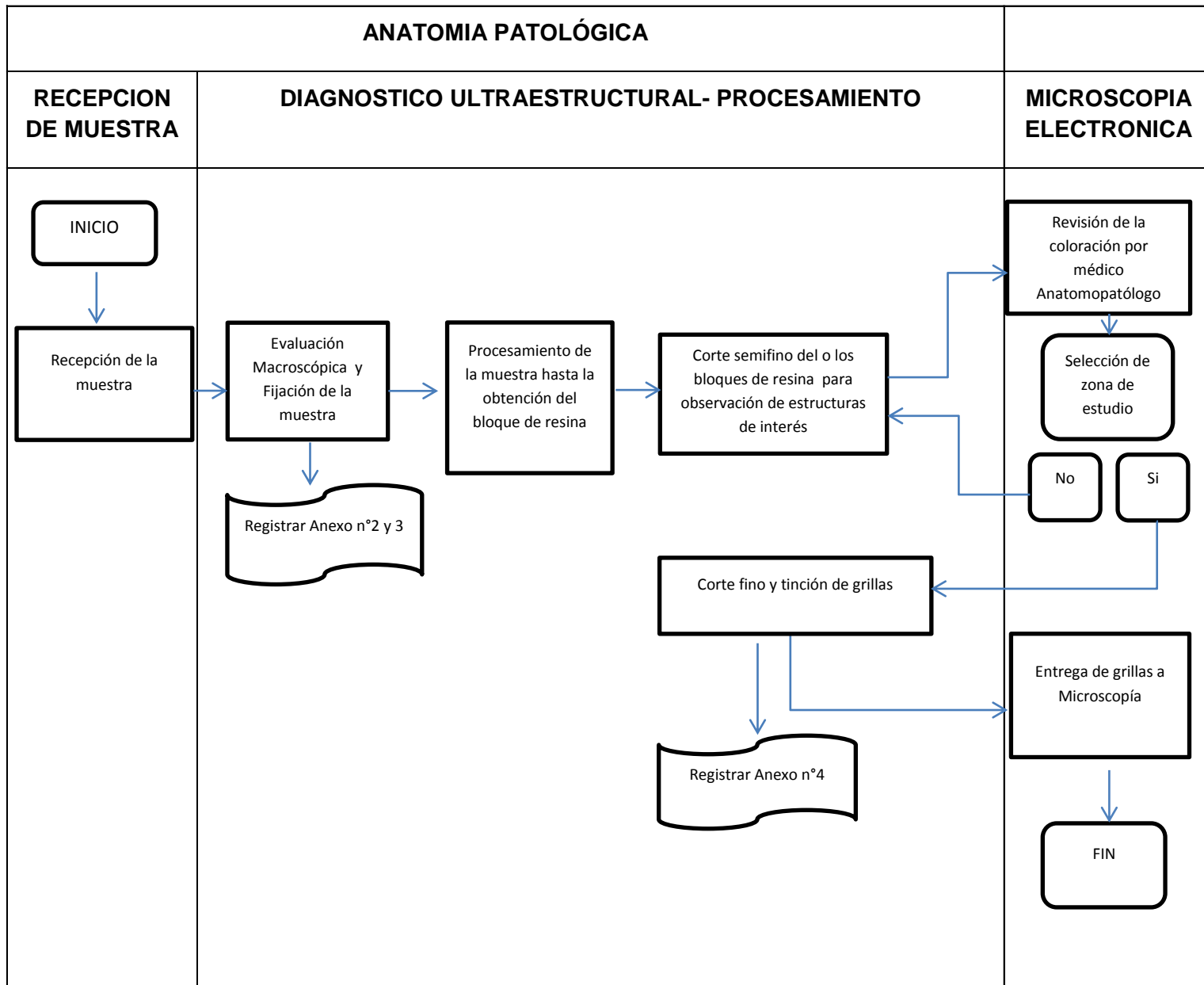
- Nombre de Autor:
-Lic. Eduardo Rafael Alvarez Rivera
ealvarez@insnsb.gob.pe
-Lic. Saby Natalia Fonseca Chávez
sfonseca@insnsb.gob.pe
- Fecha de elaboración y Lugar del Procedimiento.
Enero 2019, Instituto Nacional Del Niño San Borja/Servicio de Anatomía Patológica.
- Vigencia:
2 años a partir de su aprobación.

