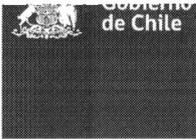


 <p>Gobierno de Chile</p> <p>SERVICIO SALUD AISEN HOSPITAL REGIONAL COYHAIQUE</p>	<p>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS</p> <p>UNIDAD DE ANATOMÍA PATOLOGICA</p> <p>DEPENDIENTE: CENTRO RESPONSABILIDAD APOYO CLÍNICO</p>	Código:
		Edición: 01
		Fecha Inicio vigencia: 25/01/2016
		Páginas: 1 - 8
		Vigencia: 5 años

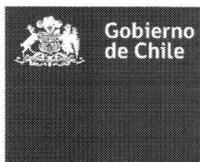
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

ELABORACION	VISACION	APROBACION
Vivian Sáenz	Paulina Arriagada Sandra Gálvez	Jorge Pinilla
TM. Anatomía Patológica Responsable Calidad	OCSP DEPTO. CALIDAD Y SEGURIDAD	Jefe Anatomía Patológica
 Firma y timbre	 Firma y timbre	 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	4
DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES DEL PROCESO	4
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	8
EVALUACION	8
INDICADORES	8
DIAGRAMA DE FLUJO	8
ANEXOS	8



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 del examen Inmunohistoquímicas en la biopsia diferida y complementar el diagnóstico histológico por parte del médico patólogo.
- Estandarizar los procedimientos 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• Ejecución de técnicas Inmunohistoquímicas.
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 inmunohistoquímicas.

6. EXCEPCIONES: N/A



7. TERMINOLOGIA

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.

Epítipo: 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 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 hoja de datos del informe de biopsia en el sistema informático de la Unidad AP y agregar los anticuerpos necesarios para cada caso.
- Los Tecnólogos Médicos revisan diariamente el ítem de Especiales PENDIENTE_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:

a) Cada lámina de IHQ deberá ir acompañada de los respectivos controles positivos externos, responsabilidad del TM de turno de corte.

b) 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 INMUNOHISTOQUÍMICAS:

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).

Fijador: Formalina al 10% Tamponada.

Cortes: En parafina, de 4-4.5 $\mu\text{m.}$, secar láminas en Equipo automatizado de tinción Autostainer XL con protocolo nº 6.

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

Anticuerpos utilizados en APA HRC.

Actin	P504S (AMACR)
Calretinina	P63
CD34	PANCK
CD117	PAX-8
CD138	PLAP
CD10	RP
CD45	S100
CEA	SINAPTOFISINA
CK HMW	TTF-1
CK7	MUTSPH2
CK20	MUTSPH6
CROMOGRANINA	PMSI2
E-Cadherina	MUTLPH1
ER	KI67
GFAP	Mammaglobin
HER-2	MELAN A
HMB45	P16



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 postprimario, polímero, cromógeno DAB y tinción de contraste por hematoxilina (Listo para usar).

8.3.3. **Protocolos automatizados:**

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 covertedile sobre los portaobjetos y ordenarlos por protocolo en las bandejas.

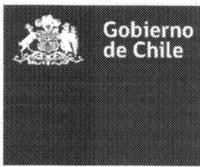
Paso n°5: Revisar los niveles de reactivos para recuperación antigénica, buffer de lavado, alcohol absoluto y agua destilada.

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 retardado).

a) 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.



**SERVICIO SALUD AYSÉN
HOSPITAL REGIONAL
COYHAIQUE**

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 postprimario 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 Autostainer XL con protocolo nº5.
18. Limpiar portaobjetos y cubrir con Montador automático Clear Vue.

b) 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 postprimario 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 Autostainer XL con protocolo nº5.
18. Limpiar portaobjetos y cubrir con Montador automático Clear Vue.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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

10. EVALUACION: N/A

11. INDICADORES: N/A

12. DIAGRAMA DE FLUJO: N/A