

TEMA 20

HISTOPATOLOGÍA

La histopatología es una rama de la Anatomía Patológica que estudia las enfermedades a nivel tisular. Se basa en la obtención, procesamiento y análisis de muestras de tejido con el objetivo de establecer un diagnóstico preciso.

Fases del procesamiento histopatológico, desde la obtención de la muestra hasta su estudio microscópico.

1. CONCEPTOS:

- **Histología y anatomía patológica:**

- **Histología:** Estudio de tejidos sanos para conocer su estructura y composición.

- **Anatomía Patológica:** Estudio de tejidos enfermos para diagnosticar enfermedades.

La **Anatomía Patológica** es la rama de la Medicina que estudia las causas, mecanismos y efectos, tanto estructurales como funcionales de una enfermedad.

La enfermedad no es sólo una alteración de la forma sino también de la función, por lo que la **Anatomía Patológica y Fisiopatología** están estrechamente vinculadas.

El campo de conocimientos de la Anatomía Patológica abarca todas las enfermedades del organismo en su vertiente morfológica, intenta diagnosticar por medio de técnicas y procedimientos específicos (histología, inmunohistoquímica, microscopía electrónica, citología).

Para realizar el **estudio anatomopatológico** completo es necesario un estrecho apoyo en las técnicas histológicas, lo que convierte a la Unidad de Anatomía Patológica en una simbiosis, entre la morfología y el laboratorio, donde se aplicarán las técnicas necesarias e idóneas, para el estudio morfológico.

Las distintas muestras que nos remitirán son **biopsias, muestras de necropsias y material citológico**.

Las muestras remitidas tendrán como fin el diagnóstico o la búsqueda de la etiología de la enfermedad cuyo resultado se está esperando para establecer una terapéutica consecuente.

- **Biopsias y piezas quirúrgicas:**

- **Biopsia:** Muestra de tejido extraída de un paciente vivo con la finalidad de estudiarla y dar un diagnóstico.

Las biopsias que llegan a un Servicio de Anatomía Patológica las diferenciaremos según sus características.

Podemos obtener **muestras de pequeño tamaño** que no precisan de toda la zona afectada (procedentes de endoscopias digestivas), o si **augmentamos su tamaño** nos encontraríamos con cilindros renales, cilindros hepáticos, y punches cutáneos.

- **Pieza quirúrgica:** Órgano (extirpación de una mama, un pulmón) o parte de un órgano, pero con la totalidad de la lesión, extraído durante cirugía.

El material que se remite al Servicio de A. P. se enviará, **según el tipo de estudio** a realizar, en el **fijador** correspondiente según protocolos de cada Servicio, o en **suero fisiológico**, o **en fresco** para estudio intraoperatorio.

- **Preparación histológica:**

Manipulación de una muestra de tejido con procedimientos técnicos, conservando su estructura tisular, para realizar su estudio microscópico.

Esto se obtiene realizando secciones con un micrótomo, y que por transparencia se pueden observar en un microscopio y una vez teñidas diferenciamos todas las estructuras tisulares.

Preparación histológica: conjunto de portaobjetos, corte del tejido teñido, medio de montaje y cubreobjetos.

Las preparaciones histológicas pueden ser:

- **Impronta:** consiste en poner en contacto un portaobjetos con el tejido o material que queramos procesar, y por adherencia las células quedan fijadas en el cristal.

- **Intraoperatorias:** consisten en hacer **cortes en congelación** con un **criostato** para después de su tinción realizar el montaje lo más rápido posible (se realiza en tejido fresco).

- **Biopsias de rutina:** tras su fijación y procesamiento, se realizan los cortes en microtomos, pasando a su tinción y montaje.

- Estas preparaciones llevan una capa de medio de montaje sobre el material extendido para adherir el cubreobjetos.

- Con todo esto conseguimos mantener en **condiciones óptimas** la preparación histológica para su posterior observación. Cuando queremos que perdure una preparación (años) sin pérdidas de intensidad en las coloraciones, se suelen **sellar**.

2. TRANSPORTE DE MUESTRAS:

Las muestras deben transportarse en envases de tamaño adecuado, bien cerrados y limpios, correctamente identificados (etiqueta pegada al frasco, no a la tapa) y con el fijador correspondiente.

Los frascos y peticiones cuya superficie esté húmeda o manchada con líquidos no serán admitidas.

Citologías: Las extensiones en portaobjetos deben mantenerse en cajas cerradas y separadas de otros frascos que contengan formol. Identificar cada portaobjetos con los datos del paciente. Los líquidos han de remitirse en fresco, sin añadir fijadores, inmediatamente después de la obtención.

Biopsias y piezas quirúrgicas: Pueden remitirse en fresco rápidamente si se analizan de inmediato. Se remitirán fijados en formol 10% tamponado en los demás casos.

Las muestras se acompañarán de los siguientes datos:

1. **Identificación:** Datos de identificación del paciente (nombre y apellidos), laboratorio de procedencia y nº de identificación de la muestra del mismo si es un caso externo.

2. **Tipo de tejido y de patología** (tipo de tumor u otro proceso).

3. **Antecedentes clínicos** relevantes para la prestación solicitada (Ej. tratamiento previo).

4. Prestación/Prueba solicitada y si requiere evaluación o no.

Condiciones preanalíticas:

Las muestras deben haber sido **fijadas en formol tamponado** durante el tiempo suficiente para penetrar todo el tejido (4-24h) y, preferentemente, durante **menos de 48h** (importante para los estudios de receptores hormonales y Her2).

En el caso de **técnicas de FISH** sobre biopsias por aguja se recomienda un **mínimo de 4 horas de fijación**.

3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS, TÉCNICAS Y METODOLOGÍA:

1º Fijación:

- Objetivo: impedir la descomposición y transformación de los componentes celulares.
- El **líquido fijador** tiene que poseer la **capacidad de conservar** la estructura y/o composición química de los tejidos.
- El **volumen del fijador** debe ser 30-40 veces el volumen de las piezas y se aconseja el pase por **más de un baño**, para evitar el endurecimiento de las muestras y el envejecimiento prematuro del líquido fijador.
- Los fijadores deben penetrar completamente el tejido (**mínimo 4-24 h**).

2º Deshidratación:

- Finalidad: obtener un grado de consistencia idóneo de las muestras, así como la eliminación del agua tisular ya que ésta no es miscible con los medios de inclusión.
- El agente deshidratante más usado y el que da mejores resultados es el **alcohol etílico** en concentraciones crecientes.
- c. El agente deshidratante no debe alterar las estructuras tisulares.

3º Aclaramiento:

- a. Eliminar el alcohol presente en los tejidos ya que éste no es miscible con el medio de inclusión. Los líquidos que eliminan el alcohol y disuelven la parafina se llaman **líquidos intermedios**.
- b. El líquido intermedio más utilizado es el **xileno**, que también puede ser sustituido por la **isoparafina** con la única ventaja de que no es ecotóxico.

4º Inclusión:

- a. La **parafina** ocupa los huecos resultantes de la eliminación del agua tisular aportando la consistencia necesaria para la realización de cortes de 3-4 µm de espesor.
- b. La inclusión se realiza a una temperatura de fusión de la parafina entre 45-60°C.

4. FIJACIÓN:

Cuando a la célula se le detiene su ciclo vital, sufre una serie de modificaciones en su estructura que nos impiden valorarla para detectar la enfermedad

Utilizamos los procesos de fijación con los que paramos los deterioros que se producen en la célula y tejido tisular.

Existen múltiples fijadores, lo importante para elegirlos, es tener en cuenta la **clase de tejido**, las **técnicas a realizar** posteriormente y la **velocidad del fijador**, pues hay que **evitar la autólisis y putrefacción**.

Al introducir el tejido en el fijador, las células de la superficie de tejido se fijan con rapidez, y tenemos que conseguir que el fijador atraviese esa capa celular y llegue al interior del tejido.

Principios generales de una buena fijación:

- + Detener los fenómenos de destrucción celular como:
 - **Autolisis**: destrucción celular por las enzimas lisosomales después de la muerte.
 - **Putrefacción**: cuando muere la célula, es destruida por bacterias.
- + Conseguir la **insolubilización** de los constituyentes celulares.
- + Procurar que no se produzcan artefactos por la fijación en el tejido.