Fecha: Octubre del 2019	Código: GP-002/INSN- SB/ USDYT/SAP-V.02	Página 21 de 29
-------------------------	--	-----------------

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

X. ANEXOS

ANEXO N° 1: FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO



Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

ANEXO N°2: FORMATO MACROSCOPÍA DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

Paciente:		Código	ME-
INFORME ANATOMO- PATOLOGICO			
MICROSCOPIA ELECTRONICA			
DIAGNOSTICO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRASMISION:			
PIEZA PEQUEÑA () GRANDE () RECUPERADA () CODIGO TACO PARAFINA : () OTRA INSTITUCION: ()			
FECHA Y HORA DE INGRESO:			
MACROSCOPIA:		TIEMPO DE FIJACION:	
MEDIO: SOL FISIOL () GLUTARALDEHIDO () FORMOL () OTRO: _____		GLUTARALDEHIDO:	
FILAMENTOS DE TEJIDO: NUMERO () MEDIDAS: _____		TETROXIDO DE OSMIO:	
FRAGMENTOS DE TEJIDO: NUMERO () MEDIDAS _____		ACETATO DE URANILO:	
NUMERO DE BLOQUE DE RESINA PROCESADOS:			
NUMERO DE BLOQUE CORTADOS			
CORTE SEMIFINO		CORTE DE RESINA COLOREADO CON AZUL DE TOLUIDINA	
NUMERO DE GLOMERULOS			
NUMERO DE GLOMERULOS ESCLEROSADOS GLOBALMENTE () SEGMENTALMENTE()			
OTRAS LESIONES :			
TUBULO /INTERSTICIO / VASOS:			
MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRASMISION			
SE EXAMINAN CORTES ULTRAFINOS SERIADOS DE TEJIDO RENAL DE 70 NM DE ESPESOR .			
CORTE FINO		SE OBSERVAN GLOMERULO(), TUBULOS () Y VASOS.()	
NÚMERO DE GLOMÉRULOS EXAMINADOS EN CORTES ULTRAFINOS: 2.			
DEPOSITO GLOMERULAR:SI () NO () LOCALIZACION:		TIPO:	CANTIDAD
TAMAÑO Y ESTRUCTURA			
LA MEMBRANA BASAL GLOMERULAR: ARQUITECTURA		ESPESOR	
ELECTROLUCENCIA , LOS BORDES		FRACCIONAMIENTO	LAMINACION
EN EL ENDOTELIO SE OBSERVAN FENESTRACIONES		INCLUSIONES TUBULORETICULARES.	
LA MATRIZ Y CELULARIDAD MESANGIAL			
PODOCITOS			
A NIVEL DEL ESPACIO DE BOWMAN NO SE OBSERVA ALTERACION.			
TUBULOS		VASOS	
INTERSTICIO			
CONCLUSION			

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

ANEXO N°3: FORMATO BITACORA DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

[illegible]

Archivo digitalizado, carpeta compartida Q:\TECNOLOGIA MEDICA\MICROSCOPIA ELECTRONICA\BITACORA MUESTRAS MICROSCOPIA ELECTRONICA 2016.xlsx

Fecha: Octubre del 2019	Código: GP-002/INSN- SB/ USDYT/SAP-V.02	Página 24 de 29
-------------------------	--	-----------------



ANEXO N°4: FORMATO DE ENTREGA DE GRILLAS A MICROSCOPIA

AREA DE MICROSCOPIA ELECTRONICA					
REGISTRO DE ENTREGA DE GRILLAS A MICROSCOPIA					
FECHA	I/E	MEDICO ANATOMOPATÓLOGO	CODIGO ME	CANTIDAD DE GRILLAS	FIRMA

ANEXO N°5: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**5.1 Búfer Veronal sódico molar 7****Paso 1**

- Barbitol sódico peso molecular 206.18 molar⁷ = 2.94 gr. En 100 cc de agua bidestilada
- Acetato de sodio molar 7 peso molecular 82.03 1.173 grs en 100 cc de agua bidestilada
- Disolver el acetato de sodio en primer lugar y luego se agrega el Barbitol sódico.

