

# 101 PASOS PARA UNA MEJOR HISTOLOGÍA



Knowledge  
Pathway

Advancing Cancer Diagnostics  
Improving Lives

*Leica*  
BIO SYSTEMS

Desde el paciente hasta el patólogo, la preparación de muestras de tejidos para su examen histológico requiere cuidado, habilidad y un procedimiento delicado. Esta guía proporciona asesoramiento práctico sobre las mejores técnicas, así como formas sencillas de evitar errores comunes.

Se recogen todos los aspectos del proceso histológico: recogida de muestras, examen macroscópico, procesamiento, inclusión, seccionado y tinción (rutinaria, especial, inmunohistoquímica e hibridación in situ).

Esperamos que cada paso proporcione un valioso recordatorio de buenas prácticas histológicas y también ayude a solucionar problemas cuando se produzcan resultados inaceptables.

A handwritten signature in black ink, reading "Geoffrey Rolls". The signature is fluid and cursive, with the first name "Geoffrey" written in a larger, more prominent script than the last name "Rolls".

Geoffrey Rolls  
Leica Biosystems

# Contenido

## **Recogida y transporte de muestras**

- Paso 1 Evitar el trauma mecánico
- Paso 2 Evitar el secado de las muestras
- Paso 3 Evitar daños por calor
- Paso 4 Evitar daños químicos
- Paso 5 Etiquetar las muestras correctamente
- Paso 6 Garantizar la fijación rápida
- Paso 7 Usar suficiente fijador y un recipiente adecuado
- Paso 8 Comprobar el pH del fijador
- Paso 9 Acelerar la fijación de muestras grandes
- Paso 10 Evitar retrasos innecesarios
- Paso 11 Manipular las muestras con cuidado

## **Examen macroscópico**

- Paso 12 Comprobar el estado de la fijación
- Paso 13 Preparar cortes finos
- Paso 14 Evitar el traumatismo de las muestras
- Paso 15 Evitar la contaminación cruzada
- Paso 16 Tener cuidado con las almohadillas para biopsia
- Paso 17 Elegir casetes adecuados
- Paso 18 Evitar sobrecargar los casetes
- Paso 19 Etiquetar claramente los casetes

## **Procesamiento**

- Paso 20 Usar un programa apropiado
- Paso 21 Proporcionar fijación adicional
- Paso 22 Mantener la calidad del reactivo
- Paso 23 Usar parafina de alta calidad
- Paso 24 Evitar los reactivos peligrosos

## **Inclusión**

- Paso 25 Orientar las muestras con cuidado
- Paso 26 Elegir un molde adecuado
- Paso 27 Manipular las muestras con cuidado
- Paso 28 Evitar el calor excesivo
- Paso 29 Comprobar las temperaturas con regularidad
- Paso 30 No llenar en exceso los moldes

## **Microtomía**

- Paso 31 Usar cuchillas de alta calidad
- Paso 32 Optimizar el ángulo de inclinación de la cuchilla
- Paso 33 Recortar los bloques con cuidado
- Paso 34 Evitar daños por congelación
- Paso 35 Usar bloques fríos
- Paso 36 Cortar las secciones lentamente

## **Flotación**

- Paso 37 Usar agua limpia
- Paso 38 Asegurarse de que las preparaciones estén limpias
- Paso 39 Evitar la contaminación cruzada
- Paso 40 Evitar la contaminación con escamas
- Paso 41 No flotar entre varios bloques
- Paso 42 Comprobar la temperatura del agua
- Paso 43 Evitar las arrugas en las secciones
- Paso 44 Evitar la expansión excesiva de las secciones
- Paso 45 No dañar las secciones flotantes
- Paso 46 Elegir secciones con cuidado
- Paso 47 Evitar burbujas bajo las secciones
- Paso 48 Evitar que la sección se levante



## **Secado de las secciones**

- Paso 49 Drenar antes de secar
- Paso 50 Supervisar la temperatura de secado
- Paso 51 Secar durante el tiempo adecuado

## **Tinción rutinaria (H&E)**

- Paso 52 Usar un tiempo preciso
- Paso 53 Supervisar con regularidad la calidad
- Paso 54 Estandarizar las condiciones de tinción
- Paso 55 Garantizar una eliminación completa de la parafina
- Paso 56 Renovar los reactivos con regularidad
- Paso 57 Hidratar las secciones a fondo
- Paso 58 Supervisar la calidad de la hematoxilina
- Paso 59 Garantizar el "azulado" nuclear completo
- Paso 60 Evitar la tinción irregular con eosina
- Paso 61 Supervisar el pH de la eosina

## **Cubrición**

- Paso 62 Deshidratar completamente antes de la limpieza y la cubrición
- Paso 63 Evitar el secado y la formación de cristales

## **Tinciones especiales**

- Paso 64 Comprender la tinción
- Paso 65 Usar un control positivo
- Paso 66 Usar un tiempo preciso
- Paso 67 Considerar la estabilidad de los reactivos
- Paso 68 Almacenar los reactivos correctamente
- Paso 69 Adherirse al método
- Paso 70 Registrar cualquier cambio
- Paso 71 Estandarizar los pasos de lavado
- Paso 72 Preparar el microscopio cuidadosamente

## **Inmunohistoquímica**

- Paso 73 Usar secciones de alta calidad
- Paso 74 Garantizar una fijación óptima
- Paso 75 Evitar problemas de adherencia de la sección
- Paso 76 Optimizar la eliminación de parafina y la aplicación de reactivos
- Paso 77 Evitar gradientes de concentración
- Paso 78 Elegir el anticuerpo con cuidado
- Paso 79 Leer las hojas de especificaciones
- Paso 80 Optimizar los métodos de recuperación
- Paso 81 Considerar la reactividad cruzada de anticuerpos
- Paso 82 Bloquear la peroxidasa endógena
- Paso 83 Evitar la tinción de fondo
- Paso 84 Usar un sistema de detección adecuado
- Paso 85 Estandarizar los pasos de lavado
- Paso 86 Optimizar la contratinción
- Paso 87 Usar controles adecuados
- Paso 88 Evaluar los resultados con atención

## **Hibridación in situ**

- Paso 89 Usar secciones de alta calidad
- Paso 90 Garantizar una fijación óptima
- Paso 91 Evitar problemas de adherencia de la sección
- Paso 92 Optimizar la eliminación de parafina y la aplicación de reactivos
- Paso 93 Elegir la sonda con cuidado
- Paso 94 Leer las hojas de especificaciones
- Paso 95 Optimizar las condiciones del tratamiento previo
- Paso 96 Manipular el tejido con cuidado
- Paso 97 Usar un sistema de detección adecuado
- Paso 98 Evitar la evaporación del reactivo
- Paso 99 Estandarizar los pasos de lavado
- Paso 100 Usar controles adecuados
- Paso 101 Evaluar los resultados con atención



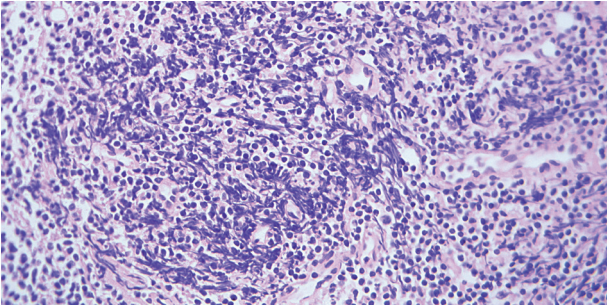
- Paso 1 Evitar el trauma mecánico
- Paso 2 Evitar el secado de las muestras
- Paso 3 Evitar daños por calor
- Paso 4 Evitar daños químicos
- Paso 5 Etiquetar las muestras correctamente
- Paso 6 Garantizar la fijación rápida
- Paso 7 Usar suficiente fijador y un recipiente adecuado
- Paso 8 Comprobar el pH del fijador
- Paso 9 Acelerar la fijación de muestras grandes
- Paso 10 Evitar retrasos innecesarios
- Paso 11 Manipular las muestras con cuidado

Recogida y transporte  
de muestras

# Paso 1

## Evitar el trauma mecánico

- ✓ El tejido se extrae con cuidado para evitar los traumas en la muestra provocados por aplastamiento o desgarro. Esto se aplica tanto durante la cirugía como durante cualquier disección adicional que pueda ser necesaria de una muestra fresca.
- ✗ La muestra se daña antes de la fijación por aplastamiento o desgarro durante la extracción.



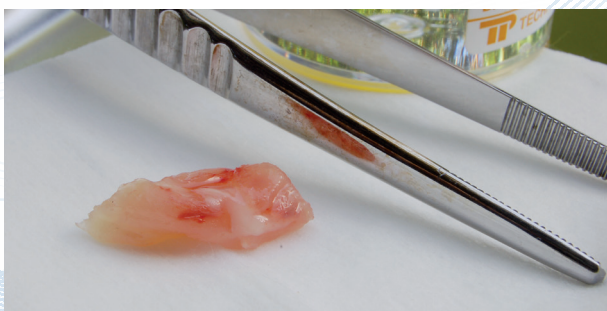
Se muestra un artefacto de aplastamiento típico en esta sección del tejido linfoide. Se caracteriza por núcleos celulares oscuros y distorsionados, algunos de los cuales son extremadamente alargados e intensamente basófilos.

Recogida y transporte de  
muestras

# Paso 2

## Evitar el secado de las muestras

- ✓ No se permite que la muestra se seque antes de la fijación. Si no es posible la fijación inmediata, puede utilizarse una gasa humedecida con solución salina para evitarlo.
- ✗ La muestra se deja en la superficie absorbente durante un tiempo antes de la fijación.



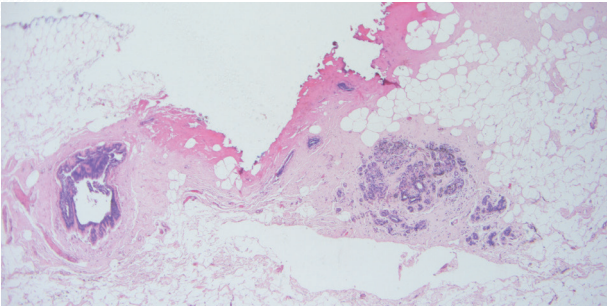
Esta muestra fresca se acaba de extraer de un paciente durante la cirugía. Puesto que descansa sobre una superficie absorbente y en el quirófano hace bastante calor, se secará rápidamente a menos que se coloque inmediatamente en fijador.

## Recogida y transporte de muestras

# Paso 3

## Evitar daños por calor

- ✓ En la medida de lo posible, evite daños locales por calor en las muestras (algunos daños producidos por cauterización pueden ser inevitables).
- ✗ Cualquier calor local innecesario aplicado al tejido causará daños. El tejido fresco es especialmente sensible.



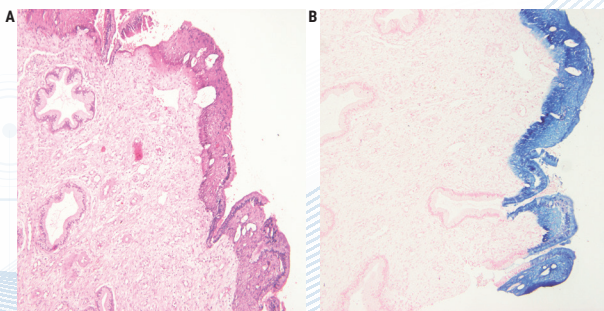
Un área localizada en el borde de esta muestra mamaria presenta una acidofilia fuerte con una pérdida de detalles nucleares y citoplásmicos. Estos efectos son el resultado de los daños por calor provocados cuando se utiliza cauterización durante la extracción de la muestra. El tejido glandular adyacente no se ve afectado.

Recogida y transporte de  
muestras

# Paso 4

## Evitar daños químicos

- ✓ Evite contaminar las muestras frescas con productos químicos o sustancias extrañas, como desinfectantes.
- ✗ Se puede penetrar fácilmente en la superficie del tejido no fijado y este se puede dañar con reactivos o sustancias extrañas.



La solución de Monsel (solución de subsulfato férrico) es un agente hemostático tópico utilizado para controlar la hemorragia tras la biopsia de mucosa. Provoca coagulación y necrosis de la superficie mucosa. Si se aplica antes de practicar una biopsia, provoca basofilia local y signos de necrosis temprana, enmascarando los cambios patológicos que pueden estar presentes. El artefacto de la solución de Monsel se observa con mayor frecuencia cuando se vuelve a someter al paciente a una biopsia o se realiza una escisión más amplia más tarde. Los efectos se observan en la micrografía A de una biopsia cervical teñida con H&E. La micrografía B, teñida con el método de Perl, muestra la extensa deposición de hierro en la superficie de la muestra.

## Recogida y transporte de muestras



# Paso 5

## Etiquetar las muestras correctamente

- ✓ Cada muestra debe identificarse correctamente y todos los detalles deben registrarse lo antes posible.
- ✗ El registro de los detalles de la muestra se retrasa y la información proporcionada está incompleta.



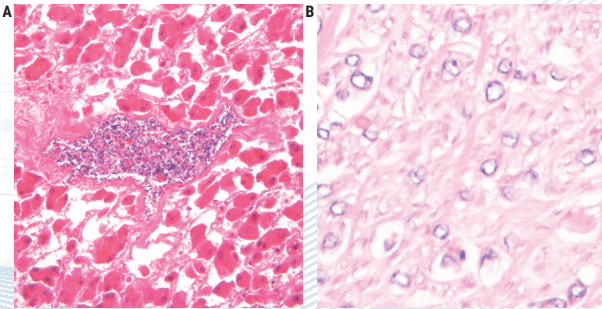
Un laboratorio no debe aceptar las muestras con etiquetas incompletas como estas. Debe existir un procedimiento para tratar las muestras que lleguen al laboratorio etiquetadas de forma inadecuada o acompañadas de documentación incompleta o inconsistente.

Recogida y transporte de  
muestras

# Paso 6

## Garantizar la fijación rápida

- ✓ La fijación siempre se lleva a cabo con rapidez. Si es necesario que una muestra permanezca sin fijar durante un breve período de tiempo, debe estar refrigerada a 4 °C.
- ✗ La fijación se retrasa (la degeneración de los elementos de tejido comienza en cuanto se suprime el riego sanguíneo de la muestra).



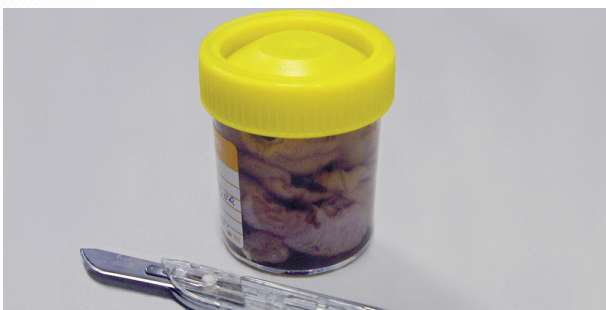
- A Esta muestra hepática de autopsia (H&E) muestra el resultado de un retraso prolongado antes de la fijación. Observe los núcleos mal definidos y los detalles citoplasmáticos imprecisos. Hay muchas bacterias presentes en el vaso sanguíneo central.
- B En esta sección de tejido fibromuscular, la cromatina nuclear se conserva mal debido a un retraso prolongado antes de la fijación.

Recogida y transporte de muestras

# Paso 7

## Usar suficiente fijador y un recipiente adecuado

- ✓ Se utiliza un volumen adecuado de fijador (proporción de al menos 20:1) en un recipiente de un tamaño adecuado. Esto evita la distorsión de la muestra fresca y garantiza una fijación de buena calidad.
- ✗ Las muestras a veces se apretujan en un recipiente pequeño con un fijador insuficiente para cubrir la superficie de la muestra.



Este recipiente es demasiado pequeño para la masa de tejido que contiene. No hay suficiente fijador presente y es posible que la muestra se haya distorsionado al introducirla en el recipiente.

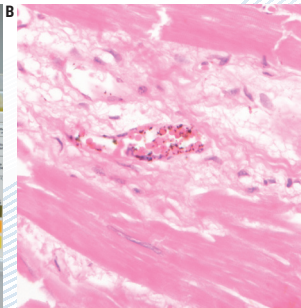
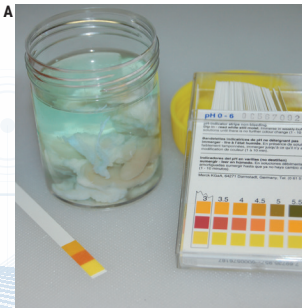
Recogida y transporte de  
muestras

# Paso 8

## Comprobar el pH del fijador

✓ El fijador es de alta calidad y con el pH óptimo.

✗ El fijador es de mala calidad y de pH desconocido. Si se utiliza formol con un pH ácido, produce rápidamente "pigmento de formol" por reacción con hemoglobina. Las soluciones casi neutras seguirán produciendo el pigmento, pero mucho más lentamente. En preparaciones histológicas adecuadas, el pigmento de formalina debe eliminarse antes de la tinción.



