

LA IMPORTANCIA DEL CONTROL DE LA CALIDAD EN LOS LABORATORIOS CLÍNICOS DE HISTOPATOLOGÍA. ARTEFACTOS. UNA REVISIÓN

Autores:

Maritza R. Martinez Pérez¹, Carmen I. Pérez Torres², Belén Z. Iglesias Ramírez³

¹ Supervisor de Histología. PhD. MEDLAB Educational & Research Services.

² Supervisor de Histología, MD Dermatopathology Laboratory. University of Miami Miller, School of Medicine

³ Profesor consultante y auxiliar de Histología de la UCM La Habana. Presidenta de la SCCM. Presidenta de la Cátedra Santiago Ramón y Cajal.

Resumen

La preparación de las láminas histológicas involucra pasos esenciales para su confección, el cual inicia con el pase de la biopsia, correcta identificación, fijación, aclaramiento, inclusión en parafina, corte y tinción del corte de tejido. En los laboratorios clínicos participan uno o dos técnicos en la confección de estas, a veces más en dependencia de volumen de trabajo y organización por áreas de especialización.

Es de destacar que la coordinación de trabajo de los laboratorios de Histología requiere una perfecta sincronización en todas las áreas, ya que un fallo en una de ellas impacta en el producto final, la calidad de la lámina histológica, para ser evaluada y diagnosticada por el patólogo.

Los artefactos en las láminas histológicas son más comunes, que lo deseado, pero debe ser inaceptables, en su mayoría son el resultado de errores humanos, fallas o accidentes en el procesamiento de la muestra, por falta de conocimientos o atención del personal técnico del laboratorio en los múltiples pasos del procesamiento de la muestra del paciente.

Especial énfasis debe hacerse en la elaboración del plan de control de la calidad del laboratorio, debe involucrar la evaluación del producto final, la lámina histológica y los conocimientos y habilidades del personal técnico.

El primer y básico intento en la optimización de la calidad en el laboratorio es conocer bien los orígenes de los errores (Artefactos) ser capaz de

reconocerlos y corregirlos. La moto individual de cada técnico debe ser, la calidad comienza conmigo. Ser consciente de que no se puede superar lo que se desconoce.

Introducción

La histopatología ha sido uno de los sectores en el campo de la Medicina en que la técnicas y automatización de los procesos del laboratorio han avanzado notablemente, ya sea desde el registro de los pacientes, pruebas, proceso de numeración de casetes y laminas histológicas, nuevos métodos de coloración, técnicas y protocolos, automatización de la tinción, imágenes digitalizadas e informes finales.

Desde 1941 Coon y colaboradores introdujeron los métodos de inmunofluorescencia, lo que resultó en nuevas disciplinas clínicas como la microscopía de inmunofluorescencia, para uso en inmunología, bacteriología, inmunocitología e inmunohistoquímica en anatomía patológica.

Posteriormente en 1967, la llamada "Revolución Carmelita" introdujo los anticuerpos conjugados con la peroxidasa del rábano, lo cual generó un colorante insoluble carmelita producto de la reacción con el sustrato (DAB) lo que permitía su visualización con el microscopio óptico.

Fue Taylor C.R, en 1974 el que reconoció el valor diagnóstico de la Inmunohistoquímica IHC, método que se convirtió rápidamente en una técnica esencial en la ayuda diagnóstica, definiendo nuevos criterios histológicos en el diagnóstico.

Es de destacar, que en toda esta trama lo que sigue constante es la importancia del patólogo y el personal técnico, sus conocimientos, actualización y habilidades para interpretar los tamaños, formas y los patrones arquitectónicos de los tejidos y las células, en un determinado antecedente clínicos específicos, agregándole los avances de la Inmunología y Patología molecular, a través de la cuales la Patología se sitúa en el contexto del conocimiento actual, para llegar a un diagnóstico más preciso.

El centro del diagnóstico histopatológico radica en la Histología, ciencia que se refiere al estudio de la anatomía microscópica de las células, tejidos, y órganos de plantas y animales. El estudio consiste en examinar órganos, tejidos y células por seccionamiento y tinción, y luego analizarlos en un microscopio.

Los laboratorios de histología tienen una serie de características distintivas que sólo se pueden comprender a través de la comparación de dichos laboratorios con otras áreas de laboratorios médicos.

Los laboratorios de histología incorporan una sólida, única, discreta, e irremplazable, carga de trabajo con muestras heterogéneas; actualmente y a pesar del desarrollo técnico logrado y la automatización de los procesos, menos del 30% de sus tareas están automatizadas en algunos laboratorios. Además, los laboratorios de histología implican múltiples procedimientos que se diversifican debido a la especialización del laboratorio y preferencias de los patólogos. Sus resultados son cualitativos y usualmente difíciles de cuantificar, con lotes de trabajo de flujo constante en un gran número de laboratorios.

Es de destacar que la coordinación de trabajo de los laboratorios de histología requiere una perfecta sincronización en todas las áreas, ya que un fallo en una de ellas impacta en el resultado, que es la calidad de la lámina histológica, para ser evaluada y diagnosticada por el patólogo.

La calidad del trabajo se garantiza con controles de rutina que identifiquen y enfrenten omisiones y errores, que permitan salvaguardar la integridad, del proceso, exactitud de los datos, registrando todas las actividades de control de calidad y errores detectados.

Se ha señalado que en la evaluación de la calidad de los controles de los laboratorios de histopatología se incluyen múltiples aspectos; correcta identificación de la muestra de los pacientes, fijación de la muestra, corte del tejido, procesamiento en parafina, inclusión en parafina, coloración,

preparación de la lámina histológica con el apropiado medio de montar y cubreobjetos.

Desarrollo:

Desde el tipo de vista histológico, un artefacto es una estructura que no se encuentra normalmente presente en un corte de tejido bien procesado.

El espécimen esta sujeto a protocolos de procesamiento que sean útiles a la interpretación y diagnóstico.

Los procesamientos de las muestras están expuesto a múltiples fuentes de errores, ya sean humanos, reactivos, de protocolos, de equipos o de interpretación. Estos errores pueden interferir en el adecuado procesamiento de la muestra, y obtener un tejido distorsionado, por tanto, inadecuado para el diagnóstico. La necesidad de reconocer los artefactos y solucionar los mismos es el desafío mas grande del personal técnico del laboratorio en su quehacer diario.

Los principales artefactos en Histología se describen a continuación. Según áreas de trabajo del proceso de confección de las láminas histológicas.

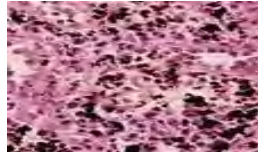
Tipos de Artefactos:

