

""Decenio de las Personas con Discapacidad en el Perú""
""Año de la consolidación del Mar de Grau""



RESOLUCION DIRECTORAL

Lima, 14 JUN. 2016

VISTO:

El expediente N° 15-004999-001-INSN-SB sobre la aprobación de las Guías de Procedimiento del Servicio de Anatomía Patológica; y,

CONSIDERANDO:

Que, la Ley N° 26842, Ley General de Salud, establece que la protección de la salud es de interés público y por tanto, es responsabilidad del Estado regularla, vigilarla y promoverla;

Que, el Segundo párrafo del Artículo 5° del Decreto Supremo N° 013-2006-SA, Reglamento de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo, establece que los establecimientos de salud y servicios médicos de apoyo deben contar, en cada área, unidad o servicio, con manuales de procedimientos, guías de práctica clínica referidos a la atención de los pacientes, personal, suministros, mantenimiento, seguridad, y otros que sean necesarios, según sea el caso;

Que, el inciso s) del Artículo 37° del Decreto Supremo N° 013-2006-SA, Reglamento de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo, establece que al Director Médico le corresponde disponer la elaboración del Reglamento interno, de las guías de práctica clínica y de los manuales de procedimientos referidos a la atención de los pacientes, personal, suministros, mantenimiento, seguridad, y otros que sean necesarios;

Que, en el inciso b) del literal II.4.5 del Manual de Operaciones del Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja, aprobado con Resolución Ministerial N° 512-2014/MINSA, establece que es función de la Unidad de Donación y Trasplante el implementar, conforme a las normas de la Autoridad Nacional de Salud, los principios y normas éticas y de las normas técnicas del proceso de obtención, donación, distribución y trasplante de órganos y tejidos;

Que, mediante el Anexo 3 de la Ficha de Descripción de Procedimiento: "Elaboración, Aprobación y Cumplimiento de Adherencia de las Guías de Práctica Clínica y/o Guía de Procedimiento", del Manual de Procesos y Procedimientos de la Unidad de

Gestión de la Calidad, aprobado por Resolución Directoral N° 155/2015/INSN-SB/T se establece la estructura de la Guía de Procedimiento;

Que, mediante Nota Informativa N° 00349-2016-UGC-INSN-SB, la Jefa de Oficina de la Unidad de Gestión de la Calidad, solicita a la Dirección General la aprobación de las Guías de Procedimientos remitidas por el Servicio de Anatomía Patológica; las mismas que cuentan con la opinión favorable de la Directora Ejecutiva de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento, de la Jefa de la Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico, de la Responsable del Servicio de Anatomía Patológica, y de la Jefa de Oficina de la Unidad de Gestión de la Calidad;

Con el visto bueno del Director Adjunto, de la Jefa de Oficina de la Unidad de Gestión de la Calidad, de la Directora Ejecutiva de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento; y, del Jefe de Oficina de la Unidad de Asesoría Jurídica;

Por los fundamentos expuestos y de conformidad con la Ley N° 26842, con la Ley General de Salud, con el Decreto Supremo N° 013-2006-SA, con el Reglamento de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo, con la Resolución Ministerial N° 090-2013/MINSA, con la Resolución Ministerial N° 512-2014/MINSA; y, con la Resolución Jefatural N° 340-2015/IGSS;

SE RESUELVE:

ARTÍCULO 1°.- Aprobar las Guías de Procedimiento del Servicio de Anatomía Patológica de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento; las que se detallan a continuación y forman parte de la presente Resolución:

- Guía de Procedimiento del Área de Histología (19 folios)
- Guía de Procedimiento de Microscopia Electrónica (18 folios)

ARTÍCULO 2°.- Designar a la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento como la encargada de la implementación de las Guías de Procedimiento del Servicio de Anatomía Patológica.

ARTÍCULO 3°.- Designar a la Unidad de Gestión de la Calidad, como la unidad a cargo de evaluar el cumplimiento de las presentes Guías.

ARTÍCULO 4°.- Disponer la publicación de la presente Resolución en la página Web de la Institución, conforme las normas de Transparencia y Acceso a la Información Pública.

REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y PUBLÍQUESE



EZTG/JCRG/kfb

Distribución

- () Dirección Adjunta
- () Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento
- () Unidad de Gestión de la Calidad
- () Unidad de Asesoría Jurídica
- () Archivo
- () Comunicaciones

Instituto Nacional de Salud del Niño
San Borja

Dra. Zulma Tomás Gonzales
DIRECTORA GENERAL



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja

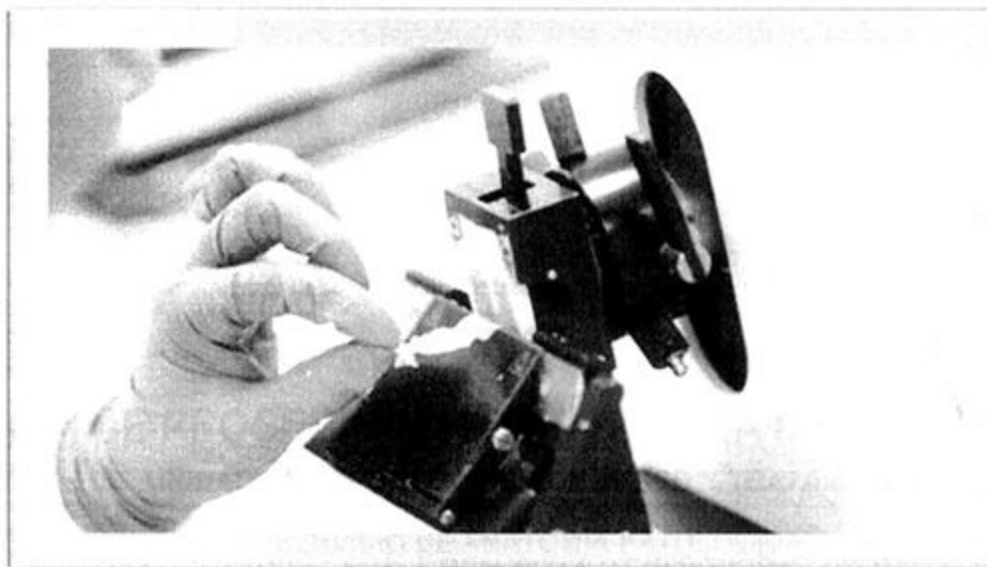
Guía de Procedimiento: Laboratorio de Histología del Servicio de Anatomía Patológica

GUÍA DE PROCEDIMIENTOS DEL ÁREA DE HISTOLOGÍA

UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO

SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA

AREA DE HISTOLOGIA



Elaborado por: Equipo Técnico del Servicio de Anatomía Patológica	Revisado por: Directora Ejecutiva de la Unidad Soporte Diagnóstico al Tratamiento Jefe de la Sub Unidad de Diagnóstico Responsable del Servicio de Anatomía Patológica Unidad de Gestión de Calidad	Aprobado por: Dra. Elizabeth Zulema Tomas Gonzales Directora General INSN - SB
Fecha: Mayo 2016	Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01	Página 1 de 19



INSN INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SAN BORJA

Dra. GEOVANNAG GUTIERREZ IPARRAGUIRE
Médica del Servicio de Anatomía Patológica
Código: 50291 R.N.E.L. 22064



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja

Guía de Procedimiento: Laboratorio de Histología del Servicio de Anatomía Patológica

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: LABORATORIO DE HISTOLOGÍA**Contenido**

I	NOMBRE Y CÓDIGO	3
II	DEFINICIÓN	3
III	INDICACIONES	7
IV	CONTRAINDICACIONES	7
V	REQUISITOS: CONSENTIMIENTO INFORMADO	8
VI	RECURSOS MATERIALES A UTILIZAR	8
VII	DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO	9
VIII	LIMITACIONES Y VALIDEZ DE RESULTADOS	15
IX	COMPLICACIONES	15
X	AUTORES, FECHA Y LUGAR	16
XI	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
XII	ANEXOS	17

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01

Página 2 de 19

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SAN BORJADra. GEOVANNA C. CORTES PARRAGUIRRE
Médico - In. del Servicio de Anatomía Patológica
C. 001 - 36293 - H. B. B. 22014

**I. NOMBRE Y CÓDIGO**

Pieza Quirúrgica Pequeña (<0.5 CC, biopsia gástrica, duodenal, colon). Código CPT 88382

Pieza Quirúrgica Mediana (>0.5 CC, biopsia de piel, biopsia hepática por aguja, cuña hepática). Código CPT 88381

Pieza Quirúrgica Grande (>5 cm: apéndice, resección intestinal). Código CPT 88380

II. DEFINICIÓN**2.1 CONCEPTOS BÁSICOS**

2.1.1 MUESTRA TALLADA O REDUCIDA: Fragmento representativo de la pieza quirúrgica obtenido luego del estudio macroscópico, de adecuado tamaño y grosor para asegurar un procesamiento y diagnóstico adecuados.

