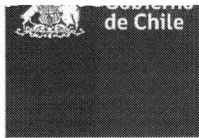
 <p>Gobierno de Chile</p> <p>SERVICIO SALUD AYSÉN HOSPITAL REGIONAL COYHAIQUE</p>	<p>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS</p> <p>UNIDAD DE ANATOMÍA PATOLÓGICA</p> <p>DEPENDIENTE: SUB DPTO. APOYO DIAGNÓSTICO Y TERAPEUTICO</p>	Código:
		Edición: 02
		Fecha Inicio vigencia: 25/01/2021
		Páginas: 1 - 9
		Vigencia: 5 años

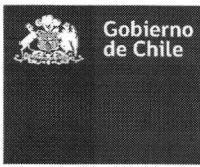
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

ELABORACION	VISACION	APROBACION
Viviana Sáenz Victoria Carrasco	Paulina Arriagada Sandra Gálvez	Jorge Pinilla
TM. Anatomía Patológica TM. Anatomía Patológica Responsables Calidad		
 Firma y timbre	 Firma y timbre	 Firma y timbre
25/01/2021	25/01/2021	25/01/2021



1. ÍNDICE:

TÍTULO	Nº de pág
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	3
RESPONSABLES	3
ALCANCE	3
EXCEPCIONES	3
TERMINOLOGÍA	4
DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES DEL PROCESO	4
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9



2. INTRODUCCIÓN

La Inmunohistoquímica es una técnica del laboratorio histopatológico que se basa en el principio de la reacción antígeno-anticuerpo, la cual es muy específica.

El mercado dispone de una amplia gama de anticuerpos que permiten detectar partes de las células u otras partículas de ellas (antígenos) y con ello mejorar el diagnóstico realizado con las técnicas corrientes. El proceso consiste en poner un corte histológico del tejido en estudio en incubación con un anticuerpo que reconoce al antígeno y se fija a él. Luego revelamos la reacción con una sustancia llamada cromógeno, que le da un color específico al tejido y podemos reconocerla al microscopio.

3. OBJETIVOS:

- Asegurar la correcta realización de la técnica inmunohistoquímica en la biopsia diferida y complementar el diagnóstico histológico del Médico Anatomopatólogo.
- Estandarizar los procedimientos de Inmunohistoquímicas.

4. RESPONSABLES

RESPONSABLE	FUNCION
Jefe Anatomía Patológica	<ul style="list-style-type: none">• Velar por el cumplimiento del protocolo.
Anatomopatólogos	<ul style="list-style-type: none">• Indicar técnica inmunohistoquímica a realizar.• Interpretación de resultados y elaboración de informe.
Tecnólogos Médicos	<ul style="list-style-type: none">• Cumplir y aplicar protocolo.• Realización de técnicas Inmunohistoquímicas.
Tecnólogos Médicos encargados de Calidad	<ul style="list-style-type: none">• Velar por el cumplimiento del protocolo.• Cumplir y aplicar protocolo.• Realización de técnicas Inmunohistoquímicas.

5. ALCANCE

- Este protocolo debe aplicarse para la ejecución de las técnicas inmunohistoquímicas.

6. EXCEPCIONES: N/A



7. TERMINOLOGÍA

Anticuerpo: Son glucoproteínas del tipo gamma globulina. Pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados.

Antígeno: Sustancia que al introducirse en el organismo induce en este una respuesta inmunitaria, provocando la formación de anticuerpos.

Epítopo: O determinante antigénico es la porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente la secuencia a la que se unen los anticuerpos, que son los receptores de las células B o de las células T en estado soluble.

Cromógeno: Sustancia que le da un color específico al tejido y podemos reconocerla al microscopio.

Lámina de corte: Portaobjetos en el cual ha sido extendido un corte histológico incluido en parafina.

Técnica de inmunohistoquímica: Consiste en la identificación de una variedad de antígenos presentes en células o tejidos por medio de un anticuerpo específico mono o policlonal. Posteriormente la reacción antígeno-anticuerpo puede ser visualizada mediante diversos marcadores unidos a anticuerpos.

8. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES DEL PROCESO

- Los patólogos, luego de revisar un caso específico, pueden requerir la realización de técnicas inmunohistoquímicas para efectuar un diagnóstico certero de la patología de un paciente.
- La solicitud de IHQ (Inmunohistoquímica) ocurre una vez que la biopsia diferida está en proceso de informe. El patólogo debe ingresar su solicitud en la pestaña Solicitud Complementaria correspondiente al caso, en el sistema informático de la Unidad AP y agregar los anticuerpos necesarios.
- Los Tecnólogos Médicos revisan diariamente el ítem de ESPECIALES/LÁMINAS en el sistema informático y realizan todas las técnicas inmunohistoquímicas solicitadas.
- Cuando la técnica se encuentra terminada, el TM ingresará al sistema informático para dar check list a la solicitud y entregará la lámina al patólogo responsable.