Paso 2

- Ácido clorhídrico 0.1 N
- Ácido clorhídrico para análisis 37% peso molecular 36.45 y D= 1.19
- 0.82cc de HCL en 100cc de agua bidestilada.

Paso 3

Preparación Búfer Veronal pH 7.25

Veronal Molar 7M 50cc

HCl 0.1N 55cc

Agua bidestilada 35cc

- **Guardar todas las soluciones a 4°C.**

Solución Fijadora de Microscopia Electrónica

En el momento de usar mezclar 0.75 ml de Glutaraldehído al 8% con 2 ml de Búfer Veronal sódico a pH 7.25

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

- **Conservar a 4°C.**

5.2 Tetroxido de Osmio al 2%

- Ampollas de OSO₄ de 1gr. Muy limpias con agua jabonosa y muchos lavados de agua bidestilada.
- Se rompe la ampolla dentro de un frasco ámbar de boca ancha con 50ml de agua bidestilada.
- Se deja disolver a T° ambiente o en sonicador para acelerar la disolución
- En el momento de usar se mezcla 1 parte de Tetróxido de osmio y se mezcla con 1 de Buffer Veronal.

5.3 Solución de Acetato uranilo al 2% acuoso

- Disolver 2 grs. De acetato Uranilo en 100 cc. de agua bidestilada..

5.4 Mezcla de Epon para muestras cortadas con cuchilla de diamante (epon duro)

- Epon 812.....38.805 grs.
- MNA.....24.14 grs.
- DDSA.....12.03 grs.
- DMP..... 1.5 grs.

5.5 Solución de Acetato de Uranilo al 4% en Metanol

- Disolver 4 grs de Acetato de Uranilo en 100 cc de Metanol puro.

5.6 Solución Reynolds para tinción de ME.

- Agua Bidestilada hervida y fría (20 ml aprox.)
- Citrato de Na 1 M.

Guía de Procedimiento: Procesamiento de muestras para estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión

- Nitrato de Plomo 1 M.
- Hidróxido de Sodio 1 N.

a) Para preparar la solución, a **16 ml de agua bidestilada** hervida y fría se le agrega lentamente **3 ml de citrato de sodio 1M**, luego se agrega **2 ml de nitrato de plomo 1 M**, en este momento se forma un precipitado blanco. Este se agita hasta obtener una solución lechosa a la que se le agrega **4 ml de la solución de Hidróxido de Sodio 1 N**, lentamente y agitando hasta que la solución quede límpida.

b) Esta solución se debe preparar en un tubo muy limpio, El pH de ella debe de ser 12 o más.

c) Finalmente sobre la solución se agrega vaselina líquida para sellarla si es necesario se centrifuga antes de usar.

5.7 Azul de Toluidina al 1%

- Borato de Sodio 1g
- Azul de Toluidina..... 1gr
- Agua destilada 100 ml

a) Disolver 1 gr de Borato de Sodio (Borax) en 10ml de agua destilada caliente hasta diluir completamente, agregar 1g de Azul de Toluidina y agitar.

b) Enfriar y filtrar.



XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Hayat M.A. Principles and technique of electron microscopy, biological applications. 3ra ed. Universidad de Michigan. CRC Press; 1989.
2. John M. Papadimitriou, Douglas W. Henderson, and Dominic V. Spagnolo. Diagnostic ultrastructure of non-neoplastic diseases. Hum Pat [Internet] 2018 (citado mayo 2018); 24: página 453. Disponible en: [https://www.humanpathol.com/article/0046-8177\(93\)90101-L/abstract](https://www.humanpathol.com/article/0046-8177(93)90101-L/abstract)
3. Caribay Urbina, Pedro Rodríguez. Introducción a la Microscopía electrónica. Guía teórico práctico. Universidad Central de Venezuela. Caracas; 1997.