2.1.2 XILOL: Solución que tienen un alto índice de refracción y pone a tejido claro o transparente, miscible en agentes deshidratantes y medios de infiltración.

2.1.3 PARAFINA: Sustancias de tipo céreo compuestas por mezclas de hidrocarburos saturados de cadena larga y que pueden obtenerse con una amplia variación en su punto de fusión (40°-70°), en gran medida condicionante de sus diferentes aplicaciones en histotecnología.

2.1.4 MICROTOMO: Equipo que permite la obtención de secciones muy delgadas de tejido y seriado.

2.1.5 CRIÓSTATO: Equipo que consta de un micrótopo incluido en una cámara de congelación que permite enfriar rápidamente la muestra hasta -30°C ó -60° C gracias a la existencia de una placa de congelación instantánea permite la obtención de cortes mucho más delgados (por lo general de 4 µm y, en manos experimentadas, hasta 2 µm).

Fecha: Mayo 2016	Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01	Página 3 de 19
------------------	-----------------------------------	----------------





Guía de Procedimiento: Laboratorio de Histología del Servicio de Anatomía Patológica

2.1.6 COLORANTES: Sustancia que pueden conferir color a los tejidos; Según su origen se clasifican en:

Colorantes naturales:

- Animales (carmin)
- Vegetales (hematoxilina, orceína, azafrán)

- **Hematoxilina - Eosina:** La hematoxilina es un colorante básico y por lo tanto se unirá a las estructuras ácidas (ácidos nucleicos). La eosina es un colorante ácido y se unirá a las estructuras básicas (proteínas básicas). Aquellas estructuras con un pH intermedio se teñirán con ambos colorantes. Esencialmente la hematoxilina tiñe los núcleos de color azul negruzco, con buen detalle intracelular, mientras que la eosina tiñe el citoplasma celular y la mayoría de las fibras del tejido conectivo con distintas tonalidades de rosa, naranja y rojo.

Colorantes artificiales o sintéticos (colores de anilina):

- **Ácidos:** sales cuya base es incolora y su ácido es coloreado (eosina o eosinato de sodio). Son colorantes citoplasmáticos.
- **Básicos:** Sales cuya base es coloreada y el ácido es incoloro (azul de metileno o clorhidrato de azul de metileno). Son colorantes nucleares.
- **Neutros:** Sales en las que tanto el ácido como la base son coloreados. Tiñen el núcleo de un color y el citoplasma de otro.
- **Indiferentes:** No forman sales. Tiñen aquellas sustancias que tienen un poder disolvente superior al del líquido que ha servido para preparar la solución colorante (Sudán III, rojo escarlata).

Por otro lado, las coloraciones pueden ser:

- **Ortocromáticas:** los tejidos adquieren un color igual al de la solución colorante empleada.

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01

Página 4 de 19



Guía de Procedimiento: Laboratorio de Histología del Servicio de Anatomía Patológica

- **Metacromáticas:** una sustancia o un componente celular se tiñe con un color diferente al del colorante empleado.

2.2 PROCESAMIENTO DEL TEJIDO: Sistema de actividades y de acciones, que se relacionan entre sí, dirigida a la consecución de la obtención de láminas histológicas para el estudio histopatológico.

2.2.1 FIJACIÓN: Procedimiento que evita que se desnaturalicen los elementos celulares en las muestras histológicas, ya sea por sus propias enzimas (autólisis), o por bacterias, los tejidos deben ser fijados, inmediatamente después de ser extraídos; tiene por objeto mantener toda su arquitectura, tanto estructural como química, lo más inalterada posible, de tal forma que sus componentes celulares mantengan las mismas característica, que cuando dicho ser o tejidos estaban vivos. El resultado final es un tejido endurecido más resistente a las etapas subsiguientes del procesamiento.

Los objetos de la fijación son:

- Mantener las estructuras en el estado más parecido al que poseían in vivo.
- Evitar la lisis celular y la proliferación bacteriana.
- Dar cierta solidez o dureza al tejido o material, volviéndolos más resistentes para las etapas subsiguientes de las técnicas microscópicas.

La fijación detiene los procesos vitales pero en ciertas condiciones mantiene las actividades de algunos componentes moleculares, por ejemplo la actividad de algunas enzimas.

Las soluciones fijadoras una vez preparadas (anexo 2), deben ser apropiadamente identificados y las etiquetas deben contener la siguiente información:

- Nombre del fijador.
- Concentración de la solución fijadora.
- Requerimiento de almacenamiento (medio ambiente o refrigeración).
- Iniciales de la persona que preparo la solución fijadora.
- Fecha de preparación.

Fecha: Mayo 2016	Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01	Página 5 de 19
------------------	-----------------------------------	----------------





PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja

Guía de Procedimiento: Laboratorio de Histología del Servicio de Anatomía Patológica

- f. Expectativa de duración y fecha de expiración.
- g. Peligros potenciales de la solución fijadora.
- h. Ph si se trata de una solución fijadora bufferada.

2.2.2 DESHIDRATACIÓN: Proceso que tiene por finalidad la eliminación completa de agua del espécimen o muestra tisular para que se pueda embeber adecuadamente el tejido en aquellos medios de inclusión que no sean hidrosolubles, para lo cual los tejidos son sumergidos en líquidos anhidros, ávidos de agua, para evitar alteraciones provocadas por una deshidratación brusca, se aconseja proceder escalonadamente utilizando, preferentemente, alcohol etílico de graduación creciente.

2.2.3 INCLUSIÓN DEFINITIVA O FORMACIÓN DEL BLOQUE: Proceso que se realiza en moldes de metal en donde se vierte la parafina fundida, del mismo punto de fusión de la que ha servido para la penetración. la parafina es una mezcla de hidrocarburos saturados que tienen diferentes puntos de fusión. Parafina blanda funde a 44 – 48°C y la parafina dura a 56 – 58°C. Se colocan las piezas orientándolas y luego se pone el molde en heladera para que luego de 15-30 minutos la parafina se habrá solidificado completamente.

2.2.4 OBTENCIÓN DE CORTES: Proceso mediante el cual por medio de micrótomos, instrumentos de gran precisión, se obtiene cortes delgados parejos y de espesor graduable. Los cortes más corrientes son los de 3-5 micrones.

2.2.5 COLORACIÓN: Proceso mediante el cual un cuerpo es teñido por una sustancia colorante, sin perder el color cuando es lavado con el disolvente utilizado al preparar la solución colorante.

Métodos de coloración:

- **Coloración directa:** Existe una verdadera afinidad entre el colorante y el objeto.
- **Coloración indirecta:** Requiere la intervención de intermediarios o mordientes para que la coloración tenga lugar.

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01

Página 6 de 19

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SAN BORJADra. GEOVANNA G. GUTIERREZ IPARRAGUIRRE
Médica Especialista del Servicio de Anatomía Patológica

Calle 2021, San Borja, 22054





PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja

Guía de Procedimiento: Laboratorio de Histología del Servicio de Anatomía Patológica

- **Coloración progresiva:** Se hace actuar el colorante hasta que llegue a su punto óptimo.
- **Coloración regresiva:** Se realiza primero una sobrecoloración y luego se elimina el resto del colorante por medio de diferenciadores. A este proceso se lo denomina diferenciación.
- **Coloración simple:** Se colorean solamente algunos elementos del preparado (núcleo, fibras elásticas, etc.).
- **Coloración combinada:** Se tiñen los elementos nucleares y citoplasmáticos recurriéndose, generalmente, al empleo sucesivo de colores básicos y ácidos que contrastan por sus colores.
- **Coloración panóptica:** Es una coloración combinada realizada sucesivamente por colorantes neutros (May-Grünwald-Giemsa).
- **Coloración pancrómica:** En un solo baño colorante actúan todos los colorantes neutros que se necesiten.