8.1. CONTROL DE CALIDAD:

- Cada lámina de IHQ deberá ir acompañada de un control positivo externo, responsabilidad del TM de turno de IHQ.
- El TM que realiza la IHQ revisará al microscopio cada control positivo, para validar la correcta ejecución de la técnica.

8.2. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS: Todas las preparaciones son entregadas al patólogo para su interpretación y elaboración del informe final.

8.3. PROCEDIMIENTO DE INMUNOHISTOQUÍMICA:

8.3.1. Protocolo automatizado de IHQ realizado en equipo LEICA BOND-MAX.

- TODOS LOS ANTICUERPOS QUE SE UTILIZAN EN EL LABORATORIO SON LISTOS PARA USAR (RTU= READY TO USE):

OCT-4	CDX2	MAMAGLOBINA	PAN CK
34BE12	CEA	MART-1/MELAN-A	PAX-8
ACTIN MUSCLE SPECIFIC	CROMOGRANINA	MELANOMA	PLAP
CA 19.9	CYTOKERATIN 20	MLH1	PMS2
CALRETININA	CYTOKERATIN 7	MSH2	PSA
CD 56	CYTOMEGALOVIRUS	MSH6	R. ESTRÓGENO
CD10	E-CADHERINA	NAPSIN A	R. PROGESTERONA
CD117	EMA	NKX3.1	S100
CD138	FACTOR XIIIa	P16	SYNAPTOPHYSIN
CD34	GATA 3	P40	TTF-1
CD45	HER-2 NEU	P504S	WT1
CD68	KI-67	P63	

Fijador: Formalina al 10% Tamponada.

Cortes: En parafina, de 2-4 μ m, secar láminas en Equipo automatizado de tinción LEICA Histocore Spectra ST con protocolo de secado IHQ.

Control de Calidad: Se utilizan controles de calidad positivos que corresponden a tejidos que expresan el antígeno específico.



8.3.2. Reactivos utilizados para todos los protocolos de IHQ en equipo automatizado:

- **SOLUCION BOND 1 EPITOPE RETRIEVAL:** Recuperador de epítopo con base de citrato y pH 6.0 (Listo para usar).
- **SOLUCION BOND 2 EPITOPE RETRIEVAL:** Recuperador de epítopo con base EDTA y pH 9.0 (Listo para usar).
- **SOLUCION BOND WASH (10X): Solución tampón concentrada, Buffer de lavado. Para preparar un litro se agrega 100 ml de solución Bond Wash a 900 ml de agua destilada.**
- **SOLUCION BOND DEWAX: Solución de desparafinado (Listo para usar).**
- **ALCOHOL ABSOLUTO.**
- **AGUA DESTILADA.**
- **SISTEMA DE DETECCIÓN:**
 - **(BOND POLYMER REFINE DETECTION):** Contiene un Bloqueador de peroxidasa, reactivo de polímero post primario, polímero, cromógeno DAB y tinción de contraste con hematoxilina (Listo para usar).
 - **(BOND POLYMER REFINE RED DETECTION):** Contiene un Bloqueador de peroxidasa, reactivo de polímero post primario, polímero, cromógeno AEC y tinción de contraste con hematoxilina (Listo para usar).

8.3.3. Protocolos automatizados:

a) Pasos previos (comunes para todos los protocolos):

Paso n°1: Seleccionar en la pantalla el icono BOND para ingresar al software.

Paso n°2: Añadir ID de caso, Nombre del paciente y Patólogo solicitante de la IHQ

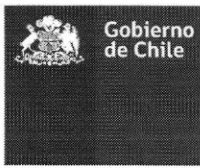
Paso n°3: Añadir a los casos los Anticuerpos y protocolos correspondientes e imprimir las etiquetas de cada caso.

Paso n°4: Colocar covertiles sobre los portaobjetos y ordenarlos por protocolo en las bandejas.

Paso n°5: Revisar los niveles de reactivos para recuperación antigénica, buffer de lavado, solución de desparafinado, alcohol absoluto y agua destilada.

Paso n°6: Revisar que los contenedores de desechos estén vacíos.

Paso n°7: Iniciar el protocolo de cada bandeja o seleccionar fecha y hora para comenzar el proceso al día siguiente (inicio aplazado).