A El fijador utilizado aquí tiene un pH insatisfactorio de 4,5. Las soluciones de formol amortiguado deben tener un pH de 6,8-7,0.

B El depósito granular de color negro pardusco observado en el vaso sanguíneo en el centro de este campo es pigmento de formol (hematina ácida del formaldehído). Se forma rápidamente cuando el tejido se fija en formol ácido y normalmente se observa en combinación con glóbulos rojos.

## Recogida y transporte de muestras

# Paso 9

## Acelerar la fijación de muestras grandes

- ✓ Las dimensiones de la muestra permiten una penetración rápida del fijador. Las muestras grandes deben transportarse rápidamente al laboratorio para permitir el examen macroscópico (se pueden preparar cortes de tejido para permitir una fijación adecuada).
- ✗ Las muestras grandes se dejan en fijador durante un tiempo prolongado antes del examen macroscópico. El centro de la muestra puede permanecer sin fijar y el tejido puede quedar notablemente distorsionado.



Esta muestra grande (corazón de cerdo) se ha cortado para permitir el acceso del fijador a todas las partes del tejido. Los cortes tienen un grosor aproximado de 4-5 mm.

Recogida y transporte de  
muestras

# Paso 10

## Evitar retrasos innecesarios

- ✓ Sin retrasos innecesarios: la muestra llega al laboratorio en el tiempo mínimo.
- ✗ Las muestras a veces se retrasan: el transporte de muestras tiene una prioridad baja y no está bien organizado.



Las prioridades son importantes al entregar muestras al laboratorio. Esto es especialmente así cuando se trata de secciones congeladas.

## Recogida y transporte de muestras

# Paso 11

## Manipular las muestras con cuidado

- ✓ Muestras manipuladas con cuidado: las muestras frágiles permanecen intactas.
- ✗ Muestras manipuladas bruscamente: las muestras friables delicadas pueden dañarse.



Algunos de los fragmentos de tejido que se ven en el fondo de este recipiente se han producido por una manipulación excesivamente brusca durante el transporte de la muestra. Lo que originalmente era una muestra cohesiva, ahora consiste en fragmentos de tejido.

Recogida y transporte de  
muestras







- Paso 12 Comprobar el estado de la fijación
- Paso 13 Preparar cortes finos
- Paso 14 Evitar el traumatismo de las muestras
- Paso 15 Evitar la contaminación cruzada
- Paso 16 Tener cuidado con las almohadillas para biopsia
- Paso 17 Elegir casetes adecuados
- Paso 18 Evitar sobrecargar los casetes
- Paso 19 Etiquetar claramente los casetes

## Examen macroscópico

# Paso 12

## Comprobar el estado de la fijación

- ✓ Las muestras se tratan con prontitud (especialmente las muestras grandes que, de otro modo, podrían fijarse de forma inadecuada).
- ✗ No se tiene en cuenta la optimización de la fijación de las muestras problemáticas.



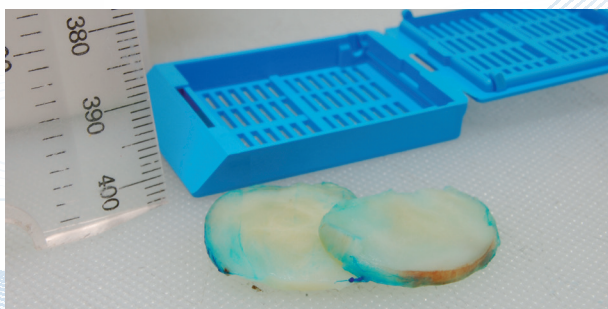
Las muestras en los recipientes grandes deben comprobarse lo antes posible para asegurarse de que se fijarán adecuadamente.

Examen macroscópico

# Paso 13

## Preparar cortes finos

- ✓ Siempre se tiene cuidado al preparar cortes finos y uniformes a partir de muestras grandes (grosor máximo de 3-4 mm). Esto es especialmente importante con tejidos densos.
- ✗ Los cortes a veces tienen un grosor de 6 mm (o más) y a menudo son desiguales.



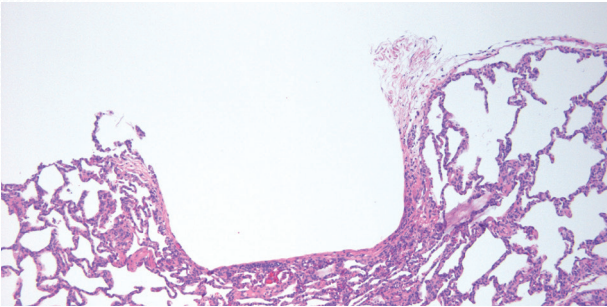
Aquí se muestran cortes uniformes y finos (2-3 mm) de un tumor listo para su procesamiento. Deberían procesarse de forma eficaz y seccionarse sin dificultad.

## Examen macroscópico

# Paso 14

## Evitar el traumatismo de las muestras

- ✓ Se debe tener cuidado para evitar traumatizar las muestras delicadas, especialmente aquellas fijadas incompletamente (manipular con cuidado, no aplastar, utilizar siempre cuchillas afiladas).
- ✗ Las muestras se manipulan bruscamente sin tener en cuenta su estado de fijación. A veces, en la disección se utilizan cuchillas romas.



Sección de pulmón teñido con H&E que muestra un traumatismo local evidente por haberlo agarrado con fuerza con pinzas. El tejido fresco o parcialmente fijado es más susceptible de sufrir daños, pero incluso el tejido bien fijado puede resultar dañado por una manipulación brusca.

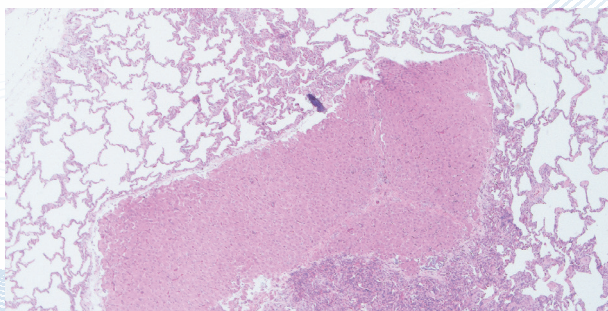
Examen macroscópico

# Paso 15

## Evitar la contaminación cruzada

✓ Cada muestra se manipula sobre una superficie limpia, evitando la posibilidad de contaminación de muestra a muestra.

✗ A veces, la superficie de la tabla de cortar no se limpia correctamente entre las muestras. Esto es especialmente preocupante cuando se cortan los mismos tipos de muestras uno tras otro. No desea que una muestra maligna contamine otra benigna.



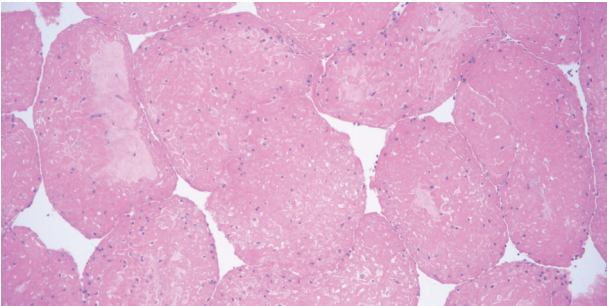
Sección de pulmón teñido con H&E que contiene un trozo de tejido extraño (hígado) incrustado en la superficie durante el corte.

## Examen macroscópico

# Paso 16

## Tener cuidado con las almohadillas para biopsia

- ✓ Las muestras frescas o fijadas incompletamente no se colocan entre almohadillas para biopsia de espuma, especialmente las muestras obtenidas con aguja gruesa (se evita el artefacto de la almohadilla de biopsia).
- ✗ A veces se colocan muestras pequeñas, frescas o fijadas incompletamente entre almohadillas para biopsia, se ponen en un casete y, a continuación, se fijan. Esto puede producir un artefacto característico.



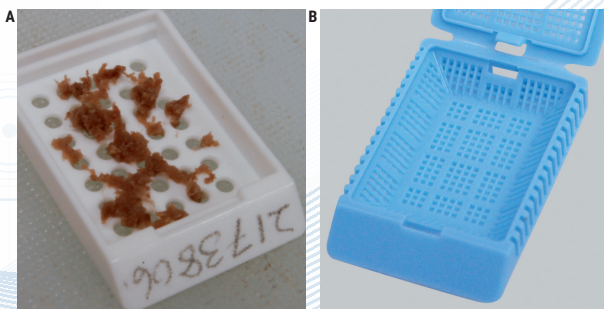
Los espacios triangulares visibles en esta sección son el resultado de los efectos de presión local provocados por la estructura celular de las almohadillas de espuma cuando se aplican a tejido fresco o fijado muy brevemente.

Examen macroscópico

# Paso 17

## Elegir casetes adecuados

- ✓ Elija los casetes adecuados para el tipo de muestra que se está procesando. Los fragmentos de tejido se encogen durante el procesamiento y, si las perforaciones del casete son demasiado grandes, los fragmentos pueden escaparse en los reactivos de procesamiento o, peor aún, transferirse a otra muestra.
- ✗ Cuando se colocan las muestras en casetes, se utiliza un enfoque de “un tamaño sirve para todas”.



- A Algunos de los fragmentos de tejido más pequeños que se ven aquí pueden escaparse a través de los orificios del casete. Esto será aún más probable a medida que el tejido se encoja durante el procesamiento.
- B Hay disponibles casetes con perforaciones finas para pequeños fragmentos de tejido.

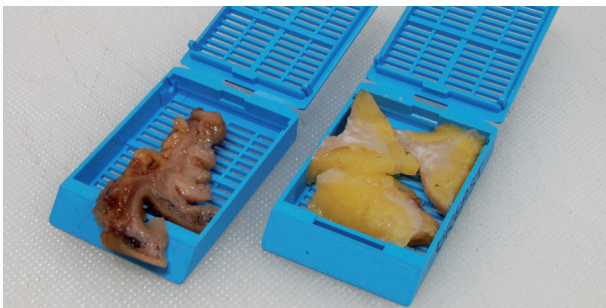
## Examen macroscópico



# Paso 18

## Evitar sobrecargar los casetes

- ✓ Los casetes nunca se sobrecargan con tejido, lo que permite un acceso rápido a los reactivos de procesamiento y evita la distorsión de las muestras. Si el volumen de tejido es demasiado grande, se utiliza un segundo casete.
- ✗ Los casetes a menudo se abarrotan llenos de tejido, lo que evita el acceso de los reactivos de procesamiento. En ocasiones, las muestras se distorsionan en el proceso.



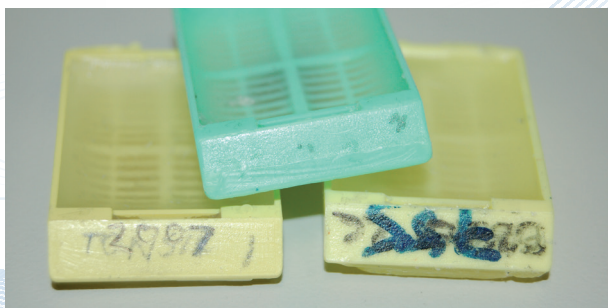
Estos casetes están sobrecargados. Si el procesamiento avanza, las muestras se distorsionarán y es probable que el procesamiento sea incompleto.

Examen macroscópico

# Paso 19

## Etiquetar claramente los casetes

- ✓ Los casetes siempre están claramente etiquetados. La identificación precisa de las muestras es de vital importancia.
- ✗ A veces es difícil leer las etiquetas de los casetes. Puede ser necesario hacer algunas conjeturas.



Estas etiquetas de casete ilegibles son totalmente inaceptables.

Examen macroscópico



# Knowledge Pathway

- Paso 20 Usar un programa apropiado
- Paso 21 Proporcionar fijación adicional
- Paso 22 Mantener la calidad del reactivo
- Paso 23 Usar parafina de alta calidad
- Paso 24 Evitar los reactivos peligrosos

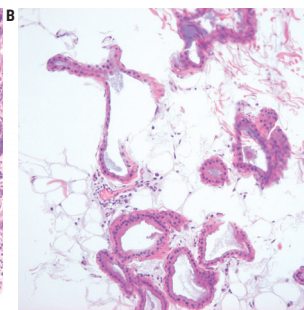
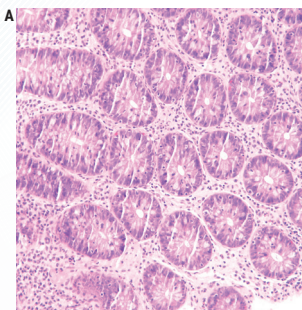
## Procesamiento

# Paso 20

## Usar un programa apropiado

✓ Se elige un programa apropiado para el tipo y tamaño de tejido.

✗ Se elige un programa inapropiado. Por ejemplo, un programa muy largo para una biopsia endoscópica pequeña o un programa muy corto para una muestra mamaria grande y grasa.



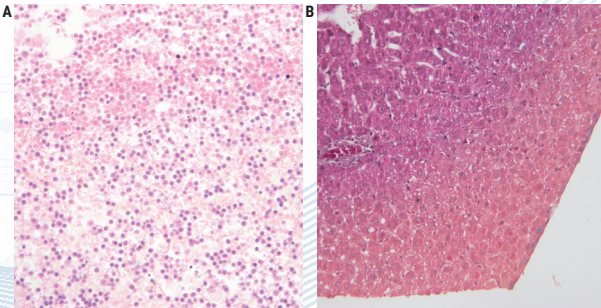
- A Esta biopsia endoscópica se ha procesado excesivamente y se ha vuelto muy quebradiza. En consecuencia, se pueden ver muchas grietas finas en toda la sección. Una técnica de microtomía deficiente agrava el problema (H&E).
- B Esta micrografía de una pequeña zona de tejido subcutáneo de una muestra grande y grasa muestra los efectos del procesamiento insuficiente. El tejido fibrograso está mal soportado y, por tanto, fragmentado, mientras que el tejido epitelial de las glándulas muestra una falta de definición nuclear y tinción peculiar debido al disolvente retenido (H&E).

## Procesamiento

# Paso 21

## Proporcionar fijación adicional

- ✓ Para un procesamiento óptimo y una buena morfología, el tejido debe fijarse bien antes del procesamiento. Cuando las muestras se fijan incompletamente, se proporciona fijación adicional con formol en el programa de procesamiento.
- ✗ Las muestras no fijadas completamente van directamente en alcohol que produce fijación zonal (fijación con formol para el exterior de la muestra, fijación con alcohol para zonas más profundas).



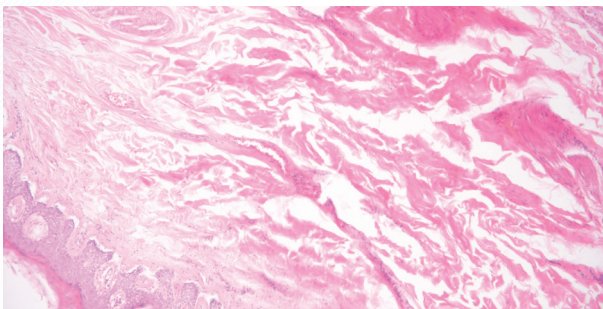
- A Esta micrografía muestra los efectos de la fijación zonal en una sección de aspiración de médula ósea (H&E). En la parte superior izquierda, los glóbulos rojos están intactos, mientras que en la parte inferior están hemolizados.
- B Esta micrografía muestra una vista de baja potencia del hígado teñido con una tinción de tricromo. El resultado de la tinción en la zona exterior de la muestra es diferente al de la zona interior.

Procesamiento

# Paso 22

## Mantener la calidad del reactivo

- ✓ Los reactivos de procesamiento se sustituyen estrictamente de acuerdo con las directrices establecidas (lo ideal es utilizar un sistema de gestión de reactivos en un procesador de tejidos avanzado, como PELORIS de Leica Biosystems).
- ✗ Se ignoran las directrices para la sustitución de los reactivos de procesamiento, lo que significa que se utilizan reactivos ineficaces, contaminados o diluidos (p. ej., se ignoran las advertencias de "fuera de umbral" del sistema de gestión de reactivos PELORIS). Esto puede provocar una mala calidad de procesamiento.



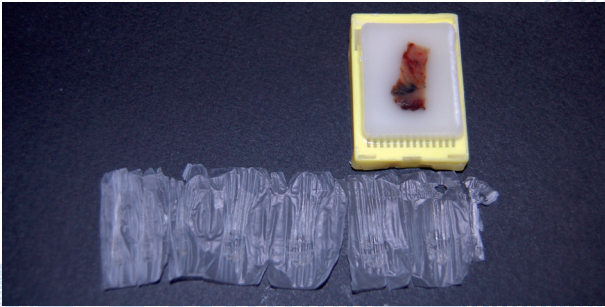
En esta sección, a partir de una muestra de piel grande, la mala conservación del colágeno denso se debe a un procesamiento inadecuado. En este caso, creemos que se debió al uso de reactivos muy contaminados, muy "fuera de umbral".