2.2.6 ACLARAMIENTO: Es el paso final de la tinción donde se produce la transparencia celular, para lo cual, se utiliza xilol o su sustituto como solución aclaradora.

2.2.7 MONTAJE: Proceso mediante el cual se deposita sobre el tejido ya coloreado una gota de Bálsamo de Canadá disuelto en xilol o entellán y se cubre con una laminilla cubreobjetos, dejándolo secar unas horas antes de su observación al microscopio.

III. INDICACIONES

NO APLICA

IV. CONTRAINDICACIONES

NO APLICA

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01

Página 7 de 19



INSNI INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SAN BORJA
Dra. GEOVANNA G. GUTIERREZ PARRAGUIRE
Medica Asistente del Servicio de Anatomía Patológica
C. 01 P. 36/293 H.N.E. 2200-4



V. REQUISITOS: CONSENTIMIENTO INFORMADO

NO APLICA

VI. RECURSOS MATERIALES A UTILIZAR

6.1 Equipos Biomédicos

- Microscopio óptico binocular
- Procesador automático de tejidos
- Sistema de inclusión en parafina, enfriamiento de bloques.
- Micrótomos de rotación tipo minott
- Baño de flotación
- Plancha térmica para sacado de laminas
- Criostato
- Equipo de computo
- Incubadora
- Refrigeradora
- Balanza digital

6.2 Material médico no Fungible

- Canastillas de acero porta láminas
- Cubetas de vidrio o acero inoxidable
- Cronometro
- Matraz de 1000ml, 500ml
- Probetas graduadas de 50ml, 100ml, 500ml, 1000ml
- Pipetas graduadas
- Varilla agitador de vidrio
- Pinzas de acero
- Mechero de alcohol
- Entre otros.

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01

Página 8 de 19

**6.3 Material médico Fungible**

- Hematoxilina de harris
- Oxido de mercurio amarillo
- Sulfato de amonio y aluminio
- Ácido clorhídrico
- Carbonato de litio
- Hidróxido de amonio
- Alcohol de 96°
- Alcohol absoluto
- Xilol
- Medio de montaje - entellan
- Guantes de látex
- Papel filtro
- Laminas portaobjeto
- Laminas cubreobjetos

6.4. Medicamentos

No aplica

VII. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**Pasos del procesamiento de tejido:**

En general, los pasos de las técnicas microscópicas para obtener un preparado histológico permanente (láminas) son:

- Obtención de la muestra
- Fijación.
- Deshidratación y aclaración
- Inclusión.
- Corte (Micrótopo).
- Coloración.

Fecha: Mayo 2016	Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01	Página 9 de 19
------------------	-----------------------------------	----------------





PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja

Guía de Procedimiento: Laboratorio de Histología del Servicio de Anatomía Patológica

- Montaje.

1.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:

De tres fuentes puede provenir el material humano: las necropsias, las biopsias y las piezas operatorias. De éstas, sólo la primera se puede observar tejido normal; las dos últimas generalmente proporcionarán tejidos patológicos.

- **Necropsias:** son las piezas que se obtienen de un cadáver. Para histología normal es necesario que se trate de un cadáver fresco y que no haya sido atacado por ninguna lesión, por lo menos el órgano que se quiere estudiar.
- **Biopsias:** son trozos de tejido que se obtienen de un sujeto con vida con el objeto de estudiarlos al microscopio y efectuar un diagnóstico histopatológico.
- **Piezas Operatorias:** los tejidos que han sido extraídos de las intervenciones quirúrgicas, generalmente tumores u órganos inflamados, también pueden darnos material de investigación pero, como en el caso anterior, sólo servirán para anatomía patológica.

1.2 FIJACIÓN:

Una vez obtenido el material que se desea estudiar por cualquiera de los procedimientos descriptos se procede a su fijación con lo que se evita la destrucción o lisis celular. Es un proceso físico - químico complejo por el cual se mantiene a las estructuras orgánicas en el estado más parecido al que poseían en vida.

Usar solución de formol al 10%, en una relación muestra/fijador 1/20 respectivamente

Fijadores compuestos o mezclas fijadoras (anexo 1)

- Líquido de Zenker
- Líquido de Bouin
- Líquido de Regaud
- Líquido de Da Fano

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01

Página 10 de 19

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SAN BORJA

Dra. GEOVANNA G. GUTIERREZ IPARRAGUIRE
Medicina General del Niño y Adolescente, Patología
C. 001 26/201 - San Borja, 22064





1.3 DESHIDRATACION Y ACLARAMIENTO:

Las piezas al ser retiradas del fijador, o después de haberlas lavado, están embebidas en agua; impidiendo que sean penetradas por la parafina. Por lo tanto, en primer lugar, debemos deshidratar los tejidos sumergiéndolos en líquidos anhidros, ávidos de agua. Para evitar alteraciones provocadas por una deshidratación brusca, se aconseja proceder escalonadamente utilizando, preferentemente, alcohol etílico de graduación creciente.

Las piezas perfectamente deshidratadas se sumergen en el disolvente, xilol, toluol, o sustituto del xilol, los cuales producen cierta transparencia a los tejidos y que además son solubles con la parafina. Al agregar, no debe aparecer ninguna turbidez. Si se pone blanco-lechoso es que la deshidratación no ha sido bien lograda y debemos repetir el baño de alcohol absoluto cerciorándonos que realmente lo sea: una gota de alcohol agregada a unos ml de xilol no debe enturbiarlo.

1.4 INCLUSIÓN EN PARAFINA:

La parafina se pone en estufa de cultivo o en un equipo dispensador de parafina a unos grados por encima de su punto de fusión. Se sumerge la muestra en moldes metálicos adecuados de acuerdo al tamaño de muestra incluir, se coloca la canastilla que servirá como soporte. Luego se enfría colocando el recipiente en hielo.

Preparación del taco: Se corta trozos de parafina (tallado) que no contiene la muestra en forma de pirámide truncada, de manera tal que la misma quede sobre la base menor, esto ayudara al proceso de corte en el micrótom.

Fecha: Mayo 2016	Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01	Página 11 de 19
------------------	-----------------------------------	-----------------





Guía de Procedimiento: Laboratorio de Histología del Servicio de Anatomía Patológica

RESUMEN DEL PROCESAMIENTO DEL TEJIDO O MUESTRA

Someter las piezas de tejido, ya colocados en sus casetes respectivos al procesador automático de tejidos, en la secuencia respectiva:

Solución:	Tiempo
1. Etanol al 50%	1 hora
2. Etanol al 70%	1 hora
3. Etanol al 70%	1 hora
4. Etanol al 80%	1 hora
5. Etanol al 90%	1 hora
6. Etanol absoluto	1 hora
7. Etanol absoluto	1 hora
8. Etanol absoluto	1 hora
9. Xilol 1 ó sustituto	1 hora
10. Xilol 2 ó sustituto	1 hora
11. Parafina (a 60°) 1	1 hora
12. Parafina (a 60°) 2	1 hora

Si las muestras están impregnadas en parafina, se vierten e incluyen en moldes adecuados (bloques). Estas se colocan en refrigeración, esto mejora la capacidad de cortado en el micrótomos.

1.5 CORTE (MICRÓTOMO)

Cortar secciones de parafina de 3 a 4 micrómetros de grosor. Cortar secciones en el criostato o en el micrótomos de congelación de 5 a 7 micrómetros de grosor.

