



Gobierno de Chile

SERVICIO SALUD AISEN
HOSPITAL REGIONAL
COYHAIQUE

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

UNIDAD DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

DEPENDIENTE: CENTRO
RESPONSABILIDAD APOYO CLÍNICO

Código:

Edición: 01

Fecha Inicio
vigencia:
25/01/2016

Páginas: 1 - 14

Vigencia: 5 años

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

ELABORACION	VISACION	APROBACION
Vivian Sáenz	Paulina Arriagada Sandra Gálvez	Jorge Pinilla
 Jefe Anatomía Patológica Responsable Calidad Firma y timbre	 Jefe Anatomía Patológica Firma y timbre	 Jefe Anatomía Patológica Firma y timbre
11/01/2016	18/01/2016	25/01/2016



1. INDICE:

TITULO	Nº de pág
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	3
RESPONSABLES	3
ALCANCE	3
EXCEPCIONES	3
TERMINOLOGIA	3
DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES DEL PROCESO	4
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	14
EVALUACION	14
INDICADORES	14



2. INTRODUCCIÓN:

La histoquímica es una disciplina cuyo objetivo es poner de manifiesto una molécula o familia de moléculas presentes en una sección histológica y estudiar la distribución tisular.

Estas moléculas son difícilmente visibles con técnicas generales y por tanto es necesario realizar pasos previos para poner de manifiesto la molécula que queremos detectar.

3. OBJETIVOS:

- Asegurar la correcta realización del examen histoquímico en la biopsia diferida y complementar el diagnostico histológico por parte del médico patólogo.
- Estandarizar los procedimientos histoquímicos.

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 histológica a realizar• Interpretación de resultados y elaboración de informe.
Tecnólogos Médicos	<ul style="list-style-type: none">• Cumplir y aplicar protocolo• Ejecución de técnicas histoquímicas.
Tecnóloga Médica encargada de Calidad	<ul style="list-style-type: none">• Evaluar y supervisar protocolo

5. ALCANCE:

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

6. EXCEPCIONES: N/A

7. TERMINOLOGIA

Tinción histoquímica: técnica de laboratorio empleada para la detección de estructuras tisulares y celulares, microorganismos, entre otros agentes basada en reacciones químicas y detectadas a través de microscopio.

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

THQ: Técnica histoquímica

AP: Anatomía Patológica.



8. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES DEL PROCESO:

8.1. Consideraciones Generales:

- Existen tres técnicas histoquímicas de rutina en muestras endoscópicas de biopsias y la solicitud se hace a través de la impresión de la técnica en el cassette histológico:
 1. Muestra endoscópica de Esófago: PAS y Azul Alcian
 2. Muestra endoscópica de Estómago: PAS y Giemsa
 3. Muestra endoscópica de Duodeno: PAS
 4. Muestras de piel: PAS
- El médico patólogo al momento de realizar el examen macroscópico puede indicarle al funcionario de macroscopía la técnica a realizar, quedando registrada en el sistema informático de la Unidad.
- Si la petición de THQ ocurre una vez que la biopsia diferida está en proceso de informe, el patólogo debe ingresar su solicitud en la hoja de datos del informe de biopsia en el sistema informático de la Unidad AP.
- Los Tecnólogos Médicos revisan diariamente el ítem de especiales PENDIENTE_LÁMINAS en el sistema informático y realizan todas las técnicas histoquímicas 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.

8.2. Control de calidad.

- Cada lámina de THQ deberá ir acompañada de los respectivos controles positivos externos, responsabilidad del TM de turno de corte.
- El TM que realiza la THQ revisará al microscopio cada control positivo, para validar la correcta ejecución de la técnica.
- Todas las tinciones Histoquímicas son realizadas con kits listos para usar.

8.3. Interpretación de resultados:

- Todas las preparaciones son entregadas al patólogo para su interpretación y elaboración del informe final.



**SERVICIO SALUD AISEN
HOSPITAL REGIONAL
COYHAIQUE**

PAS (REACCION DEL ACIDO PERYODICO-REACTIVO DE SHIFF)

OBJETIVO:

- Identificación de glucógeno, mucinas neutras y algunas membranas basales en muestras de tejido.