● **Reglas generales a observar en el empleo de los líquidos fijadores:**

Si tenemos en cuenta el **tipo de estudio microbiológico** que vamos a realizar:

- Fijación **histológica o citológica**: fijación que mantiene el sustrato morfológico de la célula, conservando su arquitectura y estructura celular.
- Fijación **histoquímica**: para conservar los componentes químicos insolubilizándolos, utilizaremos esta fijación para el estudio de la composición bioquímica y metabólica de los elementos que componen el tejido.

Según el método que utilicemos:

- Métodos **físicos** (congelación rápida con nitrógeno líquido).
- Métodos **químicos** (uso de sustancias fijadoras: formol, glutaraldehído, ác. ósmico).

Tipos de fijadores:

- + Fijadores que **forman enlaces químicos**:
 - Formol (más utilizado).
 - Glutaraldehído (microscopía electrónica).
 - Ácido ósmico (fijación de lípidos).
- + Fijadores por **precipitación de proteínas**:
 - Alcohol etílico.
 - Acetona.
 - Ácido pícrico.

Reglas más elementales de fijación tisular:

1. Rapidez en la fijación: El **formol** tiene una **velocidad de fijación** (proceso químico) muy baja, pero su **velocidad de penetración** (fenómeno físico) en el tejido es muy alta, por lo que el tiempo de fijación dependerá del tamaño de la pieza (+tamaño, +tiempo de fijación).

2. Cuando se realiza el estudio macroscópico de cada pieza haciendo los **cortes** para su estudio microscópico, disminuye así el volumen de tejido a fijar, acortando el tiempo. En **tejidos laminados**, el tiempo mínimo a fijar es de 2h.

3. La **relación volumen de pieza/volumen de fijador** está establecido en 1/20.

4. Siempre en el frasco **se echa fijador antes de introducir la pieza** para evitar que la muestra de tejido (al estar en fresco) se pegue en el fondo o en las paredes del frasco.

5. En muestras que contienen **gran cantidad de tejido adiposo**, éste flotará en el fijador, para evitarlo se introduce encima una esponjilla de histología (papel filtro, gasas o algodón) que la mantendrá sumergida.

El **pH del fijador** debe de ser neutro (aprox. 7), si este pH no es adecuado, se puede utilizar tampón fosfato, bicarbonato, para graduarlo.

- **Métodos FÍSICOS de fijación:**

Congelación, criodesecación y criosustitución.

- **Método de congelación:**

La congelación debe ser **rápida e instantánea**, pues si la realizamos lenta y progresivamente, nos va a producir una formación de cristales de hielo intratisulares que provocan roturas o desgarros, evitando así realizar un correcto diagnóstico.

Varios métodos de congelación:

- Congelación instantánea por inmersión en **isopentano**, a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, es aconsejable para este método que las piezas sean muy pequeñas. Se pueden **conservar** bien durante mucho tiempo a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Congelación instantánea por **nitrógeno líquido**, se realiza a $-270\text{ }^{\circ}\text{C}$ siendo muy brusca, y gracias a esta temperatura y rapidez.

- Congelación por **nieve carbónica**, mediante gas carbónico que tiene la propiedad de pasar de gas a sólido.

- **Método de criodesecación:**

Someter a los tejidos a la acción del vacío, previamente se introduce el tejido en nitrógeno líquido bloqueando toda actividad biológica.

Posteriormente se introduce en una cámara de vacío provocando una **sublimación del agua congelada**, o deshidratación del tejido por evaporación del agua.

Este método conserva íntegramente las estructuras antigénicas.

Otra ventaja es que el método es **reversible**, si le añadimos agua el tejido vuelve a su estructura primitiva.

El tejido fijado con este método se puede conservar durante mucho tiempo.

- **Método de criosustitución:**

Sustituir el agua del tejido por otro líquido hidrosoluble, para ello tenemos que **congelar instantáneamente con nitrógeno líquido**, colocando posteriormente el tejido en el líquido fijador o de sustitución que se mantendrá a una temperatura no superior a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante un proceso largo y prolongado.

La temperatura óptima para este proceso es de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Líquidos fijadores que más se utilizan en este proceso como líquidos de sustitución:

- Alcohol etílico.
- Acetona.
- Propilenglicol.
- Glicerina.

Este proceso suele durar de 2 a 3 semanas.

- **Métodos QUÍMICOS de fijación:**

Los fijadores químicos se basan en la modificación de los componentes de la materia para realizar la fijación.

Fijadores químicos:

- Ácido acético.
- Formaldehído.
- Tetróxido de osmio.

- Acetona.
- Glutaraldehido.
- Ácido pícrico.
- Ácido crómico.
- Cloruro de mercurio.
- Dicromato potásico.Etanol.
- Metanol.
- Ácido tricloroacético.

Cualidades de los líquidos fijadores:

- **Velocidad de penetración** (fenómeno físico) aceptable y adecuada al tejido a fijar.
- Buena **velocidad de fijación** (proceso químico), ser rápido en parar los procesos de deterioro tisular, a más velocidad de penetración menor velocidad de fijación. La **velocidad de fijación** se puede definir como el tiempo que necesita un fijador para precipitar o insolubilizar los elementos constituyentes de la célula una vez que el fijador se ha puesto en contacto con ella.
- **Coefficiente de endurecimiento**: propiedad que tienen los fijadores de endurecer los tejidos, varía según el fijador, tejido a fijar y volumen. Tanto la dureza excesiva, como el tejido blando, pueden ocasionar problemas en el corte.
- El fijador puede alterar el volumen de los tejidos, para ello lo ideal es utilizar **tampón** en el fijador para **controlar su pH y su presión osmótica**.
- Utilizar un fijador con **efecto mordiente** para facilitar la coloración (en coloraciones débiles).

➤ **Fijación por INMERSIÓN:**

La fijación de una muestra debe ser inmediatamente después de la extracción de la biopsia o inmediatamente después de la necropsia, para evitar la lisis y putrefacción.

Las piezas quirúrgicas o procedentes de necropsias se fijarán en contenedores lo suficientemente grandes que nos permitan utilizar al menos 20 veces la cantidad de fijador superior a la cantidad de tejido a fijar.

Una vez realizado el tallado de las piezas para proceder a su inclusión, no deben de ser mayores a 5mm para facilitar su fijación.

➤ **Fijación por PERFUSIÓN:**

Se utiliza en los laboratorios de experimentación y es ideal para el tratamiento de los estudios de animales.

➤ **Fijación por DESHIDRATACIÓN:**

Su mecanismo es la deshidratación del tejido, hay que tener presente que disuelven las grasas, no fijan los hidratos de carbono y **precipitan las proteínas**.

Por ejemplo el **alcohol etílico** o etanol, que es un líquido claro, incoloro e inflamable, tiene una **buena velocidad de penetración**.

Tiene como **inconveniente** que disuelve los lípidos, no fija los ácidos nucleicos, endurece los tejidos y **necesita ser renovado**, ya que a medida que va deshidratando va disminuyendo su concentración.

Otro fijador que actúa por deshidratación es la **acetona**, es un líquido volátil, incoloro e inflamable.

La acetona por su extrema rapidez con que deshidrata, produce una gran retracción en los tejidos, si la utilizamos debemos fijar rápidamente e incluir en parafina.

➤ **Fijación por SALES:**

La fijación por formación de sales de los fijadores puros, aunque actúa muy rápidamente en la superficie del tejido, tiene una **velocidad de penetración más lenta**.

Son fijadores que se suelen utilizar **mezclados** porque suelen producir mucho endurecimiento tisular.

- Cloruro de mercurio, HgCl₂.
- Dicromato potásico.
- Acetato de uranilo.
- Ácido pícrico.

● **Mezclas fijadoras:**

Las mezclas fijadoras tienen como finalidad compensar las desventajas de una sustancia fijadora con las ventajas de otra sustancia. Se pueden agrupar en:

- Mezclas fijadoras con formol.
- Mezclas fijadoras sin formol.