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01

Página 12 de 19

**1.6 COLORACIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA (anexo 2)****PROCEDIMIENTO DE COLORACIÓN:**


1. Desparafinar los cortes en el xilol 1 ó sustituto durante 5 minutos.
2. Desparafinar los cortes en el xilol 2 ó sustituto durante 5 minutos.
3. Tratar los cortes en alcohol absoluto 1 durante 5 minutos.
4. Tratar los cortes en alcohol absoluto 2 durante 5 minutos.
5. Tratar los cortes en el alcohol corriente 1 durante 5 minutos.
6. Tratar los cortes en el alcohol corriente 2 durante 5 minutos.
7. Lavar en agua corriente durante 5 minutos.
8. Colorear con la hematoxilina de Harris durante 5 minutos.
9. Lavar en agua corriente durante 2 minutos.
10. Sumergir los cortes, rápidamente, 3 veces en el alcohol ácido al 1%.
12. Lavar inmediatamente con agua corriente.
13. Sumergir los cortes, rápidamente 3 veces en solución de agua amoniacal al 1%.
14. Lavar inmediatamente con agua corriente y verificar si los núcleos están bien teñidos observando al microscopio.
15. Colorear con la solución de trabajo de eosina, durante 4 minutos.
16. Lavar en agua corriente durante 2 minutos.
17. Tratar los cortes, rápidamente 5 veces en el alcohol corriente 1.
18. Tratar los cortes, rápidamente 5 veces en el alcohol corriente 2.
19. Tratar los cortes en el alcohol absoluto 1 durante 5 minutos.
20. Tratar los cortes en el alcohol absoluto 2 durante 5 minutos.
21. Tratar los cortes en el xilol 1 ó sustituto durante 5 minutos.
22. Tratar los cortes en el xilol 2 ó sustituto durante 5 minutos.
23. Montar en bálsamo de Canadá o entellán.
24. Etiquetar la lámina con su respectivo código de muestra.

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01

Página 13 de 19




 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
 SAN BORJA
 D^{RA} GEORGINA GUTIERREZ PARRAGUIRE
 Unidad de Servicio de Anatomía Patológica
 36293 10 de 11



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto de Gestión
de Servicios de Salud

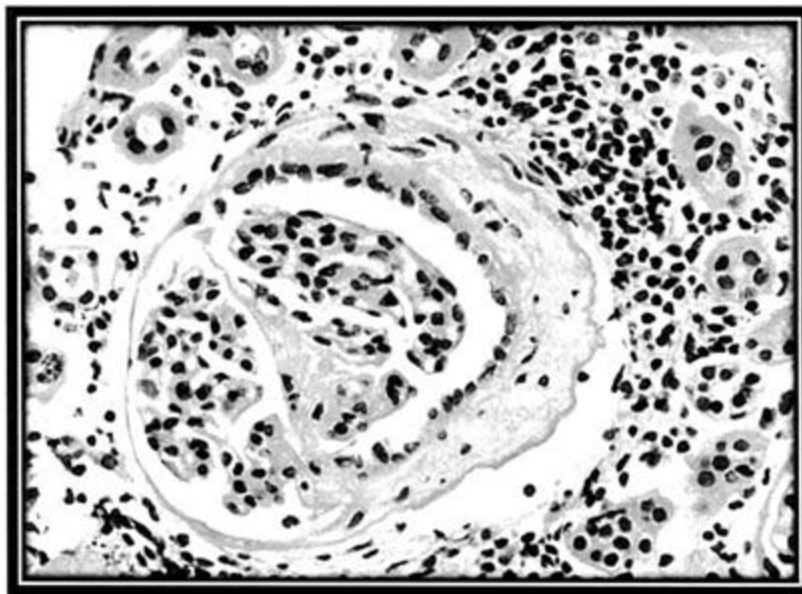
Instituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja



Guía de Procedimiento: Laboratorio de Histología del Servicio de Anatomía Patológica

1.7 MONTAJE: El montaje se realiza con entellán o bálsamo de Canadá

RESULTADOS: Las estructuras basófilas se observan de color azul y las estructuras eosinófilas de color rosado.



Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01

Página 14 de 19

INSN

SAN BORJA

Dra. GEOVANNA G. GUERRERIZ IPARRAGUIRA
Medicina Anatómica del Servicio de Anatomía Patológica
C. 014- 31 291 6441 2206-4





PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja

Guía de Procedimiento: Laboratorio de Histología del Servicio de Anatomía Patológica

VIII. LIMITACIONES Y VALIDEZ DE RESULTADOS**LIMITACIONES:**

- Solicitud de exámenes Anatómo Patológicos sin datos clínicos que son de mucha importancia, por ejemplo:
 - Edad del paciente.
 - Diagnóstico presuntivo.
 - Órgano o localización de la muestra.
 - Sexo del paciente.
 - información clínico-Patológica.
- Muestras en envases mal rotulados.
- Muestras sin el fijador que es el formol al 10% bufferado.
- Muestras grandes comprimidas en frascos de tamaño inferior a la muestra.
- Muestras en envases con bocas angostas.
- Muestras con la cantidad del fijador insuficiente o que no cubre la totalidad de la muestra.

VALIDEZ DE LOS RESULTADOS:

- La validez de los resultados va estar determinada por la calidad de la imagen visualizada en el microscopio óptico.

IX. COMPLICACIONES

- Mal funcionamiento del Procesador Automático de Tejidos, por ejemplo en corte del suministro de luz cuando el equipo este trabajando u otros.
- Cuchilla de mala calidad no permitirá obtener cortes adecuados.
- Inadecuado control del proceso de descalcificación conllevara a que la muestra pierda sus detalles celulares.

Fecha: Mayo 2016	Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01	Página 15 de 19
------------------	-----------------------------------	-----------------



INSN INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SAN BORJA

Dña. GEOVANNA G. GUTIERREZ IPARRAGUIRRE
Médica - Jefe del Servicio de Anatomía Patológica

36291 R.T.F. 220b-4



- Muestras mal fijadas, o que ingresan al servicio de Anatomía Patológica en cualquier otra solución que no sea formol al 10%, salvo en casos de estudios de biopsias por congelación.
- Reactivos vencidos o que pierden sus propiedades físico-químicos.
- Es importante que se cumpla con el tiempo de fijación de muestra, para obtener un adecuado procesamiento de la muestra; una inadecuada fijación puede ser perjudicial para el tejido obteniendo, cortes de mala calidad y como consecuencia imposibilitan el diagnóstico.

- Lic. T.M. Randall Andrei Carbajal Quispe rcarbajal@insnsb.gob.pe
- Mayo 2016 INSN-SB.
- Fecha de vigencia de la Guía de Procedimientos : 2 años.

- Mallory, F.B.: Pathological Technique, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1942, p 86.
- Elementos de histología normal y de técnica micrográfica, S.R. Cajal.
- Técnica histológica - universidad autónoma de México, César Eduardo Montalvo arenas, 2010.
- Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica - Ricardo Martínez Rodríguez, Raquel R. Gragera Martínez Editorial CSIC - CSIC Press, 1/1/2008 - 783 páginas
- Histología – Geneser 2º edición.
- Microscopía – Neoclear – MERK
- Manual de procedimientos de Anatomía Patológica, Dr. Nicolás Vicar Díaz, 2010



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja

Guía de Procedimiento: Laboratorio de Histología del Servicio de Anatomía Patológica

XII. ANEXOS:**ANEXO 1:****Fijador simple****Solución de formol al 10%**

Formol comercial al 37-40%	1 vol.
Agua corriente	9 vol.

Fijadores compuestos o mezclas fijadoras**Líquido de Zenker**

Dicloruro de mercurio	5.0 g
Dicromato de potasio	2.5 g
Agua corriente	100.0 mL
Ácido acético glacial	5.0 mL

Líquido de Bouin

Solución acuosa de ácido pícrico saturada	15 vol.
Formol comercial al 37-40%	5 vol.
Ácido acético glacial	1 vol.

Líquido de Regaud

Dicromato de potasio al 3%	80.0 mL
Formol comercial al 37-40%	20.0 mL

Líquido de Da Fano

Nitrato de cobalto	1,0 g
Agua destilada	100,0 mL
Formol comercial	15,0 mL

ANEXO 2

Fecha: Mayo 2016	Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01	Página 17 de 19
------------------	-----------------------------------	-----------------





PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja

Guía de Procedimiento: Laboratorio de Histología del Servicio de Anatomía Patológica

Solución colorante de hematoxilina de Harris o Hemalumbre de Harris

Hematoxilina (C.I. 75290)	5,0 g
Alcohol corriente 95%	50,0 mL
Sulfato doble de aluminio y potasio o sulfato doble de aluminio y amonio	100,0 g
Agua corriente	1000,0 mL
Oxido mercúrico rojo o amarillo	2,0 g

Disolver la hematoxilina en el alcohol, el alumbre (sulfato doble) en el agua con ayuda del calor. Mezclar las dos soluciones. Llevar la mezcla a ebullición tan rápido como sea posible, luego sacarla del calor y adicionar el óxido mercúrico. Recalentar la mezcla, hasta que tenga un color púrpura oscuro, cerca de 1 minuto. Luego retirar del calor y enfriar rápidamente. La solución está lista para ser usada.