Protocolo de tinción de PAS

1. Tejidos desparafinados e hidratados.
2. Oxidación en ácido peryódico a 0.5% por 10 minutos.
3. Lavado en agua corriente 5 min. Seguido de un lavado en agua destilada.
4. Tinción reactivo Schiff 15 min.
5. Lavado en agua corriente 3 min.
6. Contraste Hematoxilina 2 min.
7. Deshidratar, aclarar y montar con medio resinoso.

RESULTADOS:

- La presencia de mucinas neutras, glucolípidos y fosfolípidos se observarán de color púrpura.

PAS- AMILASA

OBJETIVO:

- Eliminación el glicógeno del tejido por digestión enzimática.

Protocolo de tinción de PAS-AMILASA

1. Tejidos desparafinados e hidratados.
2. Incubar en sol. amilasa (1 ml de amilasa en 5 ml de agua destilada.) a 37°C por 20 min.
3. Lavado en agua destilada
4. Continuar con técnica PAS desde paso 2.

RESULTADOS:

- La presencia de estructuras PAS positivas color púrpura, núcleos azules, eritrocitos rosa pálido, el glucógeno es eliminado por la diastasa/amilasa por lo tanto no se tiñe.



AZUL ALCIÁN

OBJETIVO:

- Identificación de mucinas ácidas y mucinas sulfatadas ácidas débiles.

Protocolo Tinción de Azul Alcían:

1. Tejidos desparafinados e hidratados.
2. Tinción con solución de Azul Alcían pH 2,5. por 10 min.
4. Contraste con hematoxilina de Harris por 2 min.
5. lavado en agua corriente por 3 min.
6. Deshidratar, aclarar y montar con medio resinoso.

RESULTADOS:

- Las mucinas ácidas y sulfatadas ácidas débiles se observaran de coloración celeste y los núcleos con coloración azul.

AZUL ALCIÁN-PAS

OBJETIVO: Demostrar en la piel engrosamiento de lámina basal y depósito de mucina intersticial, asociado a diagnóstico de lupus cutáneo.

Protocolo Tinción de Azul Alcían- PAS:

- Realizar la técnica de Alcian Blue hasta punto 3 y luego continuar con la tinción de PAS desde el paso 2

RESULTADOS:

- Mucinas ácidas ricas en grupos sulfónicos carboxílicos de color celeste y mucinas neutras de color magenta.

AZUL DE PRUSIA

OBJETIVO:

- Demostrar en los tejidos la presencia de ion férrico hemosiderina.

Protocolo Tinción de Azul de Prusia:

1. Tejidos desparafinados e hidratados.
2. Tinción con solución Fierro-ácida 3-5 min.
3. Lavado en agua destilada
4. Contraste con Nuclear Fast red solution 5 min.



**SERVICIO SALUD AYSÉN
HOSPITAL REGIONAL
COYHAIQUE**

5. lavado en agua destilada 5 min.
7. Deshidratar en 3 cambios de alcohol absoluto 2 min. c/u.
8. aclarar y montar con medio resinoso.

FONTANA MASSON

OBJETIVO:

- Demostrar por medio de impregnación con plata la presencia de gránulos argentafines, células de secreción endocrina y melanina.

Protocolo Tinción de Fontana Masson:

1. Tejidos desparafinados e hidratados.
2. Impregnación – Reducción sol. Fontana Masson 30 a 60 min, en estufa o baño de flotación a 58-60°C.
4. Incubar en sol. Cloruro de oro 30 seg
5. Lavado en 3 cambios de agua destilada
6. Fijación de la tinción con tiosulfato de sodio 5% 1-2 min
7. Lavado por 2 min. en agua corriente seguido de dos cambios de agua destilada.
8. Contraste con Nuclear Fast red solution 5 min.
9. Lavado por 2 min. en agua corriente seguido de dos cambios de agua destilada.
10. Deshidratar en 3 cambios de alcohol absoluto 2 min. c/u.
11. Aclarar y montar con medio resinoso.

RESULTADOS:

- Las sustancias reductoras de la plata, incluidas los gránulos argentafines y melanina aparecerán de color negro, los núcleos de color rosa.

Nota:

- se debe tener en cuenta que este procedimiento es inespecífico, ya que muchos pigmentos, incluidos el formol hierro y pigmento lipofucsina pueden ser positivos.



GRAM

OBJETIVO:

- Demostrar la presencia de bacterias en el tejido.

Protocolo Tinción de Gram

1. Tejidos desparafinados e hidratados.
2. Tinción con sol. violeta de genciana 1 min
3. Lavado en agua destilada
4. Mordiente sol. lugol 1 min
5. Lavado en agua corriente
6. Decoloración y lavado en agua corriente
7. Tinción con carbol fucsina 1-2 min.
8. Lavado en agua corriente.
9. Incubar en solución de tartrazina 15 seg
10. Lavar en un cambio de alcohol absoluto 5 seg.
11. Deshidratar en 3 cambios de alcohol absoluto
12. Aclarar y montar con medio resinoso.

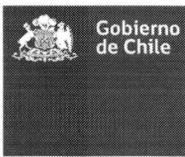
PLATA METENAMINA GROCOTT'S

OBJETIVO:

- Demostrar por medio de impregnación con plata la presencia de hongos presentes en los tejidos.

Protocolo Tinción de Grocott:

1. Tejidos desparafinados e hidratados.
2. Oxidación ácido crómico 10 min
3. Lavado en agua corriente seguido de 2 cambios de agua destilada
4. Sol. Bisulfito de sodio 1 min
5. Lavado en agua corriente seguido de 2 cambios de agua destilada
6. Impregnación en sol. de trabajo GMS (Nitrato de plata 10-15 min. a 60 °C
0.2% metenamina, bórax)



**SERVICIO SALUD AISEN
HOSPITAL REGIONAL
COYHAIQUE**

7. Lavado en 4 cambios de agua destilada
8. Viraje sol. cloruro de oro 0.2% 1 min
9. Lavado en 4 cambios de agua destilada
10. Fijación tinción con tiosulfato sodio 5% 2 min
11. Lavado en agua corriente seguido de 2 cambios de agua destilada
12. Contraste sol. verde luz 2 min
13. Lavar en alcohol absoluto.
14. Deshidratar en 2 cambios de alcohol absoluto
15. Aclarar y montar con medio resinoso.

VAN GIESON

OBJETIVO:

Identificación de fibras colágenas.

Protocolo de tinción de Van Gieson:

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
2. Hematoxilina férrica de Weigert (parte A + parte B) 10 min
3. Lavar agua corriente. 2 min.
4. Sol. De Van Gieson por 2 minutos.
5. Bluing Reagent por 30 seg.
6. Lavar en agua destilada.
7. Incubar en sol. De Van Gieson por 10 min.
8. Deshidratar en alcohol absoluto
9. Aclarar y montar.

Hematoxilina férrica de Weigert:

Hematoxilina C.I 75290 (3% alcohol absoluto). Sol.A
FeCl₃ 2.5% 2 y ácido clorhídrico. Sol.B

Solución de Van Gieson:

Solución acuosa de fucsina ácida al 1% 5 ml
Solución acuosa saturada de ácido pícrico 95 ml



TRICROMICO DE MASSON

OBJETIVO:

Identificación de fibras colágenas.

Protocolo de tinción de Tricromico de Masson:

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
2. Incubar en Fluido de bouin precalentado en baño de flotación por 60 min. y dejar enfriar 10 min. a temperatura ambiente.
3. Lavar en agua corriente seguido de agua destilada.
4. Hematoxilina férrica de Weigert (parte A + parte B) por 5 min
5. Lavar agua corriente. 2 min. Seguido de agua destilada.
6. Teñir en Sol. De Biebrich Scarlet/fucsina ácida por 15 minutos.
7. Lavar en agua destilada.
8. Diferenciar en Sol. De ácido fosfotúngstico- fosfomolibdico.
9. Sin enjuagar teñir en Sol. De azul de anilina por 5-10 min.
10. Lavar en agua destilada
11. Colocar en sol. De ácido acético glacial 1% por 3-5 min.
12. Deshidratar muy rápido en 2 cambios de alcohol 95% seguido de 2 cambios de alcohol absoluto.
13. Aclarar y montar.

RESULTADOS:

- Fibras colágenas de color azul.

GIEMSA

OBJETIVO:

Identificación de Helicobacter Pylori y Mastocitos.

Protocolo de tinción de GIEMSA:

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
2. Colocar en solución de Giemsa diluido (3 gotas en 1 ml de agua destilada) por 20 minutos.
3. Lavar en agua corriente.
4. Secar a 60°C. En equipo de tinción automático



**SERVICIO SALUD AISEN
HOSPITAL REGIONAL
COYHAIQUE**

5. Aclarar y Montar.

RESULTADOS:

- bacterias de color azul y gránulos de mastocitos púrpura.

KINYOUN

OBJETIVO:

- Demostrar la presencia de bacterias ácido alcohol resistentes.

Protocolo de tinción de KINYOUN:

1. Tejidos desparafinados e hidratados.
2. Tinción con Carbol fucsina 15 min
3. Lavar en agua corriente seguido de agua destilada.
4. Decoloración alcohol ácido 0.5% Hasta eliminación total del colorante
5. Lavado agua destilada
6. Contraste verde luz 30 segundos
7. Deshidratado, Aclarado
8. Montaje con medio resinoso

RESULTADOS:

- Los bacilos ácido alcohol resistentes se observaran de color rojo brillante

ROJO CONGO

OBJETIVO:

- Demostrar depósitos de AMILOIDE

Protocolo de tinción de ROJO CONGO:

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
2. Teñir con Hematoxilina de Mayer por 5 min.
3. Lavar en agua corriente
4. Incubar en Bluing Reagent por 30 seg.
5. Lavar en agua destilada.



6. Colocar en alcohol 95% por 5 seg.
7. Deshidratar rápidamente en alcohol absoluto.
8. Aclarar y montar.

RESULTADOS:

- Amiloide de color rojo y núcleos de color azules

WARTHIN-STARRY

OBJETIVO:

- Demostrar presencia de espiroquetas

Protocolo de tinción de WARTHIN-STARRY:

1. Desparafinar e hidratar los cortes hasta el agua destilada.
2. Impregnar con solución de nitrato de plata en estufa a 60-70°C por 90 minutos.
3. Dejar enfriar por 5 min.
4. Sacar los cortes y sin lavar poner en solución reveladora, en estufa a 50°C. por 5-10 min.
5. Lavar en agua corriente caliente (para sacar el exceso de gelatina) por 2 min.
6. Deshidratar en alcoholes ascendentes, aclarar y montar.

**Solución Impregnante y reveladora se preparan según inserto del kit.

RESULTADOS:

- Espiroquetas y Helicobacter Pylori de color negras.

RETICULO DE GOMORI

OBJETIVO:

- Identificación de fibras reticulares.

Protocolo de tinción de RETICULO

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
2. Permanganato de potasio 0.5 % por 5 min.
3. Lavado en agua destilada.
4. Sol. ácido oxálico por 3 min.



**SERVICIO SALUD AISEN
HOSPITAL REGIONAL
COYHAIQUE**

5. Doble Lavado en agua destilada.
6. Mordentar en alumbre férrico 3% por 3 minutos.
7. Doble Lavado en agua destilada.
8. Solución de plata de Amoniaco por 3 min.
9. Lavar en agua destilada.
10. Reducir en formalina neutra por 5 min.
11. Lavar en agua destilada.
12. Hiposulfito de sodio al 3% por 5 min.
13. Lavado en agua corriente po 5 min.
14. Deshidratar en alcoholes ascendentes, aclarar y montar.

RESULTADOS:

- fibras reticulares de color negro.

TÉCNICA HEMATOXILINA FÉRRICA DE VERHOEFF'S PARA FIBRAS ELÁSTICAS

OBJETIVO:

- Identificación de fibras elásticas.

Protocolo de tinción Verhoeff 's

1. Tejidos desparafinados e hidratados.
2. Teñir en solución de hematoxilina de Verhoeff por 15 min.
3. Lavado en agua corriente
4. Diferenciación en cloruro férrico al 2% controlando al microscopio
5. lavado en agua corriente.
6. Tiosulfato de sodio 5% por 1 min.
7. lavado en agua corriente por 2 min seguido de 2 cambios de agua destilada.
8. Solución de Van Gieson por 2 min.
9. Enjuagar en dos cambios de alcohol 95%.
10. Deshidratar en alcohol absoluto, aclarar y montar.



RESULTADOS:

- Las fibras elásticas se tornan de coloración gris-negro, el colágeno de color rojo y el resto de elementos de coloración amarilla.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- Manual Procedimientos de Anatomía Patológica Hospital Santiago Oriente.
Dr. Luis Tisné Brousse

10. EVALUACION N/A

11. INDICADORES N/A

12. DIAGRAMA DE FLUJO N/A