➤ **Mezclas fijadoras CON FORMALINA:**

a. Líquido de Bouin: muy utilizado en microscopía óptica, se utiliza en solución acuosa, está compuesto por la mezcla de **formalina**, **ácido pícrico** y **ácido acético puro**. Su fijación se produce entre 2 y 24h, suele dar una coloración amarillenta a la pieza, que necesita ser lavada con alcohol.

b. Bouin-Hollander: se trata una mezcla realizada con **líquido de Bouin** y **acetato neutro de cobre**, se puede utilizar como fijador para los **cilindros de médula ósea**.

c. Líquido de Gendre: es bueno para la fijación de glucógeno y pigmentos derivados de la hemoglobina, está compuesto por **ácido pícrico**, **ácido acético** y **formalina**.

d. Fijador de Müller: solución acuosa compuesta por **dicromato potásico** al 2'5% y **sulfato sódico** al 1%, se utiliza como **base para otros fijadores**.

e. Fijador o mezcla de Zenker: tiempo de fijación de 2 a 6 horas, se utiliza para **médula ósea** y en general para el **estudio del sistema hematopoyético**. Se compone de **solución de Müller**, **cloruro de mercurio** y **formalina**.

f. Solución B-5: toma como **base el fijador B5** que está compuesto por **cloruro de mercurio** y **acetato sódico**, y le añadimos, siempre antes de utilizarlo **formalina**.

g. Mezcla Formol- Bromuro de Cajal: se compone de **formalina** y **bromuro amónico** en solución acuosa, es buen fijador para el **sistema nervioso** y se utiliza en la **impregnación argéntica**.

h. Solución de Heidenhain o Susa: para estudiar el glicógeno y se compone de **cloruro de mercurio**, **cloruro sodio**, **ácido**, **triclora acético** y **formalina** en solución acuosa.

➤ **Mezclas fijadoras SIN FORMALINA:**

a. **Líquido de Zenker:** es un fijador lento de 12 a 24h, y está compuesto por **solución de Müller** (dicromato potásico y sulfato sódico) más **cloruro de mercurio**, en el momento de su uso se le **añade ácido acético**.

b. **Fijador B-5:** se compone de **cloruro de mercurio** y **acetato sódico**.

c. **Líquido de Carnoy:** solución alcohólica de **ácido acético glacial** y **cloroformo**, se utiliza como fijador para el estudio de glucógeno, proteínas fibrilares y miofibrillas, el tejido una vez fijado se debe **lavar con alcohol absoluto**.

● **Fijación en MICROSCOPIA ELECTRÓNICA:**

El fijador inicia su proceso al introducir las muestras en la dilución oportuna. Las muestras serán pequeños dados de no más de 1 mm.

Los fijadores tienen una lenta infiltración. Los tiempos variarán dependiendo del fijador utilizado.

➤ **Glutaraldehído:**

Líquido oleoso que se encuentra en forma de solución al 25%. El proceso de fijación es muy semejante al de la formalina.

Sobre todo se usa para la fijación del cerebro y para la microscopía electrónica, en la cual los tejidos pueden ser luego tratados con tetróxido de osmio (OsO₄).

Las piezas pequeñas quedan fijadas al cabo de 1 a 6h. Los tejidos pueden permanecer más tiempo en glutaraldehído lavándolos luego con una solución tampón de fosfato.

El glutaraldehído da excelentes resultados en la fijación total del organismo.

➤ **Ácido ósmico:**

El ácido ósmico o tetróxido de osmio (OsO₄) se presenta en forma de cristales de color amarillo dorado, volátil, soluble en agua.

Debido a su escaso poder de penetración (0,5 mm/hora), se utiliza únicamente en las técnicas de cortes ultra finos (microscopía electrónica).

Los vapores del ácido ósmico alteran la mucosa bucal y nasal, y también dañan la córnea. Por ello se ha de trabajar con gafas protectoras o bajo una campana de gases.

En la práctica se utiliza exclusivamente OsO₄, diluido en una solución tampón. El ácido ósmico tarda varias horas en disolverse y ha de colocarse en la oscuridad, ya que es descompuesto por la acción de la luz.

La fijación la realizaremos a una temperatura de 0°C, ya que esta temperatura impedirá cambios por lisis en la célula permitiendo que ciertos componentes no desaparezcan.

➤ **Acetato de uranilo:**

Es una sal cristalizada en octaedros de color amarillo. Al igual que el **nitrate de uranilo**, de color verdeamarillento, es **fácilmente soluble en agua**, pero se descompone por acción de la luz. Hoy en día apenas se emplea, aunque tiene la ventaja de no endurecer los tejidos. También aquí es necesario lavar abundantemente con agua después de la fijación. Se utiliza sobre todo con soluciones de OsO₄ para aumentar su capacidad de contraste.

➤ **Dicromato potásico (K₂Cr₂O₇):**

Sal soluble en agua y de color rojo amarillento con un fuerte poder oxidativo. La mayoría de las proteínas quedan fijadas sin llegar a precipitar. La fijación de los lípidos tiene lugar por oxidación. Los núcleos quedan con un aspecto homogéneo, mientras que ciertos constituyentes nucleares son disueltos. Los tejidos han de ser lavados abundantemente en agua.

5. PREPARACIÓN DE DILUCIONES Y MEZCLAS:

Una **mezcla** está constituida por dos sustancias que permite la separación de sus componentes por medios físicos, no cambiando las propiedades fisicoquímicas de sus componentes.

Soluciones son aquellas donde las moléculas de dos o más sustancias están uniformemente distribuidas, y podemos distinguir:

- **Solvente** que es la sustancia que aporta más moléculas a la solución.
- **Soluto** que es la sustancia que aporta menos, o está presente en menor cantidad.

Concentración=molaridad= **M**=n° moles/L disolución

En el laboratorio de Anatomía Patológica es muy frecuente y rutinario, realizar **diluciones** ya sean de muestras, o más frecuentemente de reactivos.

Las **diluciones** se expresan con la cantidad de sustancia que diluimos y la cantidad final obtenida (ej: necesitamos una dilución a 1/500, pondremos 1 parte de soluto en 499 partes de solvente).

En el caso de que necesitemos saber a qué concentración está una disolución: concentración inicial x cantidad de disolución.

Si partiendo de una solución conocida la diluimos con más cantidad de disolución, estaríamos aumentando volumen, disminuyendo la concentración, partiendo de la fórmula:

Volumen inicial x concentración inicial = Volumen final x concentración final.

Otro concepto muy importante es el pH= -log [H⁺] para expresar acidez o basicidad.

6. MANIPULACIÓN DE MUESTRAS EN FRESCO:

La manipulación de muestras en fresco se deberá realizar siempre siguiendo las medidas de bioseguridad: guantes, mascarillas, gafas.

El objeto del manejo de las muestras en fresco es:

1. Estudio para su posterior inmersión en líquido fijador. Hay que tener en cuenta que la fijación produce artefactos que pueden dificultar el análisis macroscópico de las muestras.

2. Apertura para que en su posterior inmersión en el líquido fijador se produzca una adecuada fijación de todas sus áreas.

Hay que tener en cuenta que los líquidos fijadores tienen una capacidad de penetración limitada y en piezas grandes es posible que no llegue a todas sus partes antes de que se haga efectivo el proceso de descomposición /putrefacción.

3. Toma de muestras para criopreservación.

a. Toma de muestras **para patología molecular.** El ADN es muy resistente y es posible el estudio del mismo tras la fijación en formol, pero el ARN es muy lábil y se degrada con rapidez, por lo que es necesario congelar la muestra de manera rápida a -80°C para su conservación y posterior estudio.

b. Toma de muestras **para estudio de proteínas lábiles** como las inmunoglobulinas. Estas proteínas se degradan con facilidad y rapidez por lo que para su posterior estudio es necesario congelar parte o en totalidad la muestra a -80°C .

Existen algunas situaciones especiales:

- **Toma de muestras para el banco de tejidos neurológicos.** Cada caso ha de manipularse como riesgo biológico y el material fresco debe ser manejado, con indumentaria de protección de autopsia, en una campana de extracción adecuada.

- **Toma de muestras en fresco para autopsia.**

Para diagnosticar algunas enfermedades o aclarar sospechas clínicas, es preciso conocer los requisitos diagnósticos de prosección y de toma de muestras para su estudio complementario. Pueden ser necesarios: estudios radiológicos, cultivos microbiológicos, de histoquímica, inmunofluorescencia o microscopía electrónica, moleculares o de genética, determinaciones químicas en tejidos y líquidos corporales.

- Se recogerán muestras de tejidos y de sangre en congelación para biobanco de tumores, de tejidos neurológico/SNC o de otro tipo disponible para investigación.

- Para el **estudio de la cardiopatía isquémica**, a veces es recomendable sumergir los cortes biventriculares en fresco en sales de tetrazolio para diagnóstico macroscópico de infarto de miocardio reciente.

- Para el **estudio de miocardiopatía o muertes súbitas de causa no conocida** puede ser recomendable la toma de muestras específica para estudios moleculares que se deben guardar congeladas (-80°C). Como:

a. Sangre con EDTA.

b. g de corazón o bazo en fresco.