Solución de alcohol ácido al 1%

Alcohol al 70% c.s.p.	100,0 mL
Ácido clorhídrico	1,0 mL

Solución de agua amoniaca al 3%

Agua corriente c.s.p	1000,0 mL
Amoniaco o hidróxido amónico	3,0 mL

Solución stock de eosina acuosa al 1%

Eosina amarilla (C.I. 45380)	10,0 g
Agua corriente	1000,0 mL
Disolver y adicionar:	
Ácido acético glacial	2,0 mL

Solución colorante de trabajo de eosina

Solución stock de eosina acuosa al 1%	1 vol.
Alcohol al 80%	3 vol.
Adicionar 0,5 mL de ácido acético glacial por cada 100,0 mL de solución colorante.	

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01

Página 18 de 19

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SAN BORJADra. GEOVANNA G. GUTIERREZ IPARRAGUIRA
Medico Asistente del Servicio de Anatomía Patológica
M. N. E. 2206-4



PERÚ
Ministerio
de Salud

Instituto de Gestión
de Servicios de Salud

Instituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja



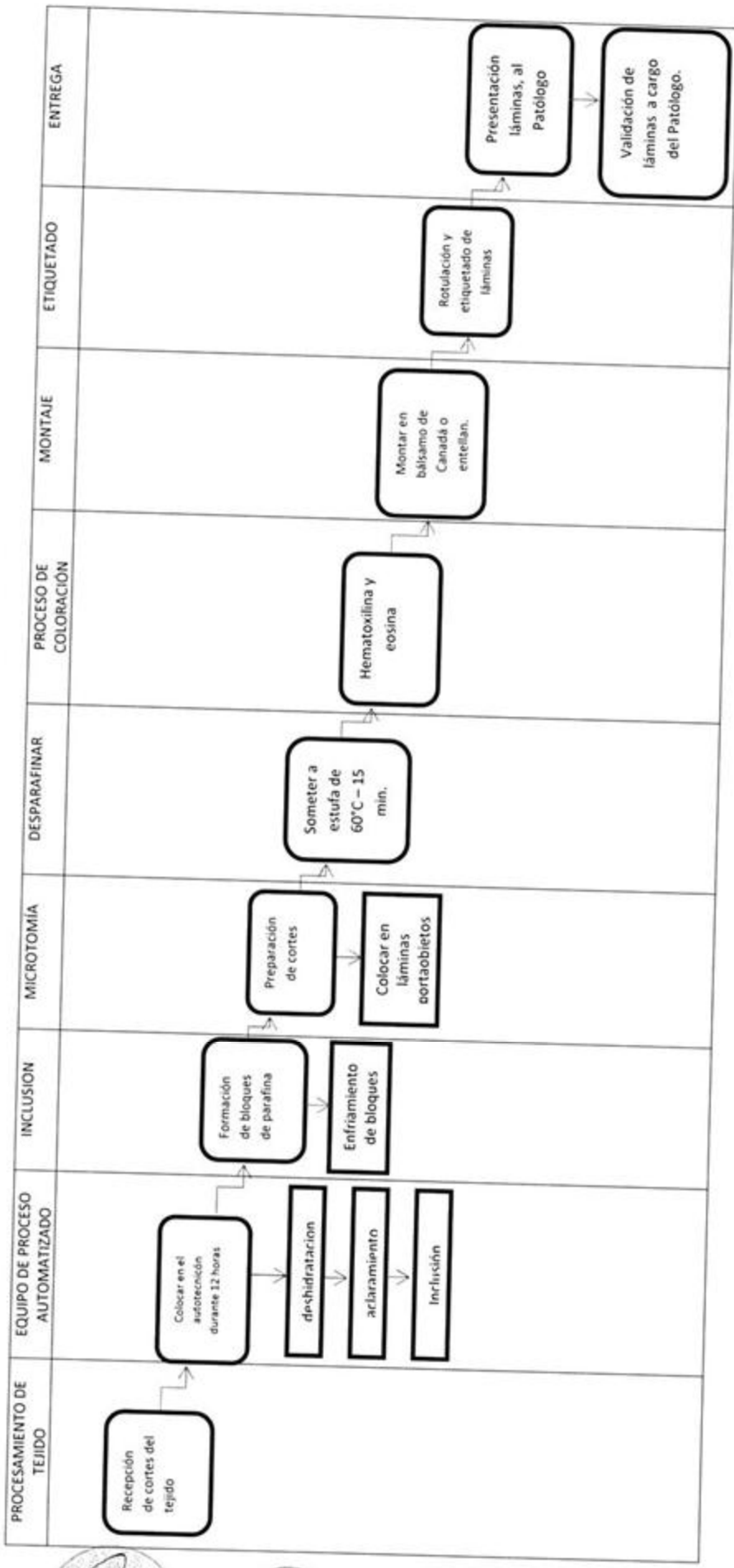
Guía de Procedimiento: Laboratorio de Histología del Servicio de Anatomía Patológica

ANEXO 3.- FLUJOGRAMA

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO-SAN BORJA

SUB-UNIDAD SOPORTE AL DIAGNOSTICO/ UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO/ SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA

FLUJOGRAMA DE LABORATORIO DE HISTOLOGÍA



Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 001/INSN-SB/ SAP-V.01

Página 19 de 19

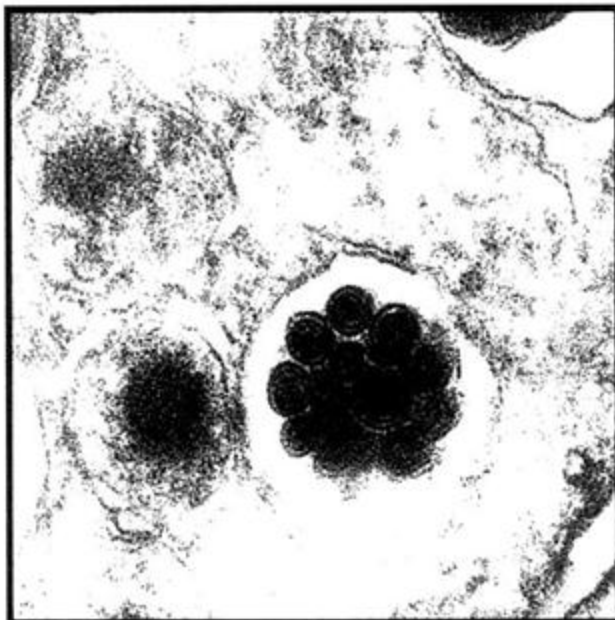


INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SAN BORJA
Dra. GIOVANNA G. COUTIERREZ IPARRAGUIRE



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO
SUB UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO
SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA



Elaborado por:

Equipo Técnico del Área de Microscopia Electrónica - Servicio de Anatomía Patológica.

Revisado por:

Directora Ejecutiva de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento.

Jefe del Departamento de la Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico

Responsable del Servicio de Anatomía Patológica

Jefe de la Oficina de la Unidad de Gestión de Calidad

Aprobado por:

Dra. Elizabeth Zulema Tomás Gonzáles

Directora de Instituto Especializado

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 1 de 18



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud del Niño
San Borja

Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica

Guía de Procedimiento: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA - DIAGNÓSTICA**Contenido**

I	NOMBRE Y CÓDIGO	3
II	DEFINICIÓN	3
III	INDICACIONES	4
IV	CONTRAINDICACIONES	4
V	REQUISITOS: CONSENTIMIENTO INFORMADO	4
VI	RECURSOS MATERIALES A UTILIZAR	5
VII	DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO	6
VIII	LIMITACIONES Y VALIDEZ DE LOS RESULTADOS	14
IX	COMPLICACIONES	14
X	AUTORES. FECHA Y LUGAR	14
XI	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
XII	ANEXOS	16

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 2 de 18

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SAN BORJADra. GEOVANNA G. GUTIERREZ IPARACU
ANALISTA DE SERVICIOS DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
C. N. P. DE SERVICIOS PATOLÓGICOS



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja

Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica

I. NOMBRE Y CÓDIGO

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

II. DEFINICIÓN

- Definición del procedimiento.

1. Microscopio electrónico: El Microscopio Electrónico de Transmisión es un instrumento que permite obtener una imagen aumentada de la muestra utilizando los electrones primarios que la atraviesan

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 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.