**SERVICIO SALUD AISEN
HOSPITAL REGIONAL
COYHAIQUE**

b) Protocolo F (Propio de Leica Microsystems):

1. Recuperación Antigénica: Se utiliza el reactivo necesario dependiendo de los requerimientos de cada anticuerpo.
2. Bloqueo de peroxidasa por 5 minutos.
3. 3 Lavados con solución Bond Wash.
4. Incubación con Anticuerpo primarios (MARKER) por 15 minutos.
5. 3 Lavados con solución Bond Wash.
6. Incubación con reactivo de polímero post primario por 8 minutos.
7. 3 Lavados con solución Bond Wash por 2 minutos cada uno.
8. Incubación con polímero por 8 minutos.
9. 2 Lavados con solución Bond Wash por 2 minutos cada uno.
10. Lavado con agua destilada.
11. Revelar con cromógeno DAB por 10 minutos.
12. 3 Lavados con agua destilada.
13. Contraste nuclear con hematoxilina por 5 minutos.
14. Lavado con agua destilada.
15. Lavado con solución Bond Wash.
16. Lavado con agua destilada.
17. Sacar las bandejas con portaobjetos y traspasarlas a un rack para deshidratar en Equipo automatizado de tinción LEICA Histocore Spectra ST con protocolo deshidratar IHQ/HQ
18. Cubrir con Montador automático Leica Histocore SPECTRA CV.

c) Protocolo Cell Marque (Creado en APA HRC):

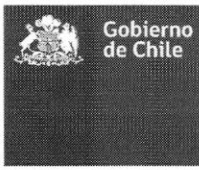
1. Recuperación Antigénica: Se utiliza el reactivo necesario dependiendo de los requerimientos de cada anticuerpo.
2. Bloqueo de peroxidasa por 5 minutos.
3. 3 Lavados con solución Bond Wash de 1 minuto cada uno.
4. Incubación con Anticuerpo primarios (MARKER) por 30 minutos.
5. 3 Lavados con solución Bond Wash de 1 minuto cada uno.



6. Incubación con reactivo de polímero post primario por 8 minutos.
7. 3 Lavados con solución Bond Wash por 2 minutos cada uno.
8. Incubación con polímero por 8 minutos.
9. 2 Lavados con solución Bond Wash por 2 minutos cada uno.
10. Lavado con agua destilada.
11. Revelar con cromógeno DAB por 10 minutos.
12. 3 Lavados con agua destilada.
13. Contraste nuclear con hematoxilina por 5 minutos.
14. Lavado con agua destilada.
15. Lavado con solución Bond Wash.
16. Lavado con agua destilada.
17. Sacar las bandejas con portaobjetos y traspasarlas a un rack para deshidratar en Equipo automatizado de tinción Leica Histocore Spectra ST con deshidratar IHQ/HQ.
18. Limpiar portaobjetos y cubrir con Montador automático Leica Histocore SPECTRA CV.

d) Protocolo J (para ser usado con cromógeno rojo):

1. Recuperación Antigénica: Se utiliza el reactivo necesario dependiendo de los requerimientos de cada anticuerpo.
2. Bloqueo de peroxidasa por 5 minutos.
3. 3 Lavados con solución Bond Wash de 1 minuto cada uno.
4. Incubación con anticuerpos primarios (MARKER) por 15 minutos.
5. 3 Lavados con solución Bond Wash de 1 minuto cada uno.
6. Incubación con reactivo de polímero post primario por 20 minutos.
7. 3 Lavados con solución Bond Wash por 2 minutos cada uno.
8. Incubación con polímero por 30 minutos.
9. 2 Lavados con solución Bond Wash por 2 minutos cada uno.
10. Lavado con agua destilada.
11. Revelar con cromógeno AEC por 15 minutos.



**SERVICIO SALUD AYSÉN
HOSPITAL REGIONAL
COYHAIQUE**

12. 3 Lavados con agua destilada.
13. Contraste nuclear con hematoxilina por 5 minutos.
14. Lavado con agua destilada.
15. Lavado con solución Bond Wash.
16. Lavado con agua destilada.
17. Sacar las bandejas con portaobjetos y traspasarlas a un rack para deshidratar en Equipo automatizado de tinción Leica Histocore Spectra ST con programa para deshidratar IHQ/HQ.
18. Limpiar portaobjetos y cubrir con Montador automático Leica Histocore SPECTRA CV.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Manual Procedimientos de Anatomía Patológica. Hospital Santiago Oriente. Dr. Luis Tisné Brousse.
- Procedimientos de la Etapa Analítica y post Analítica de Anatomía Patológica. Hospital las Higueras Talcahuano.

10. EVALUACIÓN: N/A

11. INDICADORES: N/A

12. DIAGRAMA DE FLUJO: N/A