Procesamiento

# Paso 23

## Usar parafina de alta calidad

- ✓ Se utiliza parafina de alta calidad para la infiltración y especialmente para la inclusión (bloqueo) para garantizar bloques de alta calidad fáciles de cortar.
- ✗ Se utiliza parafina barata y de mala calidad de fuentes poco conocidas para la infiltración y la inclusión. La parafina de mala calidad produce bloques difíciles de cortar.



Se cortó lentamente una cinta de secciones de este bloque mientras el bloque estaba frío. Las secciones muestran una compresión considerable a pesar de la baja temperatura utilizada. En este caso, la parafina de mala calidad no ha soportado correctamente el tejido.

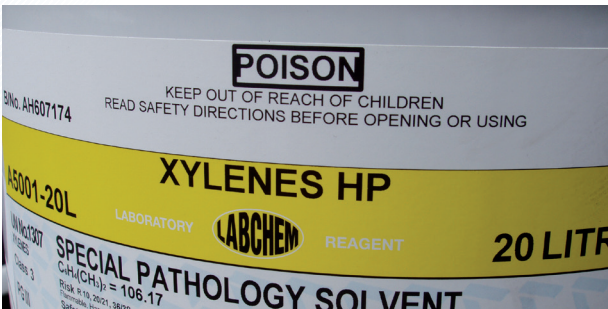
## Procesamiento



# Paso 24

## Evitar los reactivos peligrosos

- ✓ Cuando es posible, se utilizan protocolos exentos de xileno (como los disponibles cuando se utiliza PELORIS de Leica Biosystems). Esto proporciona un entorno de laboratorio más seguro sin afectar a la calidad del procesamiento.
- ✗ No se tienen en cuenta los efectos sobre la salud del uso de xileno. No se ha considerado la posibilidad de utilizar alternativas.



El procesamiento exento de xileno puede mejorar la seguridad del laboratorio a la vez que mantiene la calidad.

Procesamiento





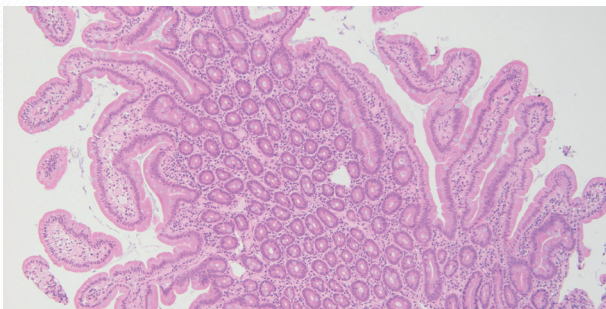
- Paso 25 Orientar las muestras con cuidado
- Paso 26 Elegir un molde adecuado
- Paso 27 Manipular las muestras con cuidado
- Paso 28 Evitar el calor excesivo
- Paso 29 Comprobar las temperaturas con regularidad
- Paso 30 No llenar en exceso los moldes

Inclusión

# Paso 25

## Orientar las muestras con cuidado

- ✓ Las muestras se orientan con cuidado. Un examen macroscópico idóneo garantiza superficies planas en la mayoría de las muestras. El personal que realiza la inclusión tiene acceso inmediato a la descripción de cada muestra y cuenta con la formación adecuada.
- ✗ La orientación es incorrecta. Esto puede dar lugar a la pérdida de tejido, ya que es necesario volver a realizar la inclusión. Algunas muestras mal preparadas requieren un amplio recorte en el microtomo para obtener una sección de cara completa.



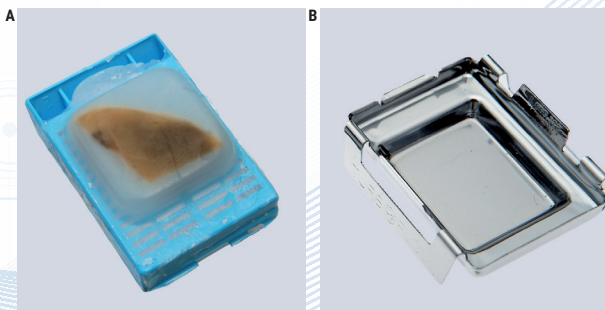
Esta biopsia endoscópica se ha orientado incorrectamente y muestra solo el nivel superficial de la mucosa.

Inclusión

# Paso 26

## Elegir un molde adecuado

- ✓ Siempre se elige un molde de tamaño adecuado para cada muestra.
- ✗ Se utiliza el mismo tamaño de molde para todas las muestras. Con frecuencia, el tejido toca el borde del molde.



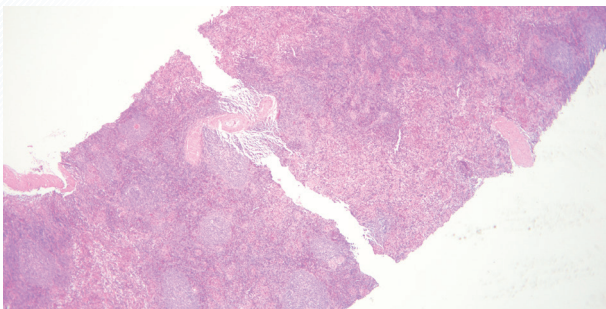
- A El molde utilizado para esta muestra era demasiado pequeño. La muestra está en contacto con los bordes del bloque y, por tanto, puede ser difícil de seccionar.
- B Hay moldes de diferentes tamaños disponibles para diversos tamaños de muestras.

# Paso 27

## Manipular las muestras con cuidado

✓ Las muestras se manipulan con cuidado durante la inclusión.

✗ Las muestras se manipulan bruscamente durante la inclusión para que queden planas en el molde. Este proceso puede fracturar parte del tejido.



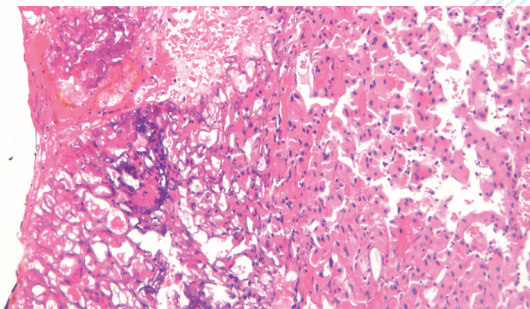
Sección de bazo teñida con H&E que se fracturó durante la inclusión en un intento de hacer que la muestra quedara plana sobre la base del molde.

Inclusión

# Paso 28

## Evitar el calor excesivo

- ✓ Antes de manipular el tejido, las pinzas se calientan hasta el punto en que la parafina se funde.
- ✗ Las pinzas se calientan mucho más allá del punto de fusión de la parafina. Esto puede causar daños locales por calor y un cambio en la morfología de la zona cercana al punto de contacto.



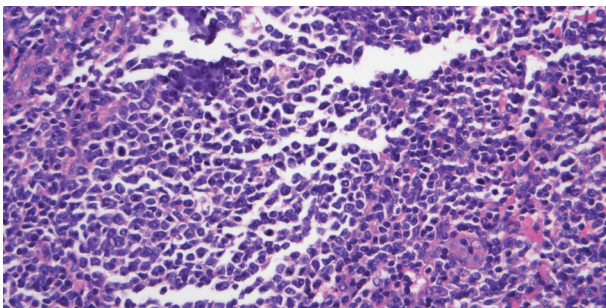
Esta micrografía muestra la superficie de una sección del hígado (H&E). El daño local extremo (que hace que el tejido sea casi irreconocible) ha sido provocado por la aplicación de calor al tejido durante la inclusión.



# Paso 29

## Comprobar las temperaturas con regularidad

- ✓ La temperatura de la placa calefactora del centro de inclusión y del depósito de parafina se comprueba con regularidad.
- ✗ La temperatura de la placa calefactora del centro de inclusión no se comprueba nunca. Incluso en esta etapa del procesamiento, las muestras pueden resultar dañadas por un calor local excesivo.



Este ganglio linfático se dañó por el sobrecalentamiento de la placa calefactora del centro de inclusión. Observe los núcleos picnóticos y arrugados y el amplio agrietamiento. Un agrietamiento como este también puede deberse a la flotación en un baño de agua demasiado caliente o al secado en una placa calefactora sin suficiente drenaje.

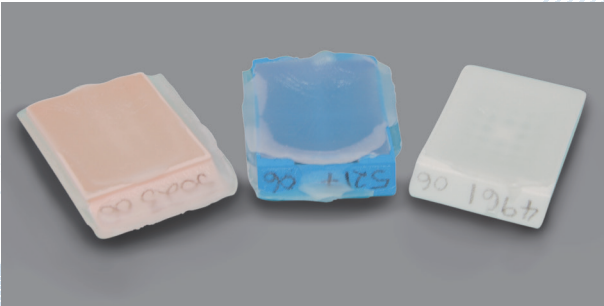
Inclusión

# Paso 30

## No llenar en exceso los moldes

✓ Los moldes se llenan hasta un nivel óptimo y no se desbordan.

✗ Los moldes se llenan en exceso, lo que requiere raspar la parte posterior y los bordes del casete antes de la microtomía. Los bloques llenados en exceso pueden asentarse de forma desigual en el portaherramientas del microtomo, lo que puede provocar inestabilidad y provocar daños en el tejido durante la microtomía.



Bloques que se han producido por llenar en exceso los moldes durante la inclusión.



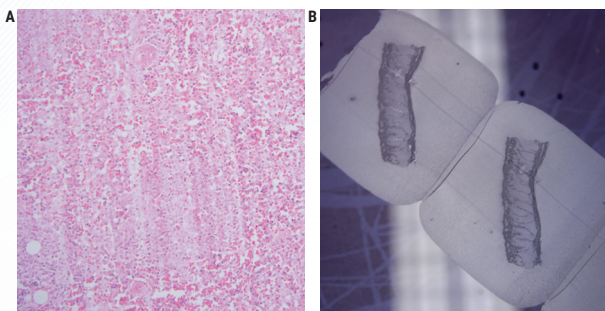
- Paso 31 Usar cuchillas de alta calidad
- Paso 32 Optimizar el ángulo de inclinación de la cuchilla
- Paso 33 Recortar los bloques con cuidado
- Paso 34 Evitar daños por congelación
- Paso 35 Usar bloques fríos
- Paso 36 Cortar las secciones lentamente

**Microtomía**

# Paso 31

## Usar cuchillas de alta calidad

- ✓ Siempre se utilizan cuchillas afiladas de alta calidad para cortar.
- ✗ Se utilizan cuchillas durante el mayor tiempo posible; algunas "líneas de trayectoria" se consideran aceptables.

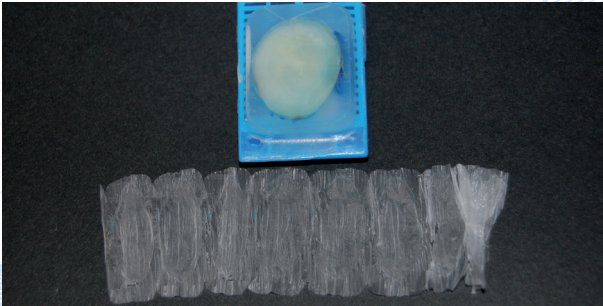


- A Sección de bazo (H&E) que muestra muchas líneas finas debido a una cuchilla defectuosa.
- B Secciones de piel sometidas a flotación. Se puede ver una línea de cuchilla profunda que atraviesa directamente el tejido. Los defectos como este se pueden ver fácilmente durante la flotación.

# Paso 32

## Optimizar el ángulo de inclinación de la cuchilla

- ✓ Siempre se optimiza el ángulo de inclinación de la cuchilla para cada tipo de microtomo y de cuchilla.
- ✗ El ángulo de inclinación de la cuchilla nunca se ajusta cuando se cambian las condiciones (diferente microtomo, nuevo tipo de cuchilla, diferente parafina, etc.).

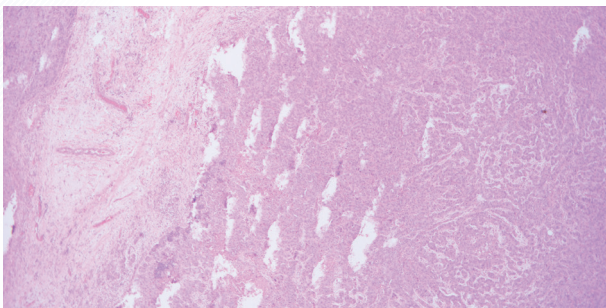


Esta cinta corta de secciones cortada de un bloque frío muestra una compresión considerable (30-40 %). En este caso, la reconfiguración del ángulo de inclinación de la cuchilla superó el problema.

# Paso 33

## Recortar los bloques con cuidado

- ✓ Los bloques se recortan con cuidado para exponer el tejido. Las últimas secciones siempre se cortan con el que será el espesor final para pulir la cara del bloque.
- ✗ Los bloques se recortan bruscamente para ahorrar tiempo. La superficie no se pule antes de tomar las secciones finales. Esto a menudo produce un aspecto de "apolillado" en la sección final que está llena de pequeños orificios irregulares.

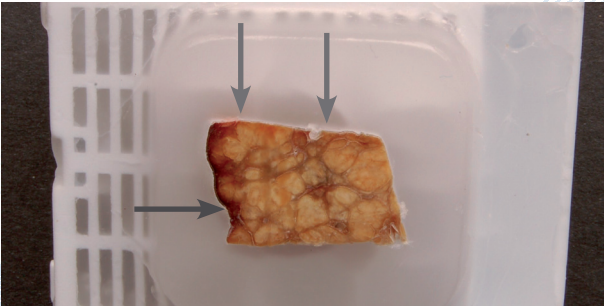


La exposición inicial del tejido (desbaste) en este bloque ha extraído fragmentos de la superficie del bloque, lo que ha dado lugar a numerosos orificios en la sección final (H&E).

# Paso 34

## Evitar daños por congelación

- ✓ Los bloques se enfrían en una superficie húmeda y fría y siempre están fríos cuando se cortan (la superficie de hielo derritiéndose es excelente).
- ✗ Los bloques se congelan antes de cortarlos. Esto a veces hace que los bloques se agrieten.



Esta cara del bloque se ha agrietado porque se congeló a  $-15^{\circ}\text{C}$  en un congelador antes del corte. Las grietas pueden dificultar el corte y la flotación porque la parafina ya no está unida al tejido.

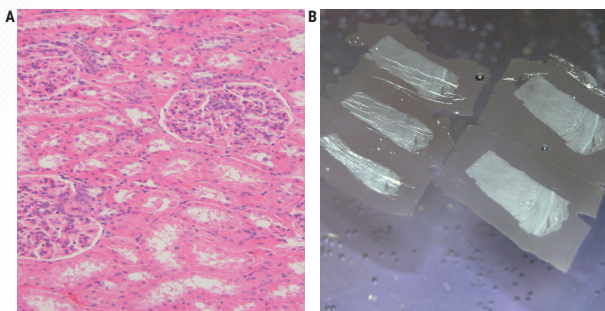


# Paso 35

## Usar bloques fríos

✓ Los bloques siempre están fríos cuando se cortan.

✗ A veces hay un retraso antes de que las secciones finales se corten de un bloque. El bloque puede estar caliente y esto puede provocar una compresión excesiva de las secciones.



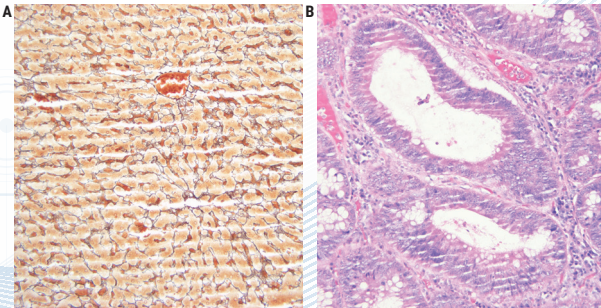
- A La distorsión de los glomerulos en esta sección de un riñón se debe a una compresión excesiva cuando se corta la sección (H&E).
- B Secciones del mismo bloque sometidas a flotación. Las secciones de la izquierda se cortaron sin enfriar el bloque, mientras que las de la derecha se cortaron cuando el bloque estaba frío.

# Paso 36

## Cortar las secciones lentamente

✓ Las secciones finales de cada bloque se cortan con cuidado con un giro uniforme y lento.

✗ Las secciones se cortan lo más rápido posible con un giro rápido, creyendo que "se superará cualquier compresión de sección en el baño de flotación".



- A Hígado de roedor (tinción con reticulina) que muestra una fina rugosidad debido al corte demasiado rápido de un bloque frío de tejido quebradizo. En este caso, el problema se superó dejando que el bloque se calentara ligeramente y, a continuación, cortando muy lentamente. También puede producirse rugosidad si el bloque de parafina o la cuchilla no están bien sujetos en el microtomo.
- B Esta sección teñida con H&E de tejido mucoso muestra una fina rugosidad debido al corte muy rápido de un bloque muy frío.



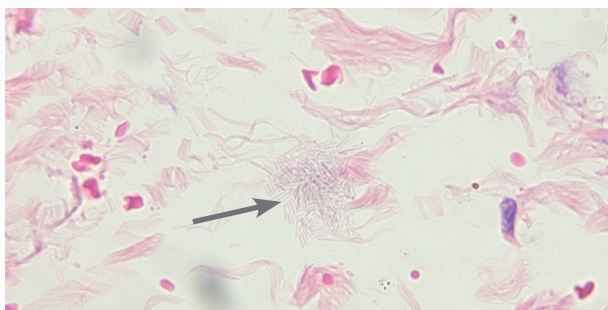
- Paso 37 Usar agua limpia
- Paso 38 Asegurarse de que las preparaciones estén limpias
- Paso 39 Evitar la contaminación cruzada
- Paso 40 Evitar la contaminación con escamas
- Paso 41 No flotar entre varios bloques
- Paso 42 Comprobar la temperatura del agua
- Paso 43 Evitar las arrugas en las secciones
- Paso 44 Evitar la expansión excesiva de las secciones
  
- Paso 45 No dañar las secciones flotantes
- Paso 46 Elegir secciones con cuidado
- Paso 47 Evitar burbujas bajo las secciones
- Paso 48 Evitar que la sección se levante



# Paso 37

## Usar agua limpia

- ✓ El agua del baño de flotación se sustituye periódicamente.
- ✗ El agua del baño de flotación se rellena periódicamente, pero se sustituye solo ocasionalmente. Cualquier contaminante que haya en el baño puede acabar en la preparación debajo de la sección (hongos, moho, etc.).



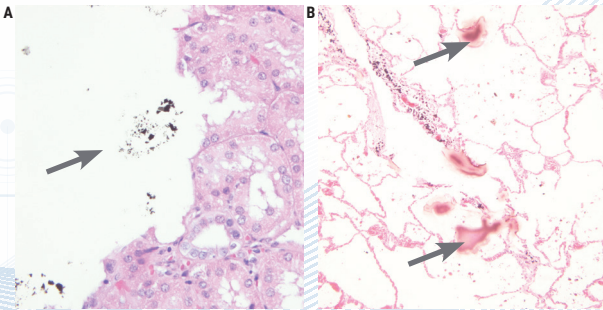
Sección de serosa del tubo digestivo (H&E). Hay grupos de microorganismos débilmente teñidos presentes en el tejido, pero también pueden verse en la preparación, fuera de la sección. La fuente probable de estos organismos contaminantes fue el baño de flotación.

Flotación

# Paso 38

## Asegurarse de que las preparaciones estén limpias

- ✓ Siempre se comprueba la limpieza de las preparaciones antes de utilizarlas. La manipulación de las preparaciones es mínima para evitar la contaminación con células escamosas antes de la flotación.
- ✗ No se comprueba la limpieza de las preparaciones: "Siempre que las secciones permanezcan en la preparación durante la tinción, consideramos que son satisfactorias". El polvo, los organismos y otros contaminantes pueden estropear una preparación que de otro modo sería buena.



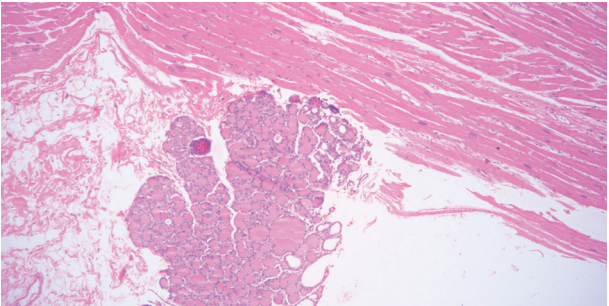
- A Esta sección del riñón está estropeada por un contaminante negro que estaba presente en la preparación antes de su uso. El depósito podría verse debajo de la sección en otras partes de la preparación.
- B Una sección de pulmón que contiene "grupos" adhesivos teñidos que se han formado cuando la sección se secó. El adhesivo (probablemente a base de gelatina) estaba presente en el baño de flotación. El contenido proteico del adhesivo se ha concentrado a medida que el agua se ha evaporado. El drenaje adecuado de la sección antes del secado podría haber evitado el problema.

Flotación

# Paso 39

## Evitar la contaminación cruzada

- ✓ Siempre se quita la espuma de la superficie del agua entre las muestras para evitar la contaminación de una sección con células de otra.
- ✗ No se quita la espuma de la superficie del agua entre cada bloque. Esto puede provocar contaminación de muestra a muestra, lo que puede causar confusión e incluso un diagnóstico inexacto.



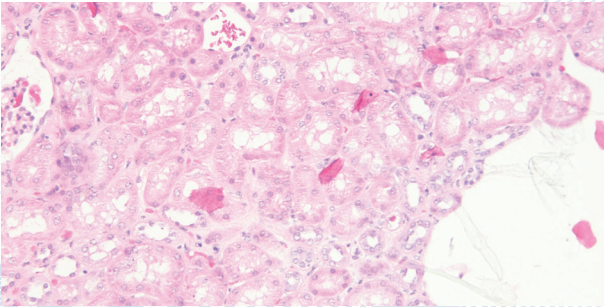
Una sección de músculo cardíaco se ha contaminado con un fragmento de tiroides de otro caso. Este ejemplo de transferencia de muestra a muestra se produjo en el baño de flotación.

Flotación

# Paso 40

## Evitar la contaminación con escamas

- ✓ Se debe tener cuidado de no cepillar el pelo o las manos mientras hay secciones flotando (las escamas pueden contaminar las secciones).
- ✗ "Algunos de nuestros empleados producen preparaciones que contienen muchas escamas. Parecen no saber que esto se puede evitar".



Sección de riñón que contiene muchas escamas extrañas que se depositaron en la superficie de la sección mientras estaba en el baño de flotación. Se adhieren firmemente y posteriormente se tiñen con eosina.

Flotación



# Paso 41

## No flotar entre varios bloques

✓ Las secciones de más de un bloque (estuche) nunca se ponen a flotar simultáneamente en el baño de agua.

✗ A veces, las secciones de dos o más bloques (estuches) se dejan flotando simultáneamente. Se trata de una práctica peligrosa que puede dar lugar a una identificación inexacta de las muestras. Existe un riesgo concreto cuando las secciones proceden del mismo tipo de muestra.



Aquí las secciones de dos estuches diferentes se encuentran flotando simultáneamente. Esta práctica puede provocar confusión y dar lugar a una identificación inexacta de las secciones.

Flotación

# Paso 42

## Comprobar la temperatura del agua

- ✓ La temperatura del baño de flotación se comprueba cuidadosamente. Una temperatura de 4-5 °C por debajo del punto de fusión de la parafina es óptima. Las secciones deben aplanarse rápidamente, pero la parafina no debe fundirse.
- ✗ Si las secciones se dejan en el baño de flotación durante más de 15 segundos, la parafina se funde. Aunque parezca que esto hace que el proceso sea más rápido, puede provocar rápidamente una expansión excesiva y daño celular y en el tejido.

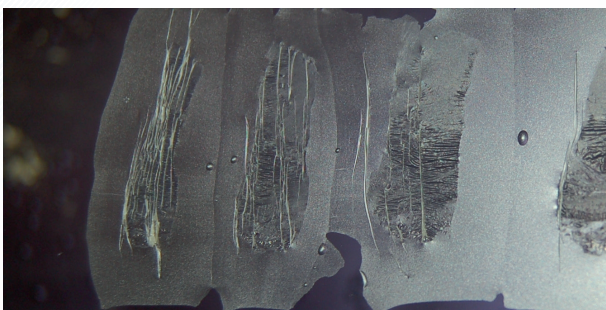


Estas secciones de la piel muestran claramente grietas y una separación excesiva de las capas, los efectos típicos de la expansión excesiva. El tejido mal procesado es muy propenso a este problema.

# Paso 43

## Evitar las arrugas en las secciones

- ✓ Las secciones se aplanan rápidamente en el baño de flotación.
- ✗ Las secciones nunca se aplanan bastante en el baño de flotación. El baño puede estar demasiado frío y las secciones pueden permanecer arrugadas cuando se recogen en la preparación.



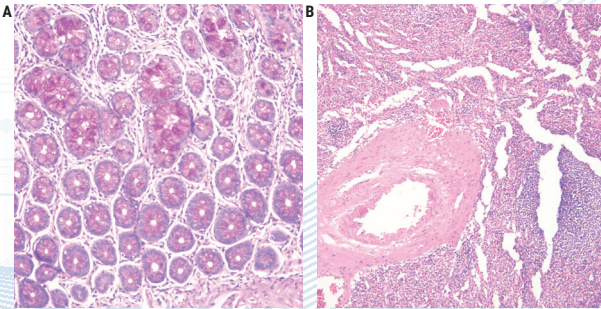
En este caso, la flotación no ha superado las arrugas producidas durante el corte de estas secciones. Una mejor técnica de corte y un agua ligeramente más caliente superarían este problema.

Flotación

# Paso 44

## Evitar la expansión excesiva de las secciones

- ✓ Las secciones se dejan en el baño de flotación durante el tiempo suficiente para que se aplanen y, a continuación, se recogen rápidamente en una preparación.
- ✗ Por comodidad, algunas secciones se dejan durante largos períodos en el baño de flotación. Esto puede provocar una expansión excesiva y daño en el tejido (especialmente en muestras delicadas como el tejido linfoide).



- A Una sección de mucosa intestinal teñida con PAS muestra una lámina propia expandida en exceso (muestra una separación excesiva de las glándulas intestinales). En este caso, la sección estuvo flotando demasiado tiempo en un baño que estaba demasiado caliente.
- B Sección de tejido linfoide que se ha agrietado debido a la expansión excesiva en el baño de flotación. Los tejidos linfoides y hematopoyéticos son especialmente propensos a sufrir daños de esta manera.

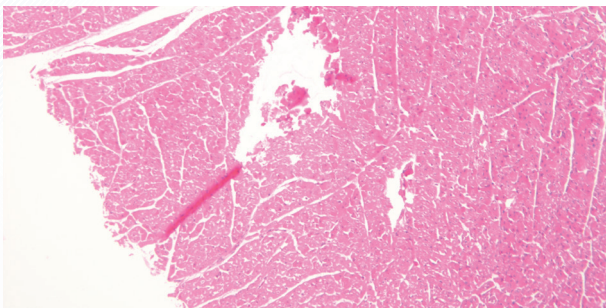
Flotación

# Paso 45

## No dañar las secciones flotantes

✓ Al eliminar mecánicamente las arrugas con un cepillo o unas pinzas, se tiene mucho cuidado para evitar dañar las secciones flotantes.

✗ Las arrugas se eliminan enérgicamente de las secciones flotantes con un cepillo o unas pinzas. Este procedimiento puede provocar fácilmente daños macroscópicos y microscópicos.



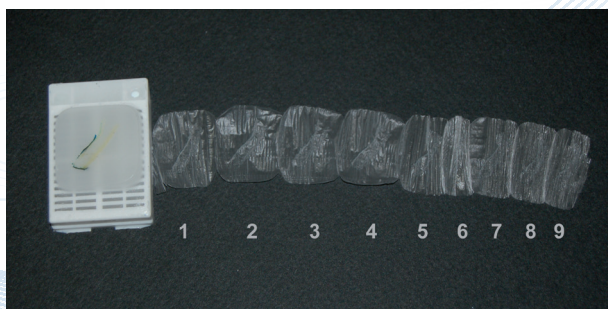
Una sección de músculo cardíaco muestra daño mecánico (ranurado), provocado al intentar eliminar un pliegue en la sección (corazón, H&E).

Flotación

# Paso 46

## Elegir secciones con cuidado

- ✓ La primera o dos primeras secciones de una cinta nunca se recogen en las preparaciones.
- ✗ Se seleccionan la primera y segunda secciones de una cinta para el montaje porque tienen mejor aspecto que las secciones posteriores. Tienen mejor aspecto porque son siempre más gruesas debido a la expansión del bloque frío durante el primer par de pasadas a través de la cuchilla.



Las secciones de la cinta preparadas a partir de este bloque están numeradas en el orden en que se cortaron. Tenga en cuenta que el primer par de secciones son más anchas (menos comprimidas), pero a medida que el bloque se calienta, las secciones se estrechan (más comprimidas). Aunque el microtomo se ajustó en  $3\ \mu\text{m}$ , el primer par de secciones tendría un grosor de  $4\text{-}5\ \mu\text{m}$  debido a la dilatación por calor.

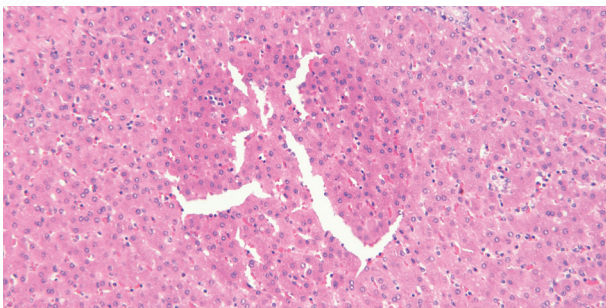
Flotación



# Paso 47

## Evitar burbujas bajo las secciones

- ✓ Se debe tener cuidado para evitar la formación de burbujas de aire en el baño de flotación. Las burbujas visibles se quitan antes de que las secciones se depositen en el agua.
- ✗ Se ignoran las pequeñas burbujas de aire en el baño de flotación. Las burbujas que quedan atrapadas debajo de la sección aparentemente desaparecen a medida que la sección se seca. Aunque las burbujas aparentemente pueden desaparecer, las zonas de la sección por encima de la burbuja a menudo se distorsionan y es probable que dejen de flotar durante la tinción.



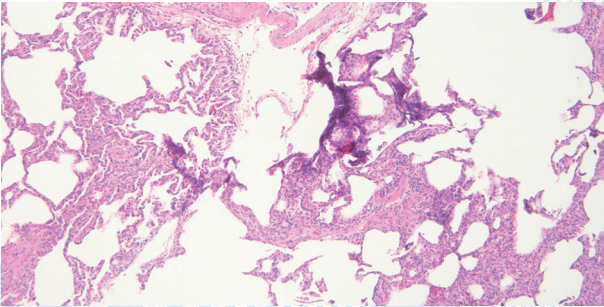
Sección del hígado teñida con H&E, que muestra una zona circular agrietada en la que la sección se ha levantado. La causa fue una burbuja que se alojaba debajo de la sección durante la flotación y que evitó el aplanado y la adherencia adecuados.

Flotación

# Paso 48

## Evitar que la sección se levante

- ✓ Se considera el uso de preparaciones “adhesivas” (cargadas) o adhesivos de sección, como AAS, y se utiliza de forma adecuada.
- ✗ A veces, las secciones dejan de flotar durante la tinción (especialmente durante la recuperación de antígenos para IHC o cuando los métodos requieren el uso de calor). En estas circunstancias, se requieren preparaciones cargadas o adhesivos de sección.



Esta preparación muestra una zona en la que la sección se ha levantado y se ha depositado en el tejido adyacente (pulmón, H&E).

Flotación





- Paso 49    Drenar antes de secar
- Paso 50    Supervisar la temperatura de secado
- Paso 51    Secar durante el tiempo adecuado

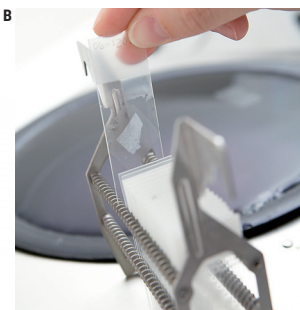
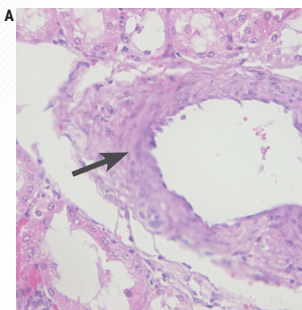


# Paso 49

## Drenar antes de secar

✓ Las secciones se drenan brevemente antes de colocarlas en el secador de preparaciones o en una placa calefactora.

✗ Las secciones no se drenan correctamente antes de secarse horizontalmente. Las secciones se mueven sobre la preparación y a veces no se secan en plano.



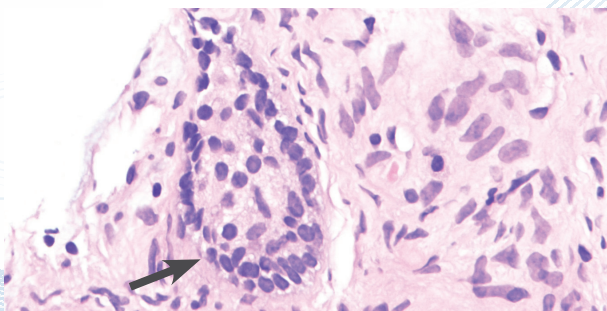
- A Esta sección se secó horizontalmente sin un drenaje preliminar eficaz. En consecuencia, hay una zona elevada desenfocada visible en el centro del campo.
- B Esta sección se acaba de recoger del baño de flotación y se drenará verticalmente durante un breve periodo antes de colocarla en el secador de preparaciones. Esto evitará el problema mostrado en A.

Secado de las secciones

# Paso 50

## Supervisar la temperatura de secado

- ✓ La temperatura del secador de preparaciones se supervisa minuciosamente.
- ✗ A veces, el secador de preparaciones está muy caliente. El calor excesivo puede producir puntos calientes en las secciones y provocar una tinción irregular.



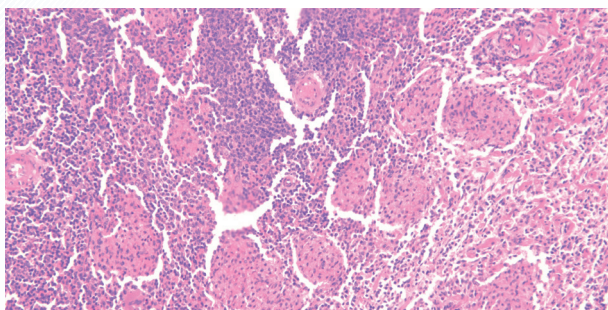
Esta sección de la próstata muestra las características de "fusión nuclear", siendo una posible causa el calor excesivo al secar las preparaciones. Un procesamiento defectuoso del tejido puede producir un efecto similar. La fusión nuclear se observa normalmente en el perímetro de las muestras y suele afectar al tejido epitelial. Los núcleos muestran una tinción irregular, que a veces aparecen rosados o muy azulados y carecen completamente de detalles.

## Secado de las secciones

# Paso 51

## Secar durante el tiempo adecuado

- ✓ Se supervisa el tiempo mínimo y máximo de secado de la preparación.
- ✗ Los tiempos de secado de las preparaciones varían considerablemente. El secado prolongado a temperaturas más altas puede ser perjudicial para las secciones.



Sección del ganglio linfático con H&E que muestra un amplio agrietamiento debido a un secado prolongado a una temperatura demasiado alta. Un agrietamiento como este también puede deberse a otros factores, incluido el procesamiento excesivo.

Secado de las secciones





- Paso 52 Usar un tiempo preciso
- Paso 53 Supervisar con regularidad la calidad
- Paso 54 Estandarizar las condiciones de tinción
- Paso 55 Garantizar una eliminación completa de la parafina
- Paso 56 Renovar los reactivos con regularidad
- Paso 57 Hidratar las secciones a fondo
- Paso 58 Supervisar la calidad de la hematoxilina
- Paso 59 Garantizar el “azulado” nuclear completo
- Paso 60 Evitar la tinción irregular con eosina
- Paso 61 Supervisar el pH de la eosina

Tinción rutinaria  
(H&E)



# Paso 52

## Usar un tiempo preciso

- ✓ Cada paso del protocolo de tinción se cronometra con precisión.
- ✗ Los tiempos de los pasos de la tinción son aproximados y, "si tenemos prisa", se saltan algunos pasos. Esto puede producir resultados incoherentes.



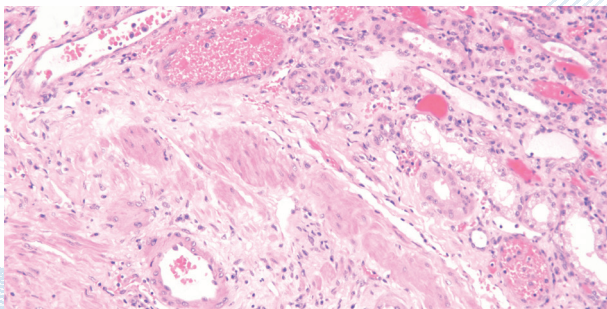
Estas secciones se cortaron del mismo bloque con el mismo grosor y las tiñeron manualmente con H&E diferentes miembros del personal utilizando el que se suponía que era el mismo método. Incluso puede observarse macroscópicamente la irregularidad de la tinción.

Tinción rutinaria (H&E)

# Paso 53

## Supervisar con regularidad la calidad

- ✓ Se tiñen con regularidad preparaciones de control para supervisar la calidad de la tinción.
- ✗ Nunca se utilizan preparaciones de control para tinciones con H&E. Esto puede dificultar mucho la determinación de si un problema de tinción se debe a reactivos de mala calidad, a un protocolo inadecuado o a una mala fijación.



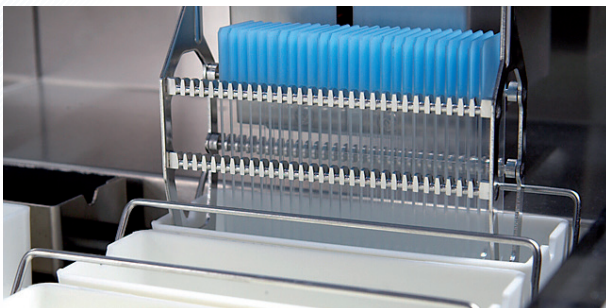
Esta sección del riñón incluye diversos elementos de tejido eosinofílicos y núcleos bien conservados que permiten una evaluación fiable de la calidad de la tinción con H&E. La placenta es otro tipo de muestra que puede utilizarse como control útil.

## Tinción rutinaria (H&E)

# Paso 54

## Estandarizar las condiciones de tinción

- ✓ Los tiempos de agitación, lavado y drenaje se optimizan para todos los pasos durante la tinción.
- ✗ Los tiempos de agitación, lavado y drenaje son incoherentes. Los disolventes y los reactivos se contaminan rápidamente. La tinción se vuelve incoherente.



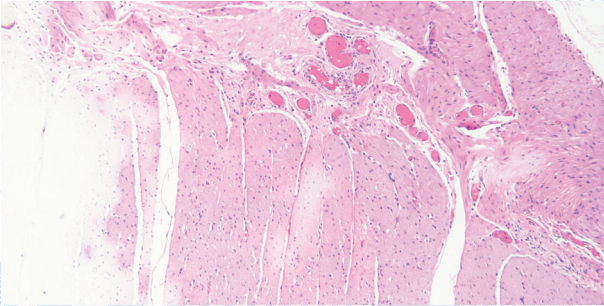
Una de las ventajas de utilizar un instrumento de tinción automático es que los tiempos de agitación, lavado y drenaje son constantes. Si se controlan adecuadamente otras variables, se garantizan resultados buenos y coherentes.

Tinción rutinaria (H&E)

# Paso 55

## Garantizar una eliminación completa de la parafina

- ✓ Se optimiza la eliminación de parafina de las preparaciones.
- ✗ La eliminación de parafina de las preparaciones a veces es incompleta y las preparaciones contienen parches de parafina residual. Esto produce zonas sin tinción o con tinción irregular en las secciones.



Esta sección teñida con H&E muestra una gran zona sin tinción a la izquierda y varias zonas más pequeñas que están parcialmente teñidas o sin tinción. Esto se debe a la eliminación incompleta de la parafina antes de la tinción.

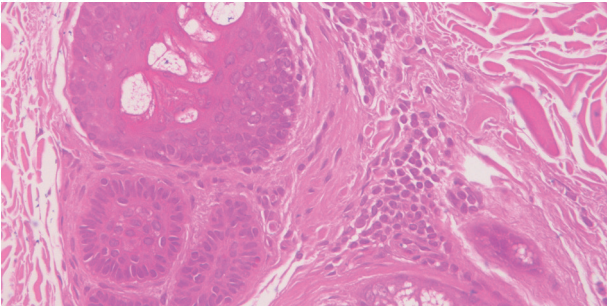
Tinción rutinaria (H&E)

# Paso 56

## Renovar los reactivos con regularidad

✓ Los disolventes y los reactivos de tinción se sustituyen regularmente en función del número de preparaciones teñidas o de bastidores procesados.

✗ La sustitución de los disolventes y los reactivos de tinción es aleatorio. No se sustituyen hasta que la calidad de la tinción disminuye.



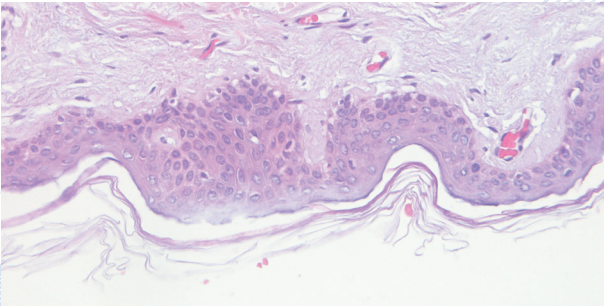
Esta sección muestra una tinción con hematoxilina turbia y de mala calidad. Este reactivo debe sustituirse inmediatamente.

Tinción rutinaria (H&E)

# Paso 57

## Hidratar las secciones a fondo

- ✓ Las preparaciones se hidratan a fondo antes de la tinción con hematoxilina.
- ✗ La solución de hematoxilina se contamina rápidamente con alcohol y a veces con xileno. Esto provoca una tinción irregular.



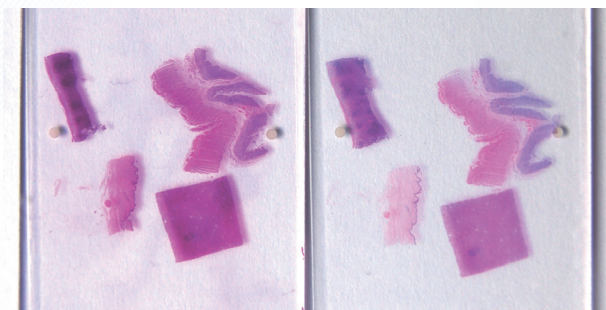
La tinción irregular con hematoxilina visible en la epidermis en esta sección de piel fue provocada por xileno residual (y restos de parafina) presentes cuando se aplicó la hematoxilina.

Tinción rutinaria (H&E)

# Paso 58

## Supervisar la calidad de la hematoxilina

- ✓ El rendimiento de las soluciones de hematoxilina se supervisa minuciosamente. Durante su vida útil, las soluciones de hematoxilina se diluyen progresivamente por el arrastre de preparaciones y bastidores y también se ven afectadas por la oxidación continua.
- ✗ La tinción con hematoxilina es variable de un día a otro y no se intenta entender por qué. Por ejemplo, la zona de la superficie del baño de tinción, el grado de aireación durante la tinción y la temperatura ambiente pueden afectar a la velocidad de oxidación.



Se muestran dos preparaciones del mismo bloque de control. Se tiñeron con H&E utilizando protocolos idénticos en una estación de tinción automática, pero con un intervalo de siete días entre ciclos. Incluso macroscópicamente, la variación en el nivel de tinción es obvia.

Tinción rutinaria (H&E)

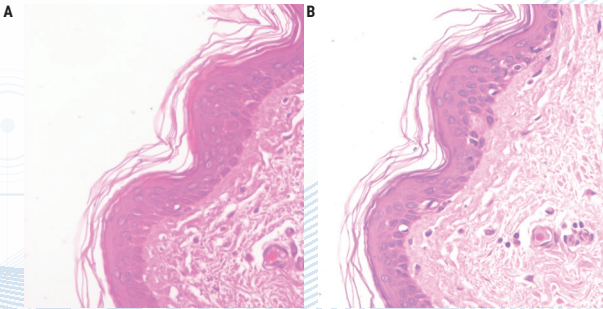


# Paso 59

## Garantizar el “azulado” nuclear completo

✓ Después de la tinción con hematoxilina, siempre se realiza un “azulado” profundo de los núcleos con el sustituto de agua corriente alcalina de Scott o agua amoniacal. Este requisito se ve influido por el pH neutro del agua corriente local.

✗ A veces, los núcleos aparecen rosáceos en secciones completadas debido al “azulado” incompleto en el agua corriente alcalina después de la tinción con hematoxilina. Los núcleos que están subteñidos con hematoxilina (o sobrediferenciados) y sobreteñidos con eosina también aparecen de color rosa.



A En esta sección, los núcleos epidérmicos están mal definidos y son de color rosáceo. Esta sección no se ha “azulado” correctamente en agua alcalina después de la tinción con hematoxilina (piel, H&E).

B Se muestra otra sección que se “azuló” correctamente después de la tinción nuclear. Aquí los núcleos están mucho mejor definidos (piel, H&E).

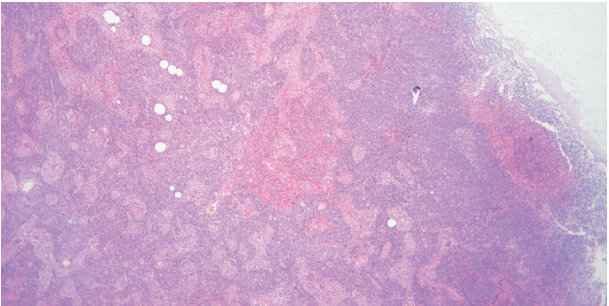
## Tinción rutinaria (H&E)



# Paso 60

## Evitar la tinción irregular con eosina

- ✓ El "azulado" va seguido de un lavado muy a fondo con agua corriente para eliminar los álcalis residuales que pueden impedir la tinción con eosina y provocar una tinción débil e irregular.
- ✗ El lavado ineficaz después del "azulado" (que deja álcalis residuales) hace que la tinción con eosina sea débil e irregular.



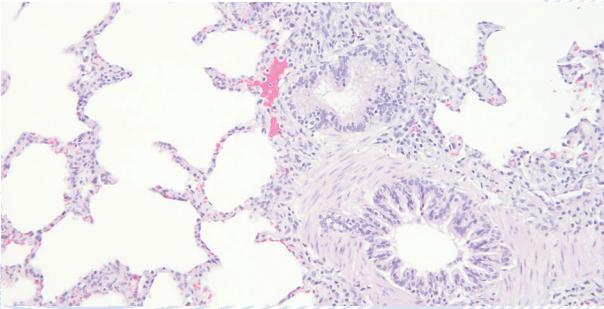
Esta sección demuestra el efecto de los álcalis residuales en la tinción con eosina. Observe la naturaleza irregular de la tinción (bazo, H&E).

Tinción rutinaria (H&E)

# Paso 61

## Supervisar el pH de la eosina

- ✓ Se supervisa el pH de la solución de eosina. Se mantiene cerca de un pH de 5.0 para mantener una tinción óptima. Se puede añadir un par de gotas de ácido acético como medio cómodo para reducir el pH.
- ✗ No se intenta supervisar el pH de la eosina. Cuando disminuye la intensidad de la tinción, se sustituye la solución (el arrastre de agua corriente alcalina puede hacer que el pH de las soluciones de eosina aumente).



Sección de pulmón teñida con H&E. La tinción con eosina es uniformemente muy débil y bastante inaceptable. Tenga en cuenta que los únicos componentes teñidos con eosina son los glóbulos rojos.

Tinción rutinaria (H&E)



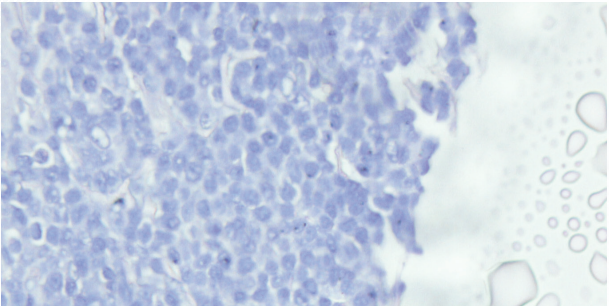
- Paso 62    Deshidratar completamente antes de la limpieza y la cubrición
- Paso 63    Evitar el secado y la formación de cristales

Cubrición

# Paso 62

## Deshidratar completamente antes de la limpieza y la cubrición

- ✓ Las secciones se deshidratan completamente antes de colocarlas en xileno para su limpieza.
- ✗ Las secciones a veces pasan rápidamente por alcohol hasta xileno. La limpieza en xileno contaminado con agua puede provocar la presencia de pequeñas gotas de agua en el tejido que se ven microscópicamente como zonas opacas sin detalles.



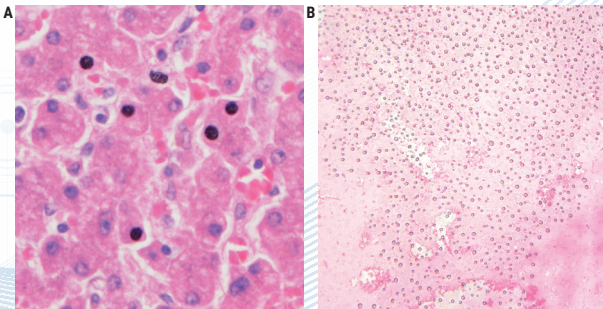
Esta sección carece de claridad (parece opaca a simple vista). Un análisis minucioso revela la presencia de pequeñas gotas de agua.

Cubrición

# Paso 63

## Evitar el secado y la formación de cristales

- ✓ El cubreobjetos siempre se aplica antes de que la sección pueda secarse y se utiliza un medio de montaje de alta calidad. Las propiedades de almacenamiento a largo plazo del medio de montaje deben conocerse porque pueden aparecer cristales en un medio de montaje de baja calidad, a veces después de un largo periodo (meses o años).
- ✗ Se permite que las secciones se sequen parcialmente antes de aplicar el cubreobjetos, lo que hace que algunos núcleos aparezcan negros. El medio de montaje elegido basándose únicamente en el precio puede desarrollar cristales durante el almacenamiento a largo plazo y los cubreobjetos pueden levantarse.



- A Esta sección se dejó secar parcialmente antes de la cubrición. Esto ha provocado que queden atrapadas diminutas burbujas de aire sobre algunos núcleos, haciendo que aparezcan negros (a veces denominados "copos").
- B Sección con cubreobjetos teñida con H&E que muestra una multitud de esferocristales refractarios que se desarrollaron a partir de un medio de montaje de mala calidad en los seis meses siguientes al montaje.

Cubrición



- Paso 64 Comprender la tinción
- Paso 65 Usar un control positivo
- Paso 66 Usar un tiempo preciso
- Paso 67 Considerar la estabilidad de los reactivos
- Paso 68 Almacenar los reactivos correctamente
- Paso 69 Respetar al método
- Paso 70 Registrar cualquier cambio
- Paso 71 Estandarizar los pasos de lavado
- Paso 72 Preparar el microscopio cuidadosamente

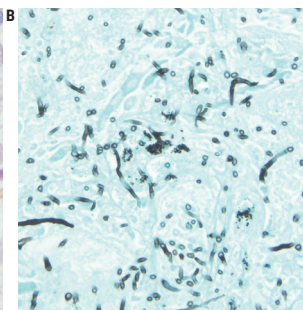
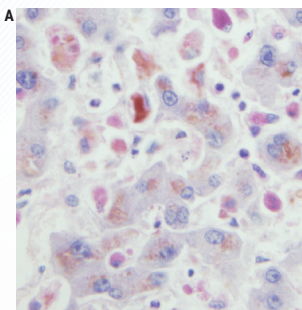
Tinciones especiales



# Paso 64

## Comprender la tinción

- ✓ Sepa qué está intentando demostrar con la tinción que está realizando.
- ✗ El simple hecho de “seguir el método” y no saber realmente lo que se debe ver en la sección terminada dará lugar a malos resultados.



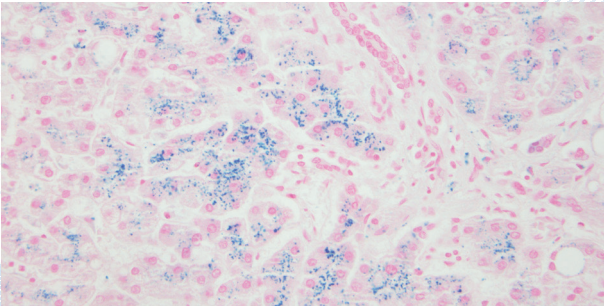
- A Sección de hígado teñida con PAS. La lipofuscina y el glucógeno son positivos para PAS, mientras que los restos de bilis y hemosiderina son negativos para PAS y aparecen con sus colores naturales (amarillo y marrón, respectivamente).
- B Esta sección muestra una infección micótica oportunista en el pulmón (*Aspergillus*) teñida con el método de Grocott-Gomori. Las hifas micóticas son negras, al igual que el carbono sin tinción, una característica común en los pulmones de los fumadores y la mayoría de los habitantes de ciudades.

Tinciones especiales

# Paso 65

## Usar un control positivo

- ✓ Utilice siempre una preparación de control que contenga la estructura/sustancia que está intentando demostrar.
- ✗ “Si la estructura/sustancia para la que estamos tiñendo no es visible en una preparación, suponemos que no está presente”.



Sección de hígado cirrótico teñida con el método de Perl para demostrar hemosiderina con hierro (azul). Esto constituiría un bloque de control satisfactorio para las tinciones de hierro.

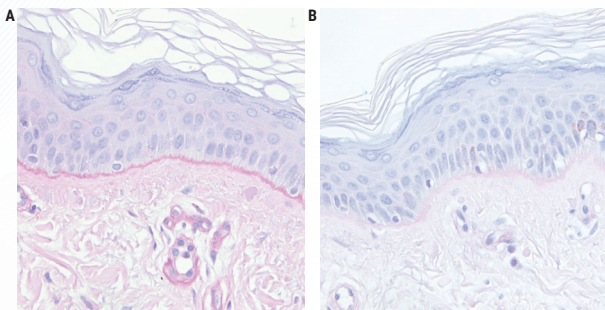
## Tinciones especiales

# Paso 66

## Usar un tiempo preciso

✓ Use un tiempo preciso.

✗ El tiempo siempre es aproximado. El tiempo inexacto produce resultados incoherentes.



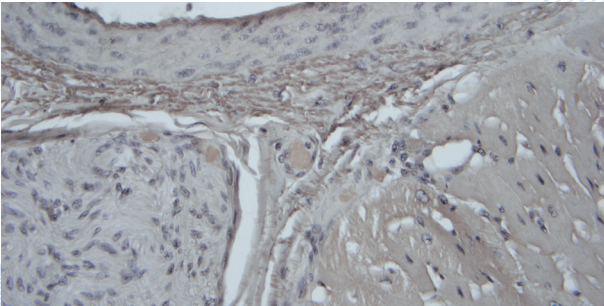
Estas dos secciones de piel del mismo bloque se han teñido con el método PAS. La sección A se trató con ácido peryódico (paso de oxidación) durante 5 minutos, mientras que la sección B solo estuvo 30 segundos (un error). Observe que la membrana basal está muy mal teñida en la sección B como consecuencia.

## Tinciones especiales

# Paso 67

## Considerar la estabilidad de los reactivos

- ✓ Tenga en cuenta la vida útil de los reactivos que está utilizando. Algunos reactivos o soluciones de tinte se deterioran lentamente, mientras que otros son muy inestables y deben prepararse frescos y utilizarse inmediatamente. Hay que dejar que otros se oxiden (maduren) durante algún tiempo antes de poder usarlos.
- ✗ Asumimos que todos los reactivos pueden utilizarse durante un periodo indefinido.



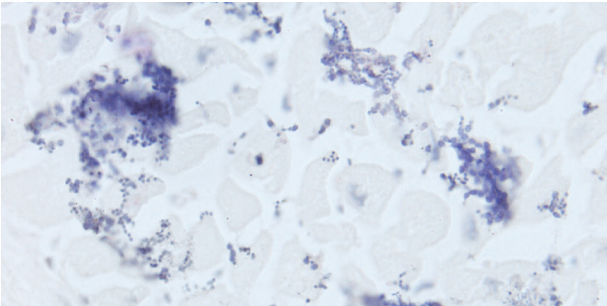
Hematoxilina de Weigert turbia debido a la oxidación excesiva. Observe la tinción marrón del colágeno.

# Paso 68

## Almacenar los reactivos correctamente

✓ Almacene los reactivos correctamente. Algunos requieren refrigeración porque tienden a soportar el crecimiento de hongos o moho. Otros son sensibles a la luz y requieren un almacenamiento en la oscuridad.

✗ “Todos nuestros reactivos se almacenan en el estante por encima de la mesa de tinción. A veces vemos organismos extraviados en nuestras secciones”.



Esta sección muestra grandes depósitos de microorganismos ajenos que han crecido en la solución de tinción (en este caso, hematoxilina) y, a continuación, se han depositado en la parte superior de la sección.

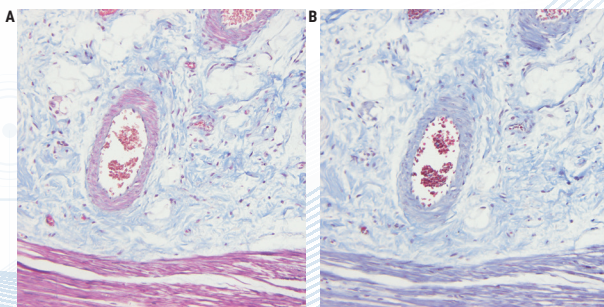
## Tinciones especiales

# Paso 69

## Adherirse al método

✓ Siga exactamente el protocolo.

✗ Los miembros del personal obtienen resultados diferentes cuando se supone que utilizan el mismo protocolo.



Estas secciones de submucosa fijada en formol se han teñido con tinción de tricromo Masson. La sección A muestra el músculo liso rojo. En este caso, la tinción se realizó correctamente siguiendo el protocolo del laboratorio e incluyendo un paso de ácido crómico preliminar (sensibilización o mordiente secundario). Este paso se pasó por alto cuando se tiñó la sección B. Observe la falta de coloración diferencial del músculo en la sección B (intestino).

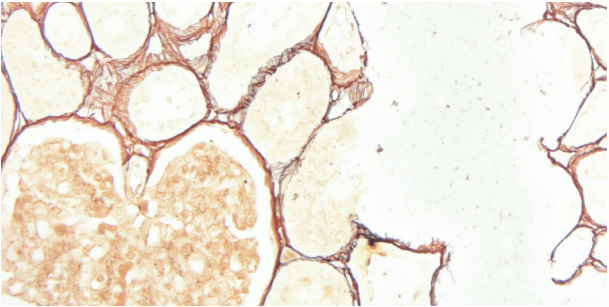
## Tinciones especiales

# Paso 70

## Registrar cualquier cambio

✓ Documente cualquier desviación del método que esté utilizando.

✗ A veces, cuando los resultados son malos, es difícil o imposible averiguar por qué no se han registrado los cambios en el protocolo.



En esta tinción de impregnación argéntica para reticulina, las fibras no están bien demostradas y hay escoria de fondo (precipitado) en la preparación. Es muy difícil determinar la causa de dicho problema si el método no se ha seguido exactamente (método de Gordon y Sweets, riñón).

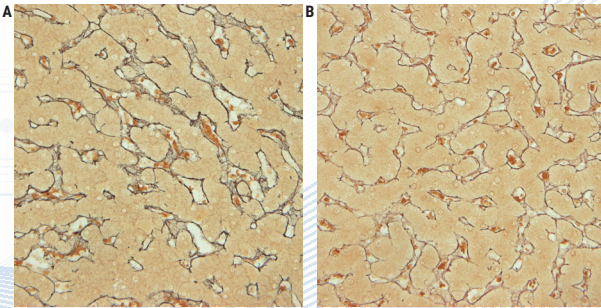
Tinciones especiales



# Paso 71

## Estandarizar los pasos de lavado

- ✓ Tenga especial cuidado con los pasos de lavado. Estandarícelos tanto como sea posible, ya que son con frecuencia la causa de resultados variables.
- ✗ Los miembros del personal del laboratorio utilizan diferentes técnicas de lavado: algunos utilizan una agitación energética, otros son mucho más suaves.



Estas secciones de hígado se tiñeron con el mismo método. La única diferencia entre ellas fue la técnica mediante la cual se enjuagaron entre la impregnación y la reducción. Las fibras de reticulina son negras y están mejor definidas en la sección A (método de Gordon y Sweets).

## Tinciones especiales

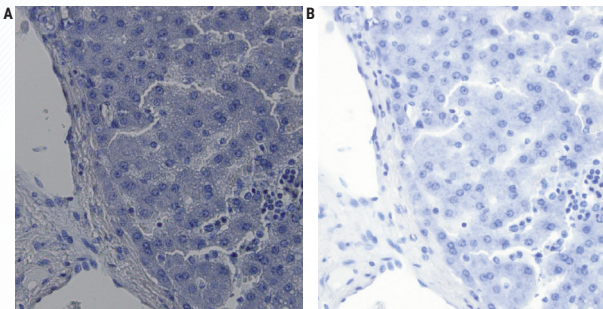


# Paso 72

## Preparar el microscopio cuidadosamente

✓ Utilice el control microscópico en etapas cruciales, como los pasos de diferenciación. Tenga en cuenta el efecto de la configuración del microscopio sobre el aspecto de las secciones sin cubreobjetos (húmedas); puede producir el aspecto de una tinción de fondo falsa.

✗ Para todos los métodos, el nivel de tinción se evalúa mirando la preparación a simple vista.



- A. Sección húmeda (sin cubreobjetos) vista bajo un microscopio con diafragma de condensador cerrado. Observe el fondo falso.
- B. Sección húmeda (sin cubreobjetos) vista bajo un microscopio con diafragma de condensador abierto. Observe el fondo claro.

Tinciones especiales





- Paso 73 Usar secciones de alta calidad
- Paso 74 Garantizar una fijación óptima
- Paso 75 Evitar problemas de adherencia de la sección
- Paso 76 Optimizar la eliminación de parafina y la aplicación de reactivos
- Paso 77 Evitar gradientes de concentración
- Paso 78 Elegir el anticuerpo con cuidado
- Paso 79 Leer las hojas de especificaciones
- Paso 80 Optimizar los métodos de recuperación
- Paso 81 Considerar la reactividad cruzada de anticuerpos
- Paso 82 Bloquear la peroxidasa endógena
- Paso 83 Evitar la tinción de fondo
- Paso 84 Usar un sistema de detección adecuado
- Paso 85 Estandarizar los pasos de lavado
- Paso 86 Optimizar la contratinción
- Paso 87 Usar controles adecuados
- Paso 88 Evaluar los resultados con atención

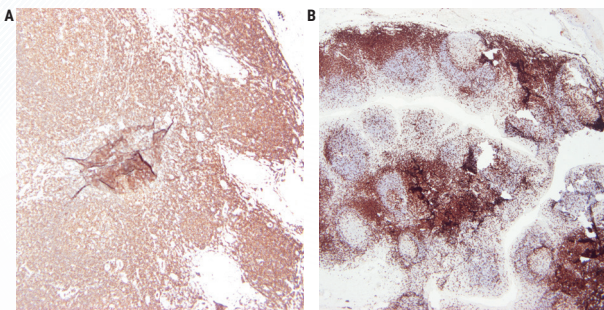


# Paso 73

## Usar secciones de alta calidad

✓ Tenga especial cuidado de utilizar secciones finas y planas que se hayan secado por completo sobre la preparación. Utilice preferiblemente preparaciones cargadas o preparaciones recubiertas con APES para IHC.

✗ Las secciones irregulares y mal adheridas se tiñen de forma irregular con tinción de fondo variable.

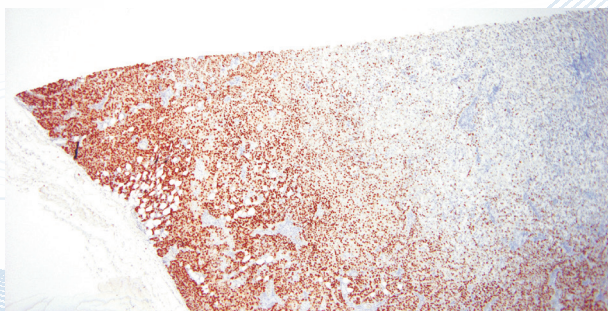


- A Una burbuja debajo de la sección (del montaje) ha dado lugar a un desprendimiento posterior de la sección durante la tinción (amígdala, CD45).
- B Una sección de mala calidad, que no se ha aplanado y secado correctamente antes de la tinción, se ha levantado, haciendo que la preparación no sea satisfactoria (amígdala, CD3).

# Paso 74

## Garantizar una fijación óptima

- ✓ La buena calidad de la fijación con condiciones de fijación conocidas y constantes (tipo de fijador, pH, temperatura, tiempo) produce los mejores resultados. Se deben comprobar las muestras antes del procesamiento para determinar si es necesaria una fijación adicional.
- ✗ Las condiciones de fijación inconstantes, que producen tejidos infrajados o sobrefijados, producen resultados variables y dificultan la resolución de problemas.



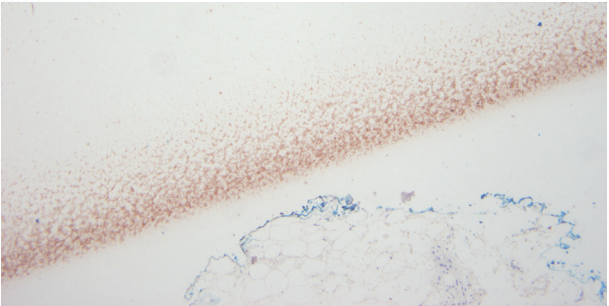
La fijación irregular (fijación zonal) ha provocado una tinción irregular en esta sección (tumor mamario, ER).

# Paso 75

## Evitar problemas de adherencia de la sección

✓ Evite el uso de adhesivos de sección a base de proteínas en el baño de flotación (pegamento, almidón o gelatina), especialmente en preparaciones cargadas.

✗ Los adhesivos a base de proteínas pueden bloquear la superficie de la preparación cargada. Esto provoca una adherencia incoherente y provoca una tinción irregular debido a la agrupación de reactivos para IHC por debajo de las secciones levantadas.