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. L Ultramicrotomía: Procedimiento de obtención de secciones ultrafinas apartir 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:

- Tallar (trimming) el bloque en forma de pirámide truncada.
- Obtener cortes gruesos (0,1-0,5 μ m aprox.) para confirmar la calidad de la inclusión y seleccionar la región donde se obtendrán los cortes finos.

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 3 de 18



insn **INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO**
SAN BORJA

Dra. GEOVANNA G. GUTIERREZ IPARRAGUIRRE
Médico Asistente del Servicio de Anatomía Patológica
C.M.P. 36291 R.N.E. 22094



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja**Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica**

- iii. - Obtener los cortes finos.
- iv. - Recoger los cortes en rejillas preparadas con membrana de soporte.

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 0.5 μ m y los cortes finos van entre los 120 a 150 nm.

- Aspectos epidemiológicos importantes.

No aplica

III. INDICACIONES

No aplica

IV. CONTRAINDICACIONES

No aplica

V. REQUISITOS: CONSENTIMIENTO INFORMADO

No aplica

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 4 de 18





PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja

Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica

VI. RECURSOS MATERIALES A UTILIZAR**6.1 Equipos Biomédicos**

- Ultramicrotomo digital automático marca Leica EM UC7
- Microscopio óptico marca Olympus
- Platina Caliente marca Zybron-Termolyne
- Máquina para fabricar cuchillas de vidrio marca LKB
- Sonicator
- Balanza Analítica
- Máquina para limpiar cuchillas de diamante marca Ted Pella Inc
- Timer
- Estufa Shel Lab con bomba de vacío adicionada.

6.2 Material médico no Fungible

- Planillas inclusión.
- Pinzas M.E.
- Pinzas tinción
- Lápices permanentes
- Frascos de penicilinas
- Propipetas
- Cápsulas Petrie con divisiones (papel filtro)
- Huincha adhesiva
- Recipientes para pesar reactivos
- Tijeras
- Embudo de plástico y vidrio
- Pipetas de transferencia
- Probeta de 50 ml
- Probeta de 10 ml
- Vaso precipitado de vidrio de 50 ml
- Matraz erlenmeyer vidrio pirex 4 lt.
- Dispensador agua destilada
- Mechero de alcohol

6.3 Material médico Fungible

- Guillettes
- Vasos graduados desechables
- Cuchillas con lomo
- Barras de vidrio
- Dust off
- Papel filtro
- Papel aluminio

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 5 de 18



INSNI INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SAN BORJA

Dra. GEOVANNIA C. GUTIERREZ IPARRAGUIRRE
Médica Asistente del Servicio de Anatomía Patológica
N.º 36291 R.N.E. 22004



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto de Gestión
de Servicios de Salud

Instituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja



Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Parafilm
- Grillas de cobre.
- Papel tisue
- Detergente liquido
- Fósforos
- Mascarillas

6.4. Medicamentos

No aplica

VII. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

RECEPCION DE LA MUESTRA

La muestra cuando el transporte es menor a media hora debe estar contenida en un medio de mantenimiento como solución salina en un frasco debidamente rotulado. En la recepción del servicio de Anatomía Patológica se verificara los datos del paciente con la orden y se le asigna un código PQ, luego se enviara al área de Microscopia electrónica para el proceso su registro y fijación. En caso la muestra no pueda ser envia al servicio de Anatomía patológica en el tiempo establecido se debe coordinar previamente con este para el recojo del frasco con el medio de fijación adecuado.

FIJACIÓN

Las muestras recibidas se fijan en glutaraldehido, el cual está compuesto de glutaraldehido diluido al 2% con buffer sódico. El fijador con las muestras está contenido en frascos de penicilina limpios, los cuales se encuentran debidamente rotulados con el nombre completo del paciente y código PQ y ME que el servicio le provee.

Las muestras tienen una fijación mínima de 24 horas a 4°C antes de iniciar la tinción en bloque. Las muestras una vez fijadas deben ser registradas en la bitácora de Microscopia electrónica y asignarles un código de identificación ME.

TINCION EN BLOQUE

Una vez fijadas las muestras, son lavadas en buffer veronal por 15 minutos, luego se realiza una post-fijación y tinción en bloque con Tetróxido de Osmio al 1% por 1hrs 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). Le sigue un lavado en agua destilada de 15 minutos y después una solución de acetato de uranilo acuoso por 1 hora a 4°C.

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 6 de 18





Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica

DESHIDRATACIÓN E IMPREGNACIÓN

La deshidratación del tejido es producida por acetona en orden ascendente desde 20% ; 35% ; 50% ; 70% ; 85% y 95% en estaciones de 10 minutos cada una, luego se tratan con acetona 100% Merck & p.a. en 3 cambios de 15 minutos cada uno. Finalmente, las muestras se dejan impregnando toda la noche en una mezcla de EPON-Acetona en proporción 1:1.

Al día siguiente, las muestras son inscritas en el libro de registro de forma correlativa según número de biopsia, incluyendo un registro digitalizado paralelo en el ordenador.

El libro de registro consta de: número de biopsia, nombre del paciente, tejido, número de inclusiones y zona de corte.

Los números de biopsia son impresos del 1 al 8 (xxxx-1.....), en el caso de las muestras recuperadas los números de inclusiones comenzarán a partir del 9 hasta el 16 (xxxx-9...)

INCLUSIÓN EN EPON

Se utilizan moldes (plantillas) de inclusión de silicona pelco &. Se procede a depositar el papel con el número de biopsia y de inclusión respectiva en el fondo del molde. 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, teniendo la extrema preocupación de eliminar todas las burbujas que se forman en el fondo de la inclusión. Posteriormente, se introduce el tejido en el borde de extremo correspondiente, sumergiéndolo. (las muestras bajan por gravedad en aproximadamente 1hr.)

Una vez que todas las muestras sometidas a proceso de inclusión hayan alcanzado la posición y orientación deseada dentro de la inclusión, se procede a rotular cada muestra en el molde con el código ME.

Los moldes conteniendo las muestras son llevadas a la estufa a 37°C durante 1hrs para la polimerización. Luego en una estufa a 80°C por 2 horas. Y finalmente, en la misma estufa de 80°C que tiene adicionada una boba de vacío el cual se aplica a 200Mb de vacío y se deja las muestras polimerizar durante 2 días.

La mezcla de epon restante es guardada en jeringas especiales (desechables) envueltas en papel de aluminio a -20°C.

CORTE SEMIFINO Y FINO

Antes de comenzar esta etapa de corte, el tecnólogo médico debe retirar las inclusiones desde la estufa con vacío, proceder a organizar los casos que se cortarán de inmediato y los restantes, archivarlos en cajas con divisiones fabricadas especialmente para dicho fin. La identificación de cada biopsia (número y órgano) con sus respectivas inclusiones se realiza en la cara visible de la caja.

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 7 de 18





PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja

Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica

CORTE SEMIFINO

Para hacer los cortes semifinos de microscopia electrónica, se monta la inclusión de resina en un portainclusión sobre el soporte del ultramicrotomo. Los bloques son tallados eliminando el exceso de resina. El espécimen es montado en el ultramicrotomo y con un cuchillo de cristal "ultramicrotome glass strips ted pella inc" fabricada en la máquina para hacer navajas cuchillos (700, LKB), se realizan los cortes semifinos de 1 a 1,4 μ , son colocados sobre un porta objeto en una gota de agua los cuales son secados en una platina caliente y teñidos con azul de toluidina. La lámina debe ser rotulada con el código PQ y ME.

Se observa el corte semifino en el microscopio óptico con el médico Anatomopatólogo para ubicar la zona útil 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.

Una vez ubicada la zona deseada se procede al corte fino.

CORTE FINO.

Se talla una pirámide truncada en el extremo de la inclusión para que quede solo el área seleccionada en el corte semifino, este proceso se repite hasta disponer del total de inclusiones que serán cortadas en el ultramicrotomo con cuchilla e diamante para corte ultrafino.