7. ESTUDIO MACROSCÓPICO, TALLADO E INCLUSIÓN:

● Estudio macroscópico:

a. Describir el tipo de material remitido para estudio: dimensiones, lesiones que contiene, morfología, aspecto, coloración y, en el caso de las piezas quirúrgicas, relaciones con estructuras vecinas.

b. Tallado: seleccionar las áreas sobre las que va a realizar el estudio microscópico.

Es imprescindible realizar una descripción del tipo de pieza, estructuras que la componen, dimensiones, peso, forma y color, y la identificación de las partes normales y las aparentemente patológicas.

El estudio de los **límites de resección quirúrgica**, sobre todo en **patología neoplásica**, es muy importante por su trascendencia pronóstica y terapéutica.

Las piezas de **tamaño muy pequeño** (biopsias endoscópicas, cilindros) se fijan e incluyen directamente.

La **selección del material que se va a incluir** se efectúa escogiendo las zonas más significativas de las lesiones. El número de muestras dependerá de la naturaleza del caso, la apariencia macroscópica de la pieza y la experiencia.

Los fragmentos que se incluirán no deben superar los 3-5 mm de espesor para facilitar la infiltración de la parafina.

Datos en el **formulario de estudio macroscópico**:

Nº de biopsia, fecha del estudio, patólogo que realizó el tallado, tipo de tejido incluido. nº total de muestras incluidas, existencia de material restante para nuevas inclusiones, petición de técnicas especiales.

● **Tallado e inclusión:**

Para obtener **cortes finos y uniformes** es necesario que las piezas adquieran una dureza determinada y una estabilidad homogénea.

Los **cortes por congelación** son, normalmente, **más gruesos** que los obtenidos por inclusión. Por ello, es preferible impregnar los tejidos con una sustancia líquida que luego pase a una fase consistente y homogénea. Este procedimiento se denomina **inclusión**.

La muestra se impregna con parafina líquida (insoluble en agua) a 56-60°C.

Se deposita el medio de inclusión en todos aquellos lugares donde hay un hueco, en especial donde se encuentra agua.

Los **medios de inclusión solubles en agua** difunden en esta agua tisular y luego se solidifican. Cuando se trata de **medios insolubles en agua** es necesario extraer primero el agua y luego sustituirla por el solvente apropiado al medio de inclusión que se utilice.

La parafina se solidifica para realizar cortes finos con micrótomo.

Los fragmentos tisulares pequeños (legrados, cilindros renales, hepáticos, prostáticos, punciones) quedan, gracias a la inclusión, reunidos en un bloque.

➤ **Deshidratación:**

La deshidratación de los tejidos tiene dos finalidades. Por un lado, se obtiene con ella un endurecimiento de las piezas, aumentando su consistencia. Por otro lado, hay que deshidratar, porque la parafina, la celoidina o las resinas (ej: plexiglás) no se mezclan con el agua.

Deshidratación por medios químicos:

Los mejores resultados se obtienen con alcohol etílico en concentraciones crecientes.

Se toma la costumbre de “escalonar los alcoholes”, es decir, de utilizar como alcohol de partida; alcohol absoluto o de 96° habiendo servido antes dos veces; como alcohol intermedio: alcohol absoluto habiendo servido una vez; como alcohol terminal: dos baños de alcohol absoluto.

Una deshidratación insuficiente es siempre nociva y, por otra parte, una permanencia demasiado larga en alcohol absoluto no llega a alterar ni endurecer las piezas (aunque las endurece), hasta el punto de volverse quebradizas.

Es preciso, no solamente multiplicar los baños, sino prolongarlos más allá de lo indispensable.

La deshidratación con **alcohol isopropílico** o también con **propanol** es más económica, pero menos rápida.

La deshidratación se obtiene pasando las piezas por soluciones de concentración creciente (en cada una es conveniente dejarlas entre 6-12h, terminando en propanol concentrado (de 12 a 24h).

La deshidratación con **acetona** se utiliza, sobre todo, en **microscopía electrónica**.

Los bloques se pasan por soluciones al 30-60-90-100% (de 10-20 min en cada una), sin sobrepasar las 6h en total. Los tejidos se contraen de un 5-10% de su volumen inicial durante las primeras fases de la deshidratación.

Condiciones imprescindibles de un **buen agente deshidratante** son:

- Que no altere las estructuras tisulares.
- Que este agente y el reactivo intermediario sean miscibles en el anterior y con el siguiente.

Otras condiciones deseables en un buen deshidratante son:

- La rapidez de deshidratación.
- Que el endurecimiento que provoque a los tejidos esté reducido al mínimo posible.
- Que la toxicidad y peligrosidad sean mínimas.

Principales agentes deshidratantes:

- Alcohol etílico.
- Alcohol metílico.
- Acetona.
- Dióxido de etileno.
- Propanol.

Se utilizan **alcoholes de graduación ascendente** para evitar la retracción excesiva del tejido, que ocurriría si lo expusiéramos a la acción brusca de un alcohol de graduación elevada. Lo más frecuente en laboratorio es la utilización de una batería de alcohol etílico de 70, 96 y 100 grados.

El volumen recomendable para los baños es de **10 veces el volumen de la pieza**.

Con ello podemos disminuir la permanencia en el baño, ahorrando tiempo y riesgo de endurecimiento no deseado del tejido. También disminuimos el índice de saturación del agua y el riesgo de alteración tisular, ya que tenemos un mayor control sobre el grado de deshidratación del tejido.

El tiempo de deshidratación variará según el tipo de tejido y el volumen de la pieza, pero será el necesario para que la deshidratación sea total y no provoque el endurecimiento del tejido.

Deshidratación por medios físico-químicos:

Criodesecación: someter el tejido a **congelación**, después se deshidrata haciendo el vacío. Posteriormente se introduce la pieza en parafina. Se suele utilizar en los casos en los que se pretende incluir vísceras, aparato digestivo, etc.

Inconveniente: si el tejido es muy rico en agua, puede cristalizar y puede dar lugar a la formación de artefactos.

Criosustitución: se congela el tejido, pero no se deshidrata al vacío. Los cristales de hielo se extraen sustituyéndolos por alcohol etílico, líquido de Carnoy, etc. Técnica muy buena para tejidos muy ricos en agua.

➤ **Aclaramiento:**

Se trata de la eliminación del alcohol de las piezas.

Consiste en sustituir el líquido deshidratante por otra sustancia que sea miscible en el medio de inclusión que se vaya a utilizar.

El método de aclaramiento consiste en la realización de baños sucesivos de agente clarificante, variando en duración según las características del agente y del volumen de la pieza.

Los líquidos que eliminan el alcohol y disuelven la parafina se llaman **líquidos intermediarios**, pues actúan entre la serie de alcoholes y la impregnación en parafina.

Se puede utilizar **cloroformo**, toluol y **Xilol**. Los mejores resultados los obtenemos con el cloroformo, y los peores con el Xilol.

Debido a su menor toxicidad, los más utilizados actualmente son el tolueno y el Xilol.

El **acetato de amilo** es miscible en todas las proporciones con alcohol y parafina, tiene la ventaja de no endurecer las piezas, su empleo es recomendado en la inclusión de piezas muy fibrosas, de fragmentos óseos y de material cromado y argentado.

Requisitos más importantes que debe cumplir un agente aclarante:

- Que no cause daño al tejido.
- Compatible con el medio de inclusión y con el agente deshidratante.
- Fácil de eliminar.
- Toxicidad y peligrosidad mínimos.

➤ **Inclusión en parafina:**

La parafina utilizada en la técnica histológica varía su punto de fusión entre 45°C y 60°C.

La mejor parafina se obtiene calentándola y enfriándola varias veces antes de su uso, o mezclando parafina usada con parafina nueva.

La inclusión en parafina presenta numerosas **ventajas** frente a otras sustancias. Es químicamente inactiva, por lo que se puede conservar indefinidamente.

Una **desventaja** es que los tejidos, al ser incluidos, han de ser calentados hasta casi 60°C, y, por otro lado, que no es soluble en agua y tampoco en alcohol.

La impregnación por la parafina se efectúa con calor entre 45 y 60°C a fin de permitir una penetración homogénea y evitar el cocido de las piezas.

La penetración e impregnación por la parafina no son perfectas si la eliminación del disolvente intermediario no es total, esto se consigue mediante **diluciones y pases sucesivos** por recipientes que contengan parafina cada vez más pura, en la práctica tres baños son suficientes.

El tiempo que deberá permanecer en cada parafina dependerá del tamaño de la pieza, normalmente para piezas de 5mm será suficiente con pasos de 1 hora cada uno.

La permanencia prolongada en parafina no tiene inconveniente si la deshidratación ha sido buena y la temperatura excede de los valores recomendados.

Al finalizar el ciclo en el procesador de tejidos, una vez que el tejido ha sido fijado, deshidratado, aclarado e incluido en parafina, se extrae el casete, con el tejido del procesador y se pone en un molde con parafina líquida orientando la pieza o fragmento tisular en la zona de corte, dejándolo enfriar. Todo este proceso de la inclusión en parafina se realiza en una estación de parafina, que incluye un dispensador de parafina, placa caliente y placa fría.

Ventajas de la inclusión mecánica (procesador automático de tejidos):

- Rápidas, trabajan por la noche y en día de fiesta, su empleo está justificado en laboratorios con un volumen importante de trabajo.

Desventajas:

- Caras de adquisición y mantenimiento (los vasos necesitan al menos 1 litro de alcohol absoluto para completar la deshidratación, que debería renovarse cada día). Tratan de la misma forma piezas grandes fibrosas que la pequeña biopsia friable, cuyas exigencias técnicas son muy distintas.

- No es posible el secado entre uno y otro baño, lo cual provoca una contaminación masiva y un desgaste rápido de las diversas soluciones.

- Evaporación de los productos tóxicos y volátiles como el xilol, lo que supone cierto riesgo la instalación de estas máquinas dentro del laboratorio.

Existe un **protocolo de lavado automático** de la máquina y **lavado manual** de contenedores procediendo al cambio de los líquidos de inclusión con un periodo de tiempo variable dependiendo del volumen de biopsias realizadas o incluidas.

Nos podemos encontrar con imprevistos que pueden perjudicar a piezas que pueden ser irrecuperables.

- Ventilación de extracción inferior integrada, así la exposición del técnico a vapores es menor.

- **Filtros de permanganato potásico** para filtrar los vapores antes de salir al exterior.

- Tienen incorporadas alarmas para avisar de posibles problemas.

- Pantallas de lectura de programas.

- Se pueden incluir hasta 300 casetes, con el consiguiente ahorro de tiempo.

- Tapas de cristal para una visión en cualquier momento del espécimen.

- Armario de depósitos de reactivos, con filtros para mejorar el control de gases aumentando la seguridad.

- Con varios programas, existe un procesador automático con 12 programas personalizados y tres programas de lavado.

➤ **Inclusión en celoidina:**

La técnica de inclusión en celoidina hoy en día está prácticamente desechada.

No obstante, es insustituible para ciertos estudios, como por ejemplo hacer cortes completos del ojo.

Los bloques obtenidos no se pueden colocar directamente en el microtomo pues se deformarían. Se preparan unas tablitas de madera en las que se adhiere con celoidina el bloque para su posterior corte.

Es necesario humedecer la cuchilla del microtomo y el propio bloque con alcohol de 70% durante el corte.

El espesor de los cortes debe ser 10-15 μ , es posible realizar cortes de hasta 100 μ .

Los cortes se pueden teñir mientras flotan, o bien, se puede extender sin teñir sobre un portaobjetos.

➤ **Inclusión en parafina celoidina:**

Es un método mixto que permite trabajar los tejidos friables o los órganos que contienen tejidos de diferente densidad.

La densidad de estos bloques es superior a la de los bloques de parafina. Las vibraciones de la cuchilla en el momento del corte al contacto de tejidos de distinta densidad, son atenuadas, permitiendo obtener secciones de mejor calidad que con la parafina sola. Los cortes obtenidos son de un grosor de 8-10 μ .

➤ **Inclusión en gelatina:**

La gelatina se obtiene por la cocción de pequeños trozos de hueso y cartílago, solidificándose al enfriarse.

Durante la inclusión en gelatina no es necesario deshidratar.

Ventajas:

- Escasa retracción de los tejidos, ya que no da lugar a la deshidratación, por ello se utiliza también este método para la inclusión de tejidos con alto contenido en agua.

- La inclusión se realiza a tª moderada, por lo que las enzimas y proteínas no se alteran.

Desventajas:

- Debe cortarse en un micrótopo de congelación o criostato.

- La gelatina no puede luego ser extraída por ser una proteína, y se tiñe al colorear la preparación.

- No se pueden hacer cortes finos, como máximo 3 μ .

Método:

Aquellos tejidos fijados en formol son los que se prestan para esta inclusión, se deben lavar abundantemente; de lo contrario, los restos de formol fijan también las proteínas de gelatina.

Los bloques son enfriados en la nevera, adquieren la consistencia de una goma de borrar, siendo endurecidos durante 1 o 2 días en formol al 8%.

Después de lavarlos, los bloques se pegan sobre un soporte con gelatina líquida o se cortan con el criostato a 10 μ , congelándolos lentamente.

➤ **Inclusiones en microscopía electrónica:**

EN PLEXIGLÁS:

La inclusión en **resinas acrílicas** se basa en la polimerización de una sustancia de bajo peso molecular y su transformación en un producto transparente y sólido.

Debido a la dureza de los bloques es posible la confección de cortes de menos de 10 μ y se utilizan cuchillas de vidrio o diamante.

En esa inclusión es también necesario deshidratar, se realiza con acetona en concentraciones crecientes.

En la técnica de cortes ultrafinos sólo se pueden utilizar trozos de tejidos de 2mm.

La sustancia de partida de esta inclusión es el **metacrilato de metilo**, que al polimerizarse se convierte en plexiglás.

Con una cuchilla de afeitar se tallan los pequeños bloques de plexiglás en forma de pirámide, en el lado donde está la pieza, montándolos luego en ultra micrótopo.

EN RESINAS:

Inclusiones en resinas Epon, Araldita, Vestopal.

La resina Epon es de menos viscosidad que la Araldita, la composición del reactivo lo forman dos resinas de diferente dureza, que mezclándolas logramos una dureza de bloque idónea.

8. CORTE POR CONGELACIÓN:

En la actualidad, los cortes por congelación cada vez se emplean más utilizando un **criostato**, aparato que permite que tanto la cuchilla del micrótomo como el bloque de tejido estén por debajo del punto de congelación, de manera que toda la intervención de preparar el corte se efectúa a la misma baja temperatura.

Una ventaja es que es una técnica rápida, por este motivo se utiliza para establecer diagnósticos rápidos, casos de **estudios intraoperatorios**.

Sin embargo, cuando se cortan en un criostato, pueden ser de buena calidad y adecuados para algunos **estudios histoquímicos**.

Los **microtomos de congelación** van conectados a una bombona de CO₂ para que sea posible la congelación de la pieza.

● Técnicas de corte en el criostato:

El criostato es una combinación del microtomo Minot y del de congelación, funcionando en un recinto refrigerado.

Como todos los microtomos consta de un portabloques, un soporte para cuchillas y un sistema de avance mecánico.

La baja temperatura necesaria para congelar se obtiene mediante un refrigerador termoeléctrico.

Los cortes que nos permite obtener se encuentran en espesores similares a los realizados en parafina.

Cuando el material requiere estudios para diagnóstico rápido, como en las intraoperatorias, utilizamos spray que congelan inmediatamente la muestra pudiendo estar el tejido y la platina situados dentro del criostato.

Si el tejido se congela lentamente puede sufrir **daños** en su estructura ya que se forman **crystalizaciones** en su interior, por lo que requieren una **congelación rápida o casi instantánea**, que la realizaremos introduciendo el tejido en **isopentano** dentro de un pequeño recipiente de cristal y que se colocará sobre nitrógeno líquido para enfriar indirectamente el tejido.

En todos los casos sumergimos el tejido en un líquido sintético (gel que congela al mismo tiempo que el tejido) que facilita el corte del tejido y su sujeción a la platina.

9. FOTOGRAFÍA:

Permite documentar hallazgos macroscópicos y microscópicos.

Se emplean microscopios con cámara digital para archivar imágenes.

Funciones:

1. De **apoyo al diagnóstico**. Una vez tallada la pieza o realizada una autopsia, ofrece una posibilidad documental de reevaluar el caso macroscópicamente en su estado original.

a. Permite una correcta interpretación del caso, con una imagen en la que se observe la estructura completa de la pieza.

b. Permite documentar cualquier tipo de pieza, por su rareza, características especiales o con una finalidad didáctica.

2. De **apoyo médico-legal**. Permite demostrar cómo se recibe la pieza y cuál era su situación previamente al tallado.

3. De **apoyo científico-docente**.

Se deben tomar fotografías macroscópicas de todo aquello que se quiera mostrar.

Es de interés:

1. **En la sala de macro** de cara a documentar las piezas que se reciben y el proceso posterior al que se someten.

2. **En la sala de autopsia** de cara a documentar aquellos aspectos macroscópicos relevantes.

En la **autopsia fetal y perinatal** la fotografía macroscópica es imprescindible para documentar el caso, o por petición de la familia.

El **estudio radiográfico** de las piezas quirúrgicas puede proporcionar información valiosa sobre la estructura y componentes de los tejidos en estudio.

Los tejidos que habitualmente deben ser radiografiados son: hueso, masas de tejidos blandos calcificados, mama.

10. PUNTOS DE CONTROL:

Norma ISO 15189: rasgos y requerimientos característicos de los laboratorios y abarca tanto los requisitos de gestión basados en la ISO 9001 como los técnicos basados en la ISO 17025. En ella se establece una Dirección Técnica responsable de Calidad (**DTC**) que fija las funciones y responsabilidades del personal, además debe asegurar la competencia técnica del mismo con una formación adecuada.

La DTC debe definir la política y objetivos, y debe incluir los controles adecuados tanto control interno como externo (que asegure un seguimiento de: calibración, instrumentos, reactivos y sistemas), todo ello documentado en un **manual de calidad**.

ISO 15189, para laboratorios clínicos, puntos críticos:

- Competencia del personal.
- Instalaciones y equipo de laboratorio.
- Bioseguridad laboratorio.
- Validación procedimientos analíticos.
- Validación de sistemas informatizados.
- Código ético, confidencialidad/seguridad de datos.
- Procedimientos post-analíticos (informes de laboratorio).
- Implantación, seguimiento y mejora.
- Gestión de riesgos / prioridades.
- Asegurar la calidad de los procedimientos analíticos.
- Auditoría, revisión del sistema de gestión de calidad por la dirección.

11. SEGREGACIÓN DE RESIDUOS:

- **Residuos no peligrosos:**

Residuos urbanos y asimilables a urbanos:

- **GRUPO I.** Residuos generales asimilables a urbanos:

Residuos que se generan fuera de la actividad asistencial de los Centros Sanitarios que no precisan medidas especiales en su gestión.

Coinciden con los residuos urbanos o municipales.

Son residuos como: restos de comidas, alimentos y condimentos que se generen en cocinas, plantas de hospitalización, comedores, cafeterías; embalajes, mobiliario en desuso, jardinería, colchones, papelería generados en áreas administrativas, de mantenimiento, almacenes y muelles de carga y descarga, etc.

El SAS es un gran productor de este tipo de residuo (Especialmente en Farmacias, Cocinas y Almacenes), por lo que se hace necesario un sistema de recogida selectiva de este tipo de residuos.

Merecen especial consideración, los residuos de aparatos eléctricos y electrónicos, que no tienen la consideración de "peligroso". Se incluyen: cartuchos de tóner, luminarias y tubos fluorescentes, material de ofimática. El **R.D. 208/2005** regula la gestión a la que han de ser sometidos estos residuos.

- **GRUPO II.** Residuos sanitarios asimilables a urbanos:

Residuos que se producen como consecuencia de la actividad asistencial y/o de investigación asociada, que no están incluidos entre los considerados como residuos sanitarios peligrosos.

Se incluyen en este grupo: restos de curas y pequeñas intervenciones quirúrgicas, bolsas de orina vacías y empapadores, recipientes desechables de aspiración vacíos, yesos, sondas, pañales y, todos aquellos cuya recogida y eliminación no ha de ser objeto de requisitos especiales para prevenir infecciones. Se incluyen también en este grupo todo el material que habiendo estado contaminado se haya tratado específicamente para su descontaminación y/o esterilización.

Se incluyen en este apartado los residuos procedentes de hemodiálisis provenientes de pacientes no contaminados por los virus de la hepatitis C, hepatitis B e inmunodeficiencia humana.

- **Residuos peligrosos:**

Según la Ley 10/1998, los residuos peligrosos son aquellos que figuren en la lista de residuos peligrosos, aprobada en el Real Decreto 952/1997, así como los recipientes y envases que los hayan contenido.

Esta misma Ley regula la entrega de estos residuos a gestores debidamente autorizados. Según el RD 952/1997, son aquellos que cumplen una de las siguientes condiciones:

Estos residuos, contienen sustancias que pueden representar un peligro para el medio ambiente, la salud humana o los recursos naturales.

Clasificar los residuos es el mejor camino para que los residuos tengan el tratamiento más adecuado. Para **clasificar los residuos**, se dispone de tres herramientas:

- Fichas de datos de seguridad de los productos que han intervenido en la formación de los residuos.

- Lista Europea de Residuos.
- Caracterización analítica por laboratorio externo.

El primer paso será consultar las fichas de seguridad de los productos, que han intervenido en la generación del residuo, e identificar al residuo dentro de la Lista Europea de Residuos. En el caso de que a través de estas herramientas no se consiga información concluyente, se recurrirá a una caracterización analítica del residuo por un laboratorio.

➤ **GRUPO III.** Residuos peligrosos de origen sanitario:

Definimos a este tipo de residuos como aquellos directamente asociados a la actividad asistencial.

1. Residuos peligrosos de origen sanitario (grupo III).

Producidos en la actividad asistencial y/o de investigación asociada, que conllevan algún riesgo potencial para los trabajadores expuestos o para el medio ambiente. Son necesarias medidas de prevención en su manipulación, recogida, almacenamiento, transporte, tratamiento y eliminación.

Infeciosos: aquellos residuos que puedan transmitir infecciones. Los residuos biosanitarios difícilmente se pueden considerar como contaminantes del medio ambiente, ya que el número de microorganismos que pueden contener, no es superior al de las basuras urbanas.

Agujas y otro material punzante y/o cortante: cualquier objeto cortante y/o punzante utilizado en la actividad sanitaria y haya estado en contacto con fluidos corporales. Son fundamentalmente: Agujas, lancetas, pipetas, hojas de bisturí, portaobjetos, cubreobjetos, tubos capilares y otros tubos de vidrio...

Cultivos y reservas de agentes infecciosos: Residuos de actividades de análisis o experimentación microbiológica: cultivos de agentes infecciosos que hayan estado en contacto directo con ellos (placas de Petri, hemocultivos, caldos, instrumental contaminado, filtros de campana de flujo laminar). Reservas de agentes infecciosos: residuos procedentes de la diálisis de pacientes con virus VHC, VHB y VIH.

En el caso de que dichos cultivos y/o reservas de agentes infecciosos sean sometidas a tratamiento de descontaminación y/o esterilización, pueden ser considerados y eliminados como residuos del Grupo II "Residuos Sanitarios Asimilables a Urbanos".

Residuos infecciosos de animales de experimentación: Cadáveres, partes del cuerpo y otros restos anatómicos, y cualquier otro material contaminado procedente de animales de experimentación que hayan sido inoculados. La mayor parte de los animales de experimentación no han sido previamente infectados. Por tanto, los residuos asociados con los mismos no han de ser clasificados como residuos peligrosos.

Vacunas vivas y atenuadas: Viales y jeringas con restos de la vacuna y las vacunas caducadas. Las vacunas inactivadas no suponen riesgo biológico y serán eliminadas como Residuos del Grupo II "Residuos Sanitarios Asimilables a Urbanos".

Sangre y hemoderivados en forma líquida: Recipientes que contengan sangre o hemoderivados, u otros líquidos biológicos. Se trata siempre de líquidos. Pequeñas cantidades de sangre o líquidos pueden ser vertidos al desagüe. En el caso de orina,

esta ha de ser vertida al desagüe y el recipiente que la contuvo tratarse como residuos del grupo II.

Residuos anatómicos: Son restos anatómicos que no se incluyen en el ámbito de los regulados por el DECRETO 95/2001.

2. Residuos peligrosos de origen sanitario (grupo IV).

1. Residuos de medicamentos citotóxicos y citostáticos.

2. Residuos de origen químico: Medicamentos desechados.

3. Residuos líquidos: Residuos de fijador, revelador o similar generados en radiología y desinfectantes a base de aldehídos (glutaraldehído, formaldehído).

4. Disolventes y disoluciones acuosas.

5. Ácidos.

6. Aceites.

● **Segregación de residuos:**

➤ **GRUPO I:**

Se recogen en **bolsas de color negro**, con galga mínima 200, preferentemente de material reciclado.

Los residuos urbanos de características especiales (poda, construcción, mobiliario, etc.) se recogerán en adecuadas condiciones para contenerización y entrega al gestor según la naturaleza del residuo.

➤ **GRUPO II:**

Se recogen en **bolsas de color marrón**, con galga mínima 200, preferentemente de material reciclado.

➤ **GRUPO III:**

Estos residuos por su riesgo asociado, requieren de una rigurosa gestión intracentro así como de un transporte y tratamiento diferenciados externos al centro.

GRUPO III a:

Se recogen en **bolsas de color rojo**, con galga mínima 400, preferentemente de material reciclado y en **contenedores** reutilizables o de un solo uso (en ese caso no será necesaria el uso de la bolsa), de **color verde**, elaborados con material que garantice su total eliminación, rígidos, impermeables, resistentes a agentes químicos y a materiales perforantes y que dispongan de un cierre provisional que garantice su estanqueidad hasta su llenado y de un cierre hermético definitivo.

Los residuos considerados como M.E.R (material específico de riesgo) serán envasados siguiendo las directrices oportunas, en **contenedores** de idénticas características que los anteriores de **color azul**, vendrán con una etiqueta adherida con la leyenda **incineración**, indicando el destino final al que necesariamente han de ser sometidos.

Los **residuos cortantes y punzantes** se recogerán previamente en contenedores específicos de las mismas características y cuya tapa esté dotada de un mecanismo adecuado de desactivación de los dispositivos dotados con elementos cortantes o punzantes.

La consideración de que determinados residuos han de ser considerados como m.e.r. es exclusiva de la dirección general de asistencia sanitaria del SAS.

GRUPO III b:

Para la recogida de los **residuos de citostáticos** se utilizará **contenedor** de un solo uso o reutilizable, de **color rojo**, elaborado con material que garantice su total eliminación, rígido impermeable, resistente a agentes químicos y materiales perforantes y que dispongan de un cierre provisional que garantice su estanqueidad hasta su llenado y un cierre hermético definitivo.

Los **residuos químicos líquidos** (xilol, formol) así como otros **residuos peligrosos líquidos** (procedentes del revelado de radiografías, restos de desinfectantes, etc) se recogerán en garrafas diseñadas y homologadas para el transporte de mercancías peligrosas por carretera.

En general, los **residuos químicos sólidos** pertenecientes a este grupo, se recogerán en **contenedores amarillos**.

Los **residuos de restos anatómicos mezclados en formol** se etiquetarán como “mezclas” y serán eliminados en **contenedor amarillo** con una leyenda “restos anatómicos conservados en formol”.

El **resto de residuos** generados por la actividad asistencial pertenecientes a este grupo serán recogidos en **contenedores** apropiados a la naturaleza del residuo.

12. BIOSEGURIDAD:

El principio fundamental de la bioseguridad que es la **contención**:

– **Contención 1ria**: Todos aquellos dispositivos o aparatos que garantizan la seguridad personal (EPIs). Deberemos utilizar **cabinas de seguridad biológica** y **elementos de protección personal** como ropa desechable (gorro quirúrgico, delantal, guantes dobles y una visera que cubra completamente la cabeza del operador para proteger los ojos, la nariz y la boca). Uso de guantes resistentes a los cortes.

– **Contención 2ria**: Centrada en el diseño de las **instalaciones internas de la sala de autopsias**. Las instalaciones deben incluir la separación de las zonas con acceso al público, flujo de circulación del personal, disponibilidad de sistemas de descontaminación o autoclaves, presión de aire negativa, filtrado del aire de salida al exterior y flujo de aire direccional.

– **Contención 3ria específica**: Superficies resistentes de fácil limpieza y desinfección, salas intermedias de acceso, mesas regulables en altura, sierras con sistemas de aspiración. Siempre que sea posible el instrumental y el equipo utilizado para el trabajo con priones deben ser dedicados exclusivamente a esa tarea. Los **métodos de desinfección** más eficaces que se utilizan actualmente son la autoclave (con temperaturas +134°C) y el hipoclorito sódico (lejía) durante 60 min.

El personal del servicio debe ser informado si en la sala de autopsias se está procediendo a la extracción de un cerebro con posible prionopatía. La entrada a la sala de autopsias será restringida al personal que va a realizar el procedimiento.

● **Tallado de muestras. Exposición al formaldehído:**

El estudio macroscópico y tallado se realizan en una mesa de tallado, con sistema de aspiración para evitar inhalación de vapores tóxicos, que consiste en una superficie de trabajo que está acondicionada para evacuar los fluidos desprendidos durante el proceso.

El **formol** es una disolución de formaldehído en agua en concentraciones que varían entre 25-50% y estabilizada con metanol, en concentraciones entre el 10-20%.

En el **ámbito sanitario** se utilizan habitualmente disoluciones con aproximadamente un 4% de formaldehído y entre 0,5-1,5 % de metanol.

La manipulación del formol en las diversas operaciones hace que se pueda emitir al ambiente formaldehído que puede ser inhalado y entrar en contacto con los ojos y la piel del trabajador. También se pueden producir derrames y salpicaduras de formol que pueden afectar a los ojos y la piel.

La tarea de tallado puede comportar riesgos biológicos y riesgos químicos, derivados de la exposición a formaldehído.

Vías de entrada del formaldehído en el organismo: vía inhalatoria (la principal), absorción cutánea e ingestión accidental.

El **formaldehído** puede provocar **daños para la salud**:

- En el **sistema inmunitario**: El formaldehído es alérgeno, tiene acción sensibilizante, por inhalación o contacto directo puede ocasionar una reacción de hipersensibilidad, y exposiciones posteriores, pueden causar reacciones alérgicas severas de la piel, los ojos, el tracto respiratorio.

- En el **sistema respiratorio**: Es muy irritante. Según la concentración ambiental los efectos van desde hormigueo en la nariz y garganta, sensación de quemazón, tos seca y dolorosa, edema, y en casos extremos neumonitis y muerte. Efectos crónicos: irritación, patología respiratoria crónica, alteración de funciones respiratorias y exacerbación de asma preexistente.

- En la **piel**: Es muy irritante. Según la concentración los efectos por contacto pueden ser: irritación con eritema y picazón, enrojecimiento, edema, vesiculación y descamación o bien efecto corrosivo pudiendo causar quemaduras graves.

- En los **ojos**: Produce irritación desde concentraciones muy bajas. Los efectos son desde pequeñas irritaciones de ojos y párpados, lagrimeo, escozor/dolor y visión borrosa a quemaduras graves con ulceraciones en caso de contacto directo por salpicaduras.

- En el **sistema nervioso central**: Se pueden producir efectos como irritabilidad, alteraciones del sueño, la memoria, el equilibrio y destrezas, fatiga, mareo, náuseas y dolor de cabeza.

- Se sospecha que el formaldehído provoca **cáncer**. Cáncer nasofaríngeo, y también con seno-nasal, leucemia mieloide y pulmonar.

- También ha sido clasificado como **mutágeno de categoría 2**, se sospecha que provoca defectos genéticos.

➤ **Características de la mesa de tallado:**

Tipos de diseños de mesas de tallado: abiertas y con extracción inferior, parcialmente cerradas o casi totalmente cerradas.

Características de la mesa o estación de tallado:

1. Material de construcción no absorbente, preferentemente acero inoxidable.
2. Esquinas redondeadas, dimensiones y huecos adecuados para trabajar sin introducir la cabeza en su interior. Lo más cerrada posible, siendo recomendable que la parte superior esté completamente cerrada, los laterales preferiblemente de vidrio de seguridad.

3. Encimera auxiliar para el asistente y un armario para las muestras dotado de extracción interior.

4. La extracción, preferiblemente triple, canalizada por la parte superior, la frontal y la inferior.

5. La evacuación del aire contaminado será preferentemente al exterior, previamente filtrado por un prefiltro de fibra sintética y un litro de carbón activo.

6. Si la evacuación se realiza a la sala, se hará circular el aire contaminado a través de litros de óxido de aluminio impregnados con permanganato potásico y el aire así regenerado volverá nuevamente al ambiente. Como medida de seguridad se puede instalar una extracción desde la sala al exterior o al sistema general de ventilación.

13. TRAZABILIDAD:

- **Registro informatizado de cada muestra** desde su recepción hasta el diagnóstico.

- Uso de **códigos de barras** y **sistemas LIS** (Laboratory Information Systems) para el seguimiento de muestras.

Según el Comité de Seguridad Alimentaria: "Se entiende trazabilidad como el conjunto de aquellos procedimientos preestablecidos y autosuficientes que permiten conocer el histórico, la ubicación y la trayectoria de un producto o lote de productos a lo largo de la cadena de suministros en un momento dado, a través de unas herramientas determinadas."

El concepto de trazabilidad se divide en dos tipos:

- **Trazabilidad Interna**, es obtener la traza que va dejando un producto por todos los procesos internos de una compañía, con sus manipulaciones, su composición, la maquinaria utilizada, su turno, su temperatura, su lote, es decir, todos los indicios que hacen o pueden hacer variar el producto para el consumidor final.

- **Trazabilidad Externa**, es externalizar los datos de la traza interna y añadirle algunos indicios más si fuera necesario, como una rotura del embalaje, un cambio en la cadena de temperatura, etc.

Existen múltiples formas de registrar los indicios, como sensores de temperatura, humedad, etc.

Otro término apropiado es: «seguimiento del producto» o también se puede utilizar «rastreo de producto».

La trazabilidad es aplicada por razones relacionadas con mejoras de negocio: mayor eficiencia en procesos productivos, menores costes ante fallos, mejor servicio a clientes, etc.

Esta práctica es factible de certificación, por ejemplo, en los sistemas de gestión de calidad, de gestión medioambiental y sistemas de control conocidos como **cadena de custodia**.

El **código de barras**: tanto las líneas, como el grosor de las mismas y del espacio entre ellas, representan información exacta acerca de un determinado producto, para poder ser clasificado e identificado durante toda la cadena logística.

14. EQUIPAMIENTO GENERAL DE UN LABORATORIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA:

Se crean secciones que nos permiten aumentar el control de calidad y la eficiencia de nuestro trabajo.

Recepción de muestras: la muestra es recibida en la unidad para identificarla y proceder a la comprobación del medio de fijación en el que se recibe.

Distribución de la muestra a la sección adecuada: dependiendo del estudio a realizar y el medio de fijación irá destinada a una o a varias secciones.

En estas **secciones** se adecuarán el medio de fijación en caso de no encontrarse en ninguno, o bien se procederá a su estudio inmediato en caso de muestras de urgencia.

En las secciones se iniciará el **proceso técnico** que tras los pasos precisos se obtendrán unos resultados que el patólogo interpretará para dar su diagnóstico.

A través de la **informática**, se irá recogiendo cada uno de los pasos seguidos por la muestra una vez ingresa en la unidad, pudiendo de esta forma en cada momento conocer en qué fase del proceso se encuentra (**trazabilidad**).

Podríamos dividir la unidad de A.P. dependiendo del tipo de muestras que recibimos, procedentes de:

- Autopsias.
- Biopsias.
- Citología.

La característica que las diferencia inicialmente es el método por el cual han sido obtenidas. Y cada una de ellas tendrá un tratamiento de recepción distinto.

● Procedimientos que se realizan en cada sección:

➤ Sección de **AUTOPSIAS**:

Objetivos de esta sección: Realizar un control del diagnóstico clínico y contribuir a la formación del personal sanitario.

Los procesos técnicos de los tejidos procedentes de autopsias se realizan en el laboratorio general.

➤ Sección de **PATOLOGÍA QUIRÚRGICA**:

Esta sección es la denominada **Laboratorio General** en ella se da recepción a las muestras que serán objeto de estudio. Dependiendo de las técnicas a realizar, se remitirán a otra sección ya sea la totalidad de la muestra o parte de ella. En esta sección se pretende dar un diagnóstico anatomopatológico a las muestras procedentes del área quirúrgica.

Dependiendo de la necesidad de obtener resultados inmediatos o no, 2 secciones:

- Una dedicada a las **intraoperatorias** que se realizan durante el proceso quirúrgico.
- Y la segunda destinada a **estudios después de la intervención** quirúrgica, que no establece un tiempo determinado.

➤ Sección de **ARCHIVO**:

Existen dos archivos, uno de piezas quirúrgicas y otro donde se procede a almacenar todos los resultados obtenidos y las preparaciones realizadas.

El **archivo de piezas quirúrgicas** guarda la pieza sobrante después de su tallado para posibles estudios posteriores, después de una primera observación microscópica con las técnicas de rutina pueden ser necesarias otras técnicas más especiales.

Esto nos permitirá revisar en futuras ocasiones los casos, con carácter docente o de ampliación de datos, ya que en un futuro pueden aparecer nuevas técnicas que permitan revisar los casos si fuera necesario.

También es usual que sean requeridos por otros centros hospitalarios.

➤ **Sección de CITOLOGÍA:**

Destinada al diagnóstico de muestras citológicas.

Existen dos procesos de mayor o menor celeridad.

La muestra citológica que precisa de un resultado en los plazos estimados y otra es aquella de carácter urgente que se realiza en radiología intervencionista precisando de un resultado inmediato.

➤ **Sección de HISTOQUÍMICA:**

En ella y haciendo uso de multitud de técnicas se demuestra la existencia de ciertas sustancias de carácter químico en los tejidos, que permitirán diagnosticar una enfermedad.

➤ **Sección de INMUNOPATOLOGÍA:**

Las diferentes técnicas inmunopatológicas realizadas sobre tejidos permiten diagnosticar diferentes enfermedades. 2 tipos de estudios: la **inmunohistoquímica** y la **inmunofluorescencia**.

➤ **Sección de AUTORADIOGRAFÍA:**

En esta sección se pretende evidenciar a través del uso de **isótopos radioactivos** el metabolismo tisular.

➤ **Sección de CULTIVO DE TEJIDOS:**

Esta sección utiliza **material de estudio en vivo** para poder realizar el análisis metabólico o estructural de la muestra.

➤ **Sección de MICROSCOPIA ELECTRÓNICA:**

La dotación tecnológica de esta sección nos permite realizar un **examen ultraestructural** de las distintas muestras de estudio.

➤ **Sección de FOTOGRAFÍA:**

Una de las formas de perpetuar los hallazgos obtenidos, a lo largo del proceso de estudio, es la fotografía.

➤ **Sección de BIOLOGÍA MOLECULAR:**

Esta sección es la más reciente y por tanto no la tendremos en todos los centros.

Se utilizan técnicas de **hibridación in situ** que permiten identificar enfermedades.

La **Citometría de Flujo** también nos permitirá realizar estudios de patología molecular.

- **Equipamiento básico del laboratorio de citología:**

- Microscopio.
- Frigorífico.
- Centrífuga.
- Citocentrífuga.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Contenedores de fijadores.
- Contenedores de colorantes.
- Agujas.
- Jeringas.
- Guantes.
- Cestillas.
- Tubos de ensayo.
- Baterías de tinción, o teñidor automático.
- Reactivos, sustancias fijadoras, etc.
- Contenedores de residuos orgánicos.
- Contenedores de desecho de material fungible (1 solo uso).

- **Equipamiento específico de la unidad de A. P.:**

Podemos destacar los **reactivos** que pueden ser **básicos** como la hematoxilina o **específicos** como los anticuerpos que se utilizan en las secciones de inmunohistoquímica.

Todas las secciones tienen que ir provistas de infraestructuras que le permitan realizar las tareas específicas.

Estas **infraestructuras** consistirán en habitáculos independientes (según productos químicos que se utilicen) adecuados para cada proceso técnico.

La **sección de macroscopía**, será bien ventilada y con campanas extractoras, mesas de tallado, instrumental, grabadora de estudios macroscópicos, criostato para intraoperatorias, casetes y contenedores de biopsias y piezas quirúrgicas.

La **sección de parafinas**, será bien ventilada, con campanas extractoras de gases, instrumental, dispensadores de parafina, placas caliente y fría, moldes de bloques.

La **sección de corte**, será bien ventilada, con microtomos, congelador, frigorífico, teñidor automático, o contenedores de tinción y cestas de tinción, montador automático, o espacio con campana extractora de gases donde se montarán las preparaciones histológicas después de su tinción.

La **sección de archivo** será con contenedores especiales para portaobjetos, cajones para bloques, y también existirá un espacio para el archivo de piezas quirúrgicas.

En el **almacén** no habrá ninguna fuente de calor cercana y se guardarán todas las normas de seguridad existentes para almacenamientos de productos inflamables, corrosivos, con riesgo de explosión (peligrosos).