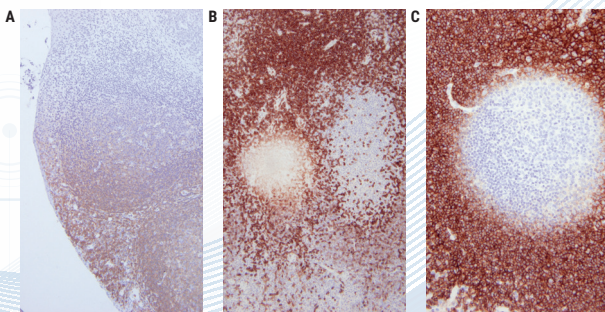
Se ha teñido una línea de adhesivo de sección gruesa a base de proteínas adyacente a la sección (mama, PR).

# Paso 76

## Optimizar la eliminación de parafina y la aplicación de reactivos

✓ Tenga especial cuidado con la eliminación de parafina y la hidratación de las secciones, así como con la distribución eficiente y uniforme de los reactivos en la superficie de la muestra. Esto garantiza una tinción uniforme y resultados coherentes.

✗ La eliminación incompleta de parafina o la distribución irregular de los reactivos en la superficie de la muestra puede producir zonas sin tinción o mal teñidas en las secciones.



A El mal flujo del reactivo ha producido una tinción irregular (amígdala, CD45).

B La parafina residual ha producido una zona sin tinción (amígdala, CD5).

C Una burbuja en el anticuerpo primario ha impedido la tinción uniforme (amígdala, CD20).

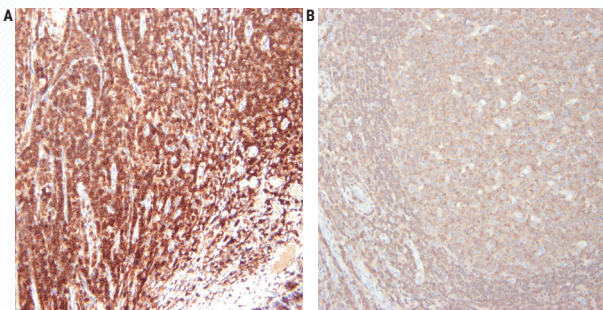


# Paso 77

## Evitar gradientes de concentración

✓ Los gradientes de concentración se evitan mediante la aplicación cuidadosa de los reactivos.

✗ “A veces vemos una tinción fuerte en un extremo de la preparación que progresa a una tinción débil en el otro”.



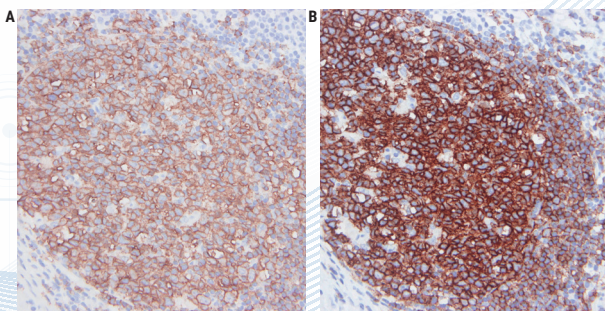
A y B son micrografías tomadas de extremos opuestos de la misma preparación. Un extremo de la preparación muestra una tinción fuerte (A), mientras que en el otro extremo (B) la tinción era muy débil. Este es un ejemplo extremo de un gradiente de concentración creado durante la tinción (amígdala, CD45).

# Paso 78

## Elegir el anticuerpo con cuidado

✓ Elija su anticuerpo primario con cuidado en relación con su sensibilidad y especificidad. Tenga en cuenta que los anticuerpos vendidos por diferentes proveedores suelen proceder de la misma fuente y se reenvasan/etiquetan para su venta. Es importante utilizar el nombre del clon al evaluar un anticuerpo.

✗ "Compramos nuestros anticuerpos solo en función del precio".



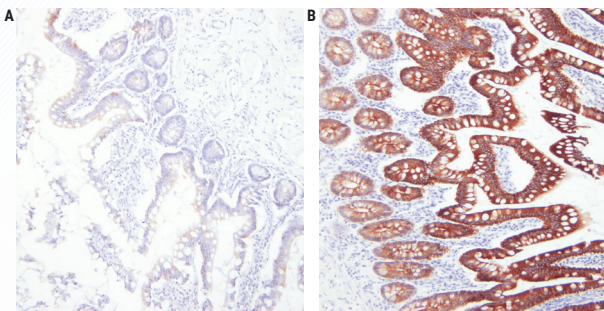
Estas secciones de amígdala humana del mismo bloque se han teñido con el marcador de linfocito B CD20 utilizando anticuerpos monoclonales primarios de diferentes fuentes (proveedores). En cada caso, se utilizó el tratamiento previo recomendado y la dilución optimizada. Hay una diferencia obvia en la calidad de los resultados logrados.

# Paso 79

## Leer las hojas de especificaciones

✓ Conozca su anticuerpo primario. Compruebe siempre la hoja de especificaciones para determinar la idoneidad de su método para un anticuerpo concreto. Las hojas de especificaciones deben actualizarse cuando se compra un nuevo lote de anticuerpos.

✗ "No tenemos acceso a las hojas de especificaciones de los anticuerpos de nuestro laboratorio".

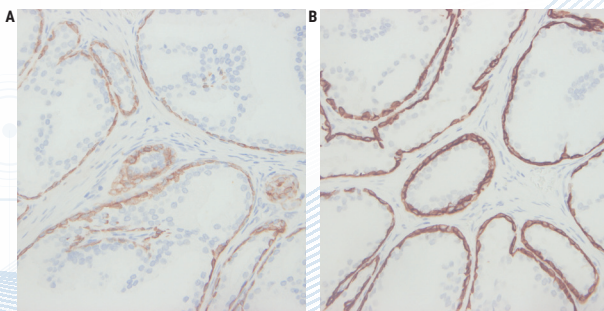


Estas secciones de intestino se han teñido para citoqueratina AE1/AE3. Se utilizaron diferentes condiciones de recuperación para cada sección. La sección A muestra una tinción débil inaceptable, mientras que la sección B muestra una tinción fuerte y precisa.

# Paso 80

## Optimizar los métodos de recuperación

- ✓ Elija las condiciones de desmascaramiento adecuadas para el anticuerpo primario utilizado, el tejido teñido y la fijación empleada (pH, reactivo, condiciones de reacción).
- ✗ Se utiliza la misma técnica de recuperación para todos los primarios suponiendo que existe un método de HIER universal satisfactorio.

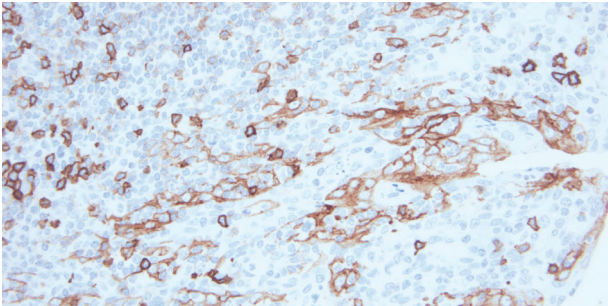


Secciones de próstata teñidas para citoqueratina 34βE12. La sección A muestra una tinción débil, mientras que la sección B es más fuerte y más nítida. La única diferencia entre las dos fue el método de recuperación utilizado.

# Paso 81

## Considerar la reactividad cruzada de anticuerpos

- ✓ Conozca cualquier posible problema con la reactividad cruzada de anticuerpos (lea la hoja de especificaciones).
- ✗ No se intenta explicar la tinción positiva inesperada.



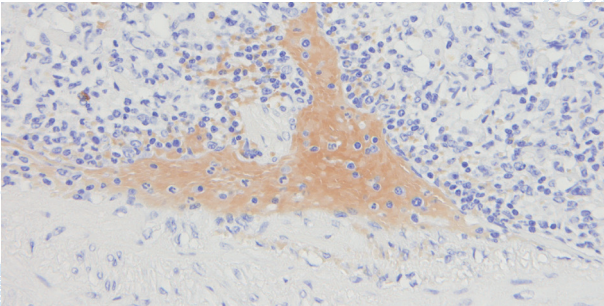
Amígdala palatina que muestra la base de una cripta amigdalina teñida para CD5, un marcador de linfocitos que tiñe principalmente los linfocitos T. Este clon concreto (4C7) reacciona de forma cruzada con las células epiteliales en el interior de la cripta.

# Paso 82

## Bloquear la peroxidasa endógena

✓ Para los sistemas de detección basados en la peroxidasa, utilice siempre un paso de bloqueo de la peroxidasa.

✗ Se suele observar una tinción inespecífica en eritrocitos, granulocitos, monocitos y en músculos. Esto se debe a una peroxidasa endógena bloqueada incompletamente.



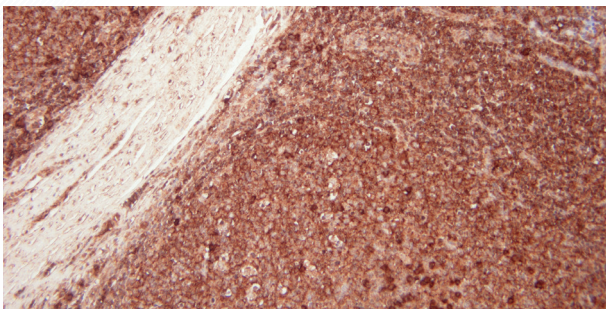
Bazo que muestra una tinción típica inespecífica de los eritrocitos debido al bloqueo incompleto de la peroxidasa endógena. Aquí la peroxidasa natural presente en los glóbulos rojos ha reaccionado con el cromógeno DAB.



# Paso 83

## Evitar la tinción de fondo

- ✓ Siempre se utiliza el bloqueo de proteína adecuado.
- ✗ La tinción de fondo generalizada se ve a veces debido a un bloqueo de proteína ineficaz.

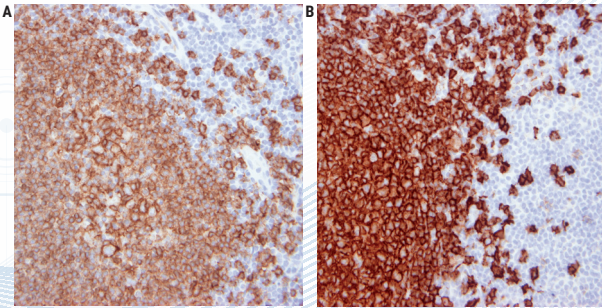


Amígdala normal teñida para la cadena ligera kappa que muestra una tinción de fondo intensa debido a un bloqueo de proteína ineficaz.

# Paso 84

## Usar un sistema de detección adecuado

- ✓ Elija un sistema de detección adecuado que proporcione una tinción precisa y específica con la sensibilidad adecuada.
- ✗ “Hemos estado utilizando el mismo sistema de detección durante mucho tiempo y no vemos ningún motivo para cambiar. A veces, nuestras tinciones son débiles y no tan nítidas como cabría esperar”.



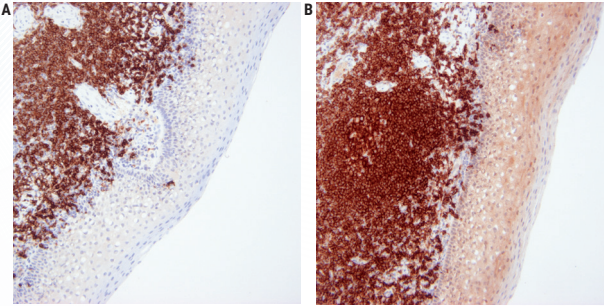
Las secciones A y B son de la misma muestra, pero se han teñido con diferentes sistemas de detección. Observe la diferencia en la intensidad y la precisión de las tinciones (amígdala, CD20).



# Paso 85

## Estandarizar los pasos de lavado

- ✓ Utilice pasos de lavado estandarizados (duración, volumen y forma de agitación). Esto garantizará la coherencia de los resultados.
- ✗ Los resultados son muy variables dentro de los ciclos con el mismo anticuerpo y entre ciclos en días diferentes. Esto puede deberse al uso de diferentes técnicas de lavado por parte de diferentes operadores.



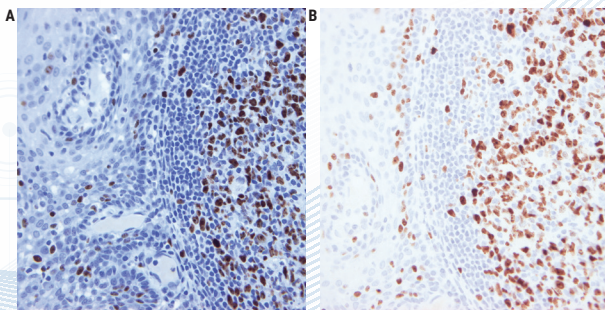
Las secciones A y B son de la misma muestra y se han teñido manualmente con los mismos reactivos. Observe la diferencia en el nivel de tinción de fondo en el epitelio estratificado. Esto se debe probablemente a una diferencia en la eficacia de la técnica de lavado utilizada (amígdala, CD20).

# Paso 86

## Optimizar la contratinción

✓ El nivel de contratinción nuclear se regula y estandariza minuciosamente para no oscurecer la tinción positiva. La contratinción debe proporcionar el mejor contraste posible entre el cromógeno y los elementos de tejido de fondo. Se elige una contratinción adecuada para el cromógeno utilizado.

✗ La contratinción nuclear a veces es muy fuerte. Esto puede oscurecer la tinción específica débil.



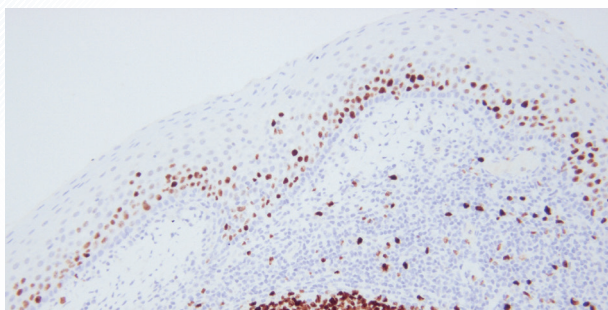
Amígdala teñida para Ki67, un marcador nuclear para células proliferativas. Las dos secciones son de la misma muestra y presentan diferentes niveles de contratinción con hematoxilina. La preparación A muestra una tinción demasiado fuerte que oscurecería una reacción positiva débil. La preparación B muestra un mejor nivel de tinción.

# Paso 87

## Usar controles adecuados

✓ Utilice siempre controles positivos y negativos adecuados que se examinen minuciosamente para validar los resultados. Los controles internos positivos y negativos también son importantes y proporcionan un medio excelente para garantizar la calidad en IHC.

✗ “Solo hacemos controles cuando nuestro método no parece funcionar. Si los hiciéramos en cada ciclo, la gente no se molestaría en mirarlos”.

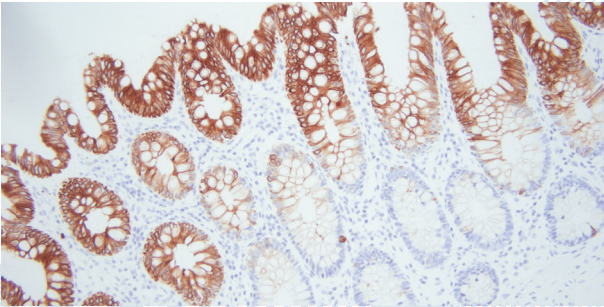


Amígdala teñida para Ki67. Esta era la preparación de control negativo y los núcleos no deberían estar teñidos. Se aplicó por error el anticuerpo primario a esta preparación en lugar del reactivo de control negativo.

# Paso 88

## Evaluar los resultados con atención

- ✓ Sepa qué buscar y dónde mirar al evaluar sus secciones de prueba y controles después de la tinción.
- ✗ Si se observa tinción en las secciones de prueba, se supone que las tinciones son satisfactorias.



Intestino teñido para AA1/AA3. Se ha producido una tinción débil inesperada del epitelio de la cripta. En la investigación, se descubrió que se había utilizado erróneamente CK20 como anticuerpo primario.



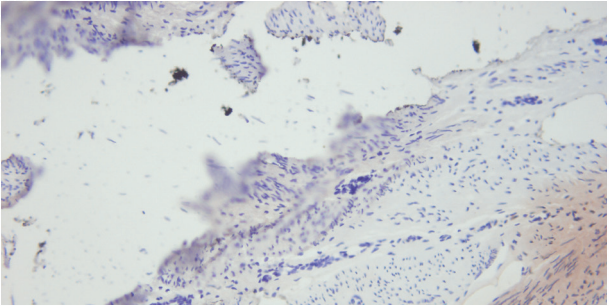
- Paso 89 Usar secciones de alta calidad
- Paso 90 Garantizar una fijación óptima
- Paso 91 Evitar problemas de adherencia de la sección
- Paso 92 Optimizar la eliminación de parafina y la aplicación de reactivos
- Paso 93 Elegir la sonda con cuidado
- Paso 94 Leer las hojas de especificaciones
- Paso 95 Optimizar las condiciones del tratamiento previo
- Paso 96 Manipular el tejido con cuidado
- Paso 97 Usar un sistema de detección adecuado
- Paso 98 Evitar la evaporación del reactivo
- Paso 99 Estandarizar los pasos de lavado
- Paso 100 Usar controles adecuados
- Paso 101 Evaluar los resultados con atención



# Paso 89

## Usar secciones de alta calidad

- ✓ Tenga especial cuidado de utilizar secciones finas y planas que se hayan secado por completo sobre la preparación. Utilice preparaciones cargadas para ISH.
- ✗ Las secciones irregulares y mal adheridas se tiñen de forma irregular con tinción de fondo variable.



Esta sección de mala calidad muestra la elevación y la tinción de fondo (HPV).

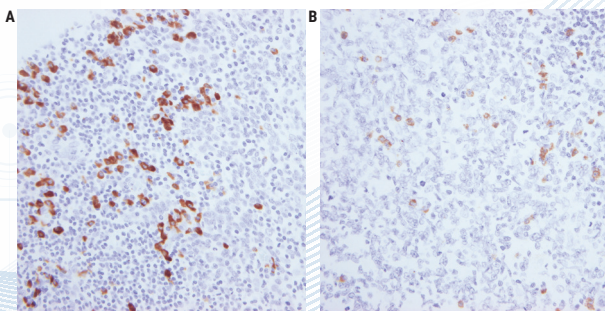
Hibridación in situ

# Paso 90

## Garantizar una fijación óptima

✓ La buena calidad de la fijación con condiciones de fijación conocidas y constantes (tipo de fijador, pH, temperatura, tiempo) produce los mejores resultados.

✗ Las condiciones de fijación inconstantes, que producen tejidos infijados o sobrefijados, producen resultados variables y dificultan la resolución de problemas.



A La ISH para ARNm de la cadena ligera kappa en amígdalas bien fijadas muestra una reacción fuerte y nítida.

B La ISH para ARNm de la cadena ligera kappa en amígdalas mal fijadas muestra una reacción débil.

Hibridación in situ

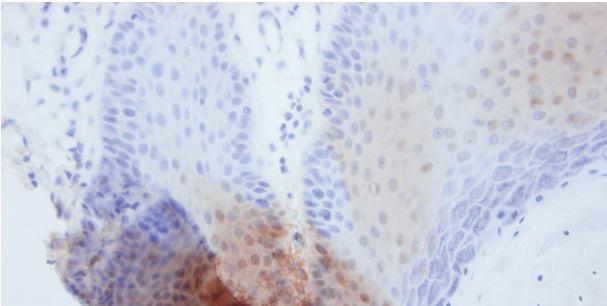


# Paso 91

## Evitar problemas de adherencia de la sección

✓ Evite el uso de adhesivos de sección a base de proteínas en el baño de flotación (pegamento, almidón o gelatina), especialmente en preparaciones cargadas.

✗ Los adhesivos a base de proteínas pueden bloquear la superficie de la preparación cargada. Esto provoca una adherencia incoherente y provoca una tinción irregular debido a la agrupación de reactivos para ISH por debajo de las secciones levantadas.



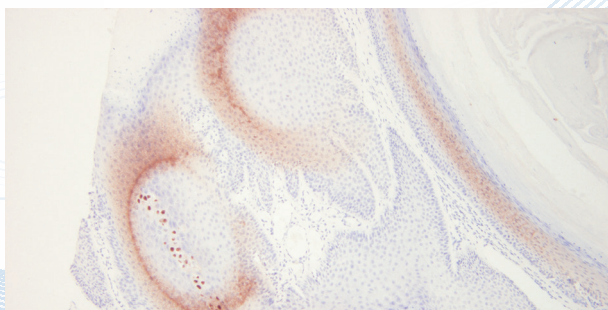
La mala adherencia y los pliegues han provocado una tinción irregular (HPV).

Hibridación in situ

# Paso 92

## Optimizar la eliminación de parafina y la aplicación de reactivos

- ✓ Tenga especial cuidado con la eliminación de parafina y la hidratación de las secciones, así como con la distribución eficiente y uniforme de los reactivos en la superficie de la muestra. Esto garantiza una tinción uniforme y resultados coherentes.
- ✗ La eliminación incompleta de la parafina puede producir zonas sin tinción o mal teñidas en las secciones. Las burbujas retenidas en la superficie de la sección durante el tratamiento previo o la tinción pueden provocar problemas.



Las burbujas formadas durante el tratamiento previo a 95 °C han provocado una tinción irregular (HPV).

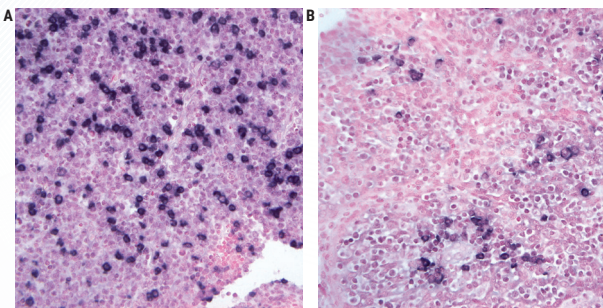
Hibridación in situ

# Paso 93

## Elegir la sonda con cuidado

✓ Elija su sonda con cuidado en relación con su sensibilidad y especificidad.

✗ "Compramos nuestras sondas solo en función del precio".



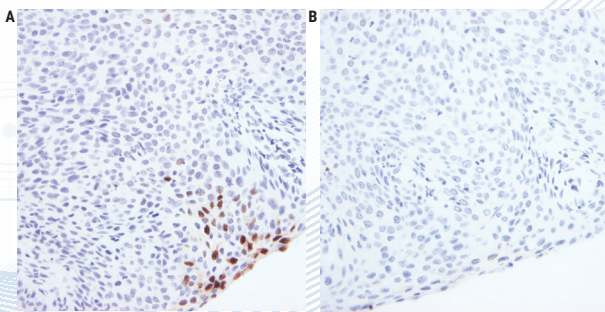
Ambas secciones de amígdala se tiñeron mediante ISH (BCIP/NBT) para ARNm de la cadena ligera kappa con sondas de oligonucleótidos de diferentes fuentes. La sección A muestra una tinción fuerte, mientras que la sección B muestra una tinción más débil con menos células teñidas.

Hibridación in situ

# Paso 94

## Leer las hojas de especificaciones

- ✓ Conozca su sonda. Compruebe siempre la hoja de especificaciones para determinar la idoneidad de su método para una sonda concreta. Controle con cuidado la temperatura y el tiempo para proporcionar condiciones de hibridación óptimas. Estos deben ser exactamente correctos para garantizar que se produzca la máxima unión específica.
- ✗ Sin acceso a las hojas de datos de la sonda en el laboratorio: "Simplemente seguimos el método estándar".



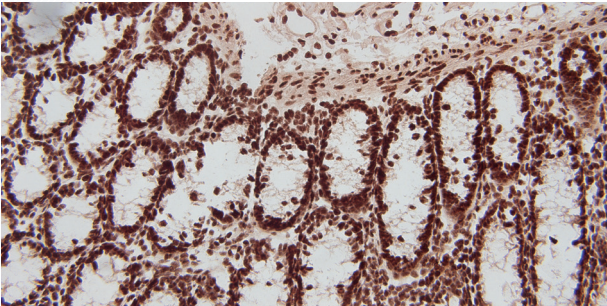
Ambas secciones del condiloma se tiñeron mediante ISH para HPV con la misma sonda de ADN, pero con condiciones de hibridación diferentes. La sección A muestra una tinción fuerte, mientras que la tinción de la sección B no es satisfactoria.

Hibridación in situ

# Paso 95

## Optimizar las condiciones del tratamiento previo

- ✓ Elija las condiciones del tratamiento previo y de optimización adecuadas. Estas dependerán de la fijación y del tipo de tejido.
- ✗ El uso de las mismas condiciones de tratamiento previo enzimático para diferentes sondas puede producir a veces malos resultados.



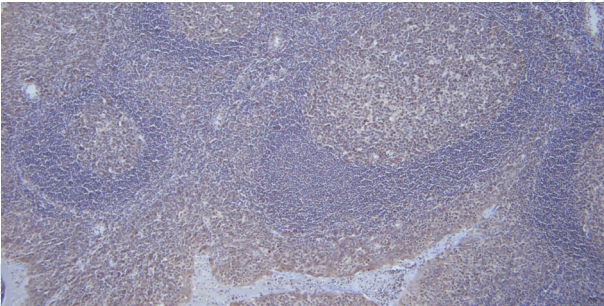
Esta sección del colon se ha teñido con una sonda de control positivo de poly d(T). La sección muestra el resultado de la excesiva digestión con proteinasa K. Observe la pérdida de estructura citoplasmática en el epitelio mucoso y la tinción de fondo intensa.

Hibridación in situ

# Paso 96

## Manipular el tejido con cuidado

- ✓ La manipulación cuidadosa de las muestras de tejido y la fijación rápida limitarán la pérdida de ARN por la acción de RNasas endógenas.
- ✗ La manipulación descuidada de las muestras de tejido y la fijación retrasada fomentarán la pérdida de ARN por la acción de RNasas endógenas.



Tinción débil debido a la descomposición del ARN nuclear por RNasas. Amígdala teñida con una sonda de control positivo de poly d(T).

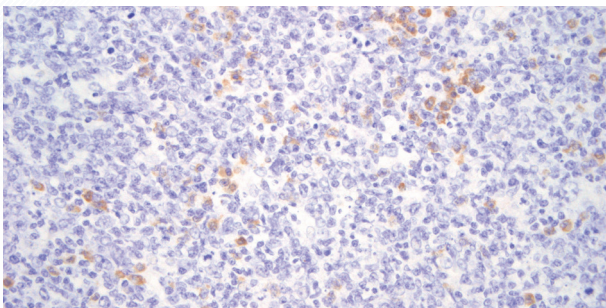
Hibridación in situ



# Paso 97

## Usar un sistema de detección adecuado

- ✓ Elija un sistema de detección y visualización sensible y optimice las condiciones de incubación.
- ✗ La falta de sensibilidad en el sistema de detección y visualización puede provocar una tinción muy débil o incluso negativa, aunque la sonda esté unida a un objetivo.



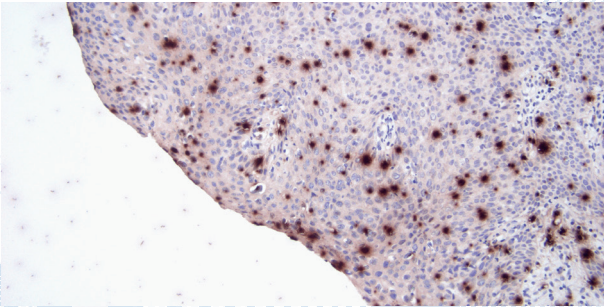
La tinción débil en esta sección de amígdala se debe a una falta de sensibilidad en el sistema de detección. ISH para la cadena ligera lambda con un kit de detección sin polímero.

Hibridación in situ

# Paso 98

## Evitar la evaporación del reactivo

- ✓ Evite la evaporación de la solución de la sonda y de otros reactivos durante la incubación. Debido a la necesidad de largos tiempos de incubación, el secado de los reactivos es un problema común. Es esencial el uso de equipos de buena calidad.
- ✗ Si la sonda u otros reactivos se secan en la sección (normalmente en los bordes), puede provocar una tinción intensa e inespecífica en las zonas.



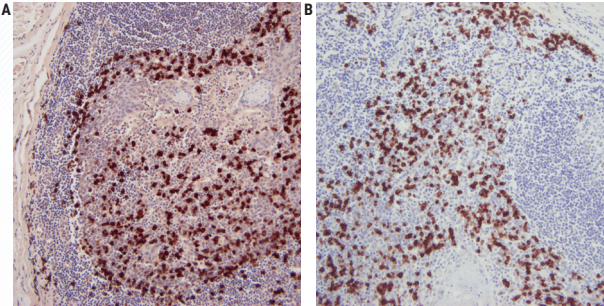
Esta sección de amígdala teñida con ISH para la cadena ligera kappa se ha secado durante el lavado posthibridación con formamida, lo que ha provocado una tinción incoherente e inespecífica.



# Paso 99

## Estandarizar los pasos de lavado

- ✓ Utilice pasos de lavado estandarizados (duración, volumen y forma de agitación). Esto garantizará la coherencia de los resultados.
- ✗ Los resultados son muy variables dentro de los ciclos con la misma sonda y entre ciclos en días diferentes. Esto puede deberse al uso de diferentes técnicas de lavado por parte de diferentes operadores.



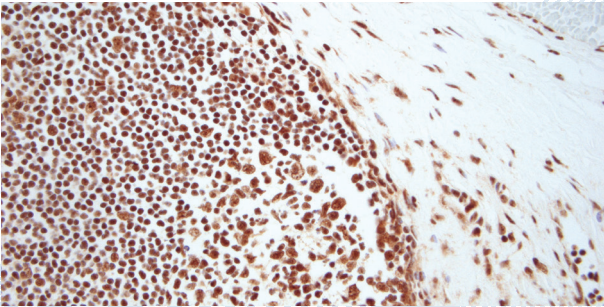
Estas secciones de amígdala teñidas con ISH para la cadena ligera kappa muestran cómo el lavado afecta al resultado final. La sección A muestra una tinción de fondo excesiva debido a una técnica de lavado deficiente, mientras que la sección B se lavó correctamente y no tiene tinción de fondo.

Hibridación in situ

# Paso 100

## Usar controles adecuados

- ✓ Utilice los controles adecuados con cada ciclo. Esto debe incluir tejido positivo conocido y un control negativo con una sonda inespecífica.
- ✗ “Solo hacemos controles cuando nuestro método no parece funcionar. Si los hiciéramos en cada ciclo, la gente no se molestaría en mirarlos”.



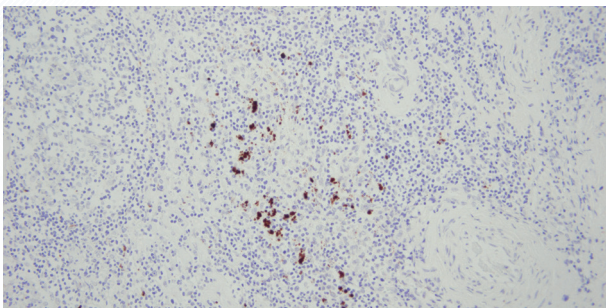
Sección de amígdala teñida con una sonda de control positivo de poly d(T). La tinción precisa indica que el tejido está bien fijado y que las secuencias de ARN se conservarán bien.

Hibridación in situ

# Paso 101

## Evaluar los resultados con atención

- ✓ Sepa qué buscar y dónde mirar al evaluar sus secciones de prueba y controles después de la tinción. Cualquier persona que lleve a cabo una ISH debe tener conocimientos básicos de la teoría subyacente de la técnica y dónde encontrar una tinción positiva.
- ✗ Si se observa cualquier tinción en las secciones de prueba, se supone que las tinciones son satisfactorias.



Esta sección de control negativo de amígdala ha pasado por todos los pasos de ISH, pero sin la aplicación de una sonda. Se muestra hemosiderina, que tiene un color marrón natural y además una DAB que intensifica el color. Esto no representa una tinción positiva.

Hibridación in situ





# Knowledge Pathway

## **Autores**

**Geoffrey Rolls (autor principal)**

**Simon Davies (inmunohistoquímica)**

**Aodin Gallagher (hibridación in situ)**

## **Colaboradores**

**Kerrie Scott-Dowell**

**Annette Mullane**

**Neville Farmer**

**Fiona Tarbet**



# Knowledge Pathway

Knowledge Pathway es un recurso científico y educativo para profesionales del campo de la anatomía patológica. Creado por una comunidad de autores y expertos en constante crecimiento, este animado portal de ciencias le ofrece continuamente información nueva y relevante, que va desde lo básico hasta conocimientos de aplicaciones específicas.

[knowledgepathway.com](https://knowledgepathway.com)

---

## LEICA BIOSYSTEMS

Leica Biosystems es un líder mundial en soluciones de flujos y automatización, integrando cada paso en el flujo de trabajo. Como única empresa con flujo de trabajo desde la biopsia hasta el diagnóstico, estamos posicionados singularmente para romper las barreras entre cada uno de estos pasos. Nuestra misión "Advancing Cancer Diagnostics, Improving Lives (Avanzamos en el diagnóstico del cáncer, mejoramos vidas)" está en el núcleo de nuestra cultura empresarial. Nuestros artículos fáciles de usar y sistemáticamente fiables ayudan a mejorar la eficacia del flujo de trabajo y la confianza en el diagnóstico. La empresa está representada en más de 100 países y tiene su sede en Nussloch, Alemania.