Este se realiza en forma automática en el ultramicrotomo, con cuchillo de diamante (edge length 4mm, inc 4° and setting 4°) los cortes son de un espesor de 400Å a 600 Å (color plateado hasta amarillo rojo) se recolectan por flotación en el baño que trae integrado el cuchillo de diamante, el cual es llenado con agua bidestilada hasta formar un espejo de plata en la superficie. Los cortes son recolectados en número variable según tamaño de la mesa tallada en cada muestra, con un promedio de 20 a 30 cortes. Estos se montan sobre una grilla de cobre flameada para reducir la estática de 300 mesh (se montan dos grillas para cada caso. Las que son depositadas en placas de Petri de plástico con 4 compartimientos sobre papel filtro, con el debido rotulo de numero de biopsia. Las grillas deben ser manipuladas cuidadosamente con una pinza self-closing.

TINCIÓN DE GRILLAS

La tinción de grillas debe realizarse en un ambiente limpio, el tecnólogo médico debe usar mascarilla como medida de protección. La tinción consiste en agregar sales de metales pesados sobre el tejido, para lavar se utiliza agua bidestilada hervida y tibia. Las grillas son manipuladas con pinzas self-closing.

Las grillas son sumergidas en solución de acetato de uranilo al 4% en metanol, por 90 segundos el cual es filtrado al momento de usar.

Lavado en una solución de metanol acetona 1:1, seguido de un lavado en agua bidestilada al chorro, afirmando la grilla con la pinzas self-closing, las grillas son dejadas en la capsula de Petri nuevamente.

Las grillas son teñidas con solución de Reynolds, para lo cual se ubican granallas de hidróxido de sodio en uno de los compartimientos de una capsula de Petri con 4 divisiones, para mantener el ambiente de tinción libre de humedad. En el resto de los compartimientos se

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 8 de 18

INSN INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SAN BORJA

Dra. JOVANNY G. GUTIERREZ IPARRA
Médica Asistente del Servicio de Anatomía
C.N.E. 16291 R.N.E. 29710





PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja**Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica**

ponen trozos cortados de papel parafilm sobre los que van dos gotas de la solución de tinción con una pipeta pasteur de vidrio (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 suspendidas en las gotas de la solución de tinción con la cara que están los cortes mirando la gota de tinción y se dejan teñir por 10 minutos. Luego se procede a lavado con agua bidestilada al chorro e inmersiones en metanol puro (2 ó 3 cambios) para arrastrar posibles precipitados que puedan tener las grillas.

Después del proceso de tinción, las grillas se almacenan y/o transportan en portagrillas plásticos. Se realiza un listado final de los casos procesados y se entregan al patólogo respectivo encargado de su examen en el microscopio electrónico.

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 tiñe membranas, glicógeno, ribosomas y varios componentes tisulares. Además de intensificar la tinción de uranilo.

LECTURA Y DIAGNÓSTICO

Una vez realizada la tinción de grillas son entregadas al Anatomopatólogo para su lectura en el Microscopio Electrónico de transmisión (MET) y posterior diagnóstico. (Anexo 3).

ENTREGA DE RESULTADOS

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

ALMACENAMIENTO

Los tacos de resina son almacenadas en el área de procesamiento de microscopia 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 un sobre rotuladas con código ME y PQ y entregadas al responsable de almacén.

9. TECNICAS ESPECIALES**9.1 Recuperación de muestras incluidas en parafina para llevarlas a microscopía electrónica.****Objetivo**

Recuperación de muestras biológicas desde el taco de parafina para su utilización en microscopia electrónica.

Principio

Fecha: Mayo 2016	Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01	Página 9 de 18
------------------	-----------------------------------	----------------



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SAN BORJA
D^{CA} GEOVANNA G. GUTIERREZ IPARRAGUIRRE
Medico Asistente del Servicio de Anatomía Patológica
C.M.P. 36291 N.N.E. 22064



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja**Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica**

Tratar de utilizar el material que se tiene incluido en parafina, evitando tomar una nueva muestra al paciente y minimizando el tiempo de estudio.

Campo de aplicación.

Este protocolo se aplica cuando la muestra original que llega para ME. no es útil o es insuficiente.

Metodología.

Al tejido incluido se le extrae la parafina con varios cambio de histoclear, luego alcohol absoluto tres cambio, y se empieza a hidratar el tejido en forma paulatina y en alcoholes en forma decreciente (96° - 70° - 50° y 30°) hasta llevarlos al agua.

Se comienza el protocolo de ME desde el lavado inicial con buffer veronal seguido del Tetróxido de osmio en adelante hasta incluirlo en Epon 812.(no es necesario fijar nuevamente ya que el tejido fue fijado en formalina)

Aunque evidentemente estas muestras ni presentan una fijación ideal, sirven para algunos diagnósticos, evitando tomarles otra muestra a los pacientes.

9.2 Recuperación de la muestra de Inmuno fluorescencia congelada y procesada para Microscopia Electrónica.**Objetivo**

Recuperación de las muestras histológicas desde la inmuno fluorescencia, congeladas, llevadas a ME.

Principio

Tratar de utilizar el material que se tiene congelado para IF, evitando tomar una nueva muestra al paciente y minimizando el tiempo de estudio.

Campo de aplicación.

Este protocolo se aplica cuando la muestra original que llega para ME no es útil o es insuficiente.

Metodología.

La muestra es descongelada rápidamente y es puesta a fijar en glutaraldehído al 2,5% en buffer veronal acetato y se sigue el protocolo de ME.

9.3 Procesamiento de cilios para microscopia electrónica.**Objetivo**

Procesamiento de biopsias de cilios para su observación y análisis en el microscopio electrónico de transmisión.

Principio

Proporcionar una óptima conservación de la ultraestructura de las biopsias de cilios brindándoles a través de la inclusión en resina epoxica la consistencia y resistencia necesaria para su posterior observación en MET.

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 10 de 18





PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja**Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica****Campo de aplicación.**

Estudio de la ultraestructura de muestras biológicas por medio de tinciones electrodensas de artefactos consensuados preservados por procesos de fijación y post fijación.

Metodología.

Las biopsias para el estudio de cilios por microscopia electrónica deben venir previamente fijadas en la mezcla de glutaraldehído y buffer veronal.

Estas pueden llegar: en trozos, cepillos o en suspensión, en caso de esta última presentación son centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos y su pellet es procesado según protocolo inicial.

9.4 Procesamiento de suspensiones de bacterias y/o virus para microscopia electrónica.**Objetivo**

Procesamiento suspensiones de virus o bacterias para su observación y análisis en el microscopio electrónico de transmisión.

Principio

Proporcionar una óptima conservación de la ultraestructura de los microorganismos brindándoles a través de la inclusión en resina epóxica la consistencia y resistencia necesaria para su posterior observación en MET.

Campo de aplicación.

Estudio de la ultraestructura de microorganismos como bacterias y virus por medio de tinciones electrodensas de artefactos consensuados preservados por procesos de fijación y post fijación.

Metodología.**Envío de la muestra**

Las bacterias y/o virus obtenidas de cultivo para el estudio por microscopia electrónica deben ser suspendidas en fijador glutaraldehído al 2.5% (glutaraldehído + buffer veronal) con el fin de obtener al centrifugar un pellet aproximado de 0.5mm para una buena obtención de muestra. Esta suspensión será remitida al Laboratorio de Anatomía Patológica en INSNSB para su procesamiento. Las muestras con el fijador pueden ser almacenadas a temperatura ambiente o a 4°C hasta su envío.

Procesamiento en el laboratorio de Microscopia electrónica.

Se procederá a una microcentrifugación para la obtención del pellet el cual será sometido a dos lavados con buffer veronal, luego se realiza una post-fijación y tinción en bloque con Tetroxido

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 11 de 18

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SAN BORJA

Dra. GEOVANA G. GUTIERREZ IPARRAGUIRE
Médica Asistente del Servicio de Análisis Patológico



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto de Gestión
de Servicios de Salud

Instituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja



Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica

de Osmio al 1% por 1hrs a 4°C. Le sigue un lavado en agua destilada y después una solución de acetato de uranilo acuoso por 1 hrs. A 4°C.

La deshidratación del tejido es producida por acetona en orden ascendente. Finalmente, las muestras se dejan impregnando toda la noche en una mezcla de EPON-Acetona.

Se centrifugara nuevamente y el pellet obtenido será incluido en resina EPON por un tiempo de 24 a 48 horas para la formación del bloque.

Luego de obtenido el bloque de resina se procederá a realizar los cortes semifinos para su observación en el microscopio óptico y selección del área de interés y finos para ser observados en el microscopio electrónico usando de soporte una grilla que será sometida a un proceso de tinción y contraste.

CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

Es necesaria la preparación de los siguientes reactivos para llevar a cabo el procedimiento:

4.2.1 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 sodico.

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 7 50cc

Hcl 0.1N 55cc y agua bidestilada 35cc

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

Solución Fijadora de Microscopia Electrónica

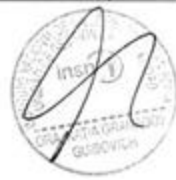
En Momento de usar mezclar 0.75 ml de Glutaraldehido al 8% con 2 ml de Búfer veronal sódico a pH 7.25

- **Conservar a 4°C.**

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 12 de 18





PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja

Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica

4.2.2 Tetroxido de Osmio al 2%

- Ampollas de OSO_4 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 sonicator 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.

4.2.3 Solución de Acetato uranilo al 2% acuoso

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

4.2.4 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.

4.2.5 Solución de Acetato de Uranilo al 4% en Metanol

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

4.2.6 Solución Reynolds para tinción de ME.

- Agua Bidestilada hervida y fria
- Citrato de Na. 1 M.
- Nitrato de Plomo 1 M.
- Hidróxido de Sodio 1 N.
- Para preparar la solución a 16 ml de agua bidestilada hervida y fria se le agrega lentamente 3 ml de citrato de sodio, 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 limpia.
- Esta solución se debe preparar en un tubo muy limpio, El pH de ella debe de ser 12 o más.
- Finalmente sobre la solución se agrega vaselina líquida para sellarla si es necesario se centrifuga antes de usar.

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 13 de 18



INSNI INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SAN BORJA

Dra. GEOVANNA G. GUTIERREZ IPARRAGUIRE
Medicina Asistente del Servicio de Anatomía Patológica
C.M.P. 36291 R.N.E. 22064



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja

Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica

VIII. LIMITACIONES Y VALIDEZ DE LOS RESULTADOS

LIMITACIONES:

- La complejidad de los equipos, lo hacen susceptibles a la descalibración. Encontrar nuevamente las condiciones óptimas requiere de un proceso tedioso y prolongado.
- La manipulación de reactivos se torna peligroso por la elevada condición tóxica de los mismos.
- Las imágenes obtenidas son monocromáticas y planas siendo necesario, en algunos casos, un tratamiento posterior mediante análisis de imágenes con un software especializado.

VALIDEZ DE LOS RESULTADOS:

- La validez de los resultados va estar determinada por la calidad de la imagen obtenida en el microscopio electrónico.

IX. COMPLICACIONES

Es importante que se cumpla con el tiempo de mantenimiento de la muestra y fijación para obtener un adecuado procesamiento de la muestra, una inadecuada fijación puede ser perjudicial para el tejido obteniendo cortes de mala calidad y como consecuencia imposibilitando el diagnóstico.

X. AUTORES. FECHA Y LUGAR

Lic. Vanessa Karina Hernández Olivera vhernandez@insnsb.gob.pe

Lic. Eduardo Álvarez Rivera ealvarez@insnsb.gob.pe

Lima, Marzo 2016 INSN-SB.

Fecha de vigencia del protocolo: 2 años.

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 14 de 18

insn **INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO**
SAN BORJA

[Firma]

Dra. JOVANNAGUTIERREZ (PARRA) C. RAB
Médica Asistente del Servicio de Anatomía Patológica
C.M.P. 36291 R.N.E. 22604





XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hayat M.A. principles and technique of electron microscopy, biological applications. Tercera edicion, 489 pp, 1989.
- Papadimitriou J.M. diagnostic ultrastructure of non-neoplastic diseases. Churchill-livingtons, 1992
- Caribay Urbina, Pedro Rodríguez. Introducción a la Microscopia electrónica. Guía teórico práctico. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Octubre 1997

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 15 de 18

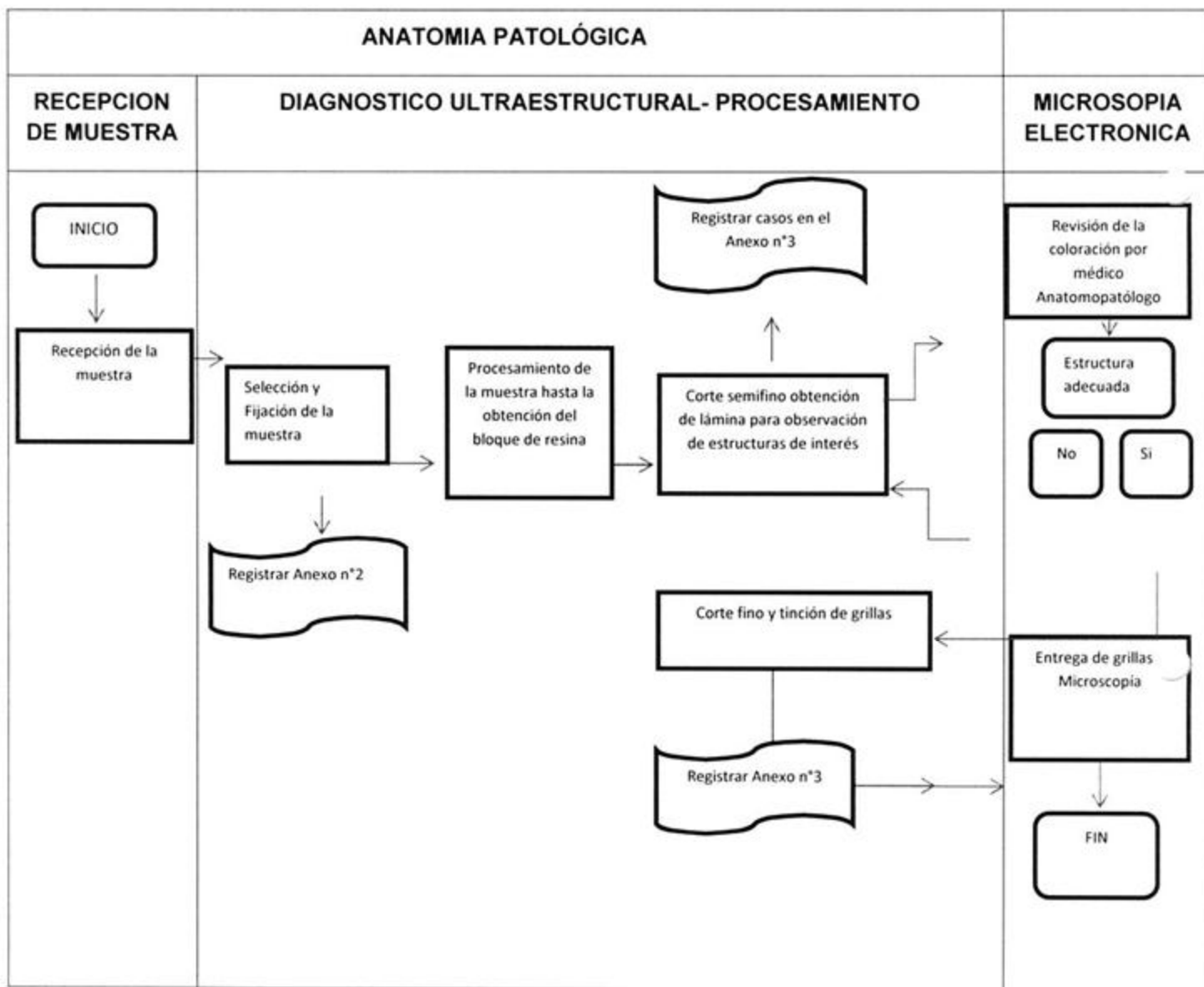




PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto de Gestión
de Servicios de SaludInstituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja

Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica

XII. ANEXOS**ANEXO N° 1: FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO**

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 16 de 18

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
SALUD NIÑA

Dra. GEOVANY GUERRA GARCIA

Médico Asistente del Servicio de Anatomía Patológica

C.N.P. 36293



Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica

ANEXO N°2: FORMATO BITACORA DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

[illegible]

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 17 de 18



Guía de Procedimiento: Microscopia Electrónica del Servicio de Anatomía Patológica

ANEXO N°3: FORMATO DE ENTREGA DE GRILLAS A MICROSCOPIA

[illegible]

Fecha: Mayo 2016

Código: GP- 002/INSN- SB/SAP-V.01

Página 18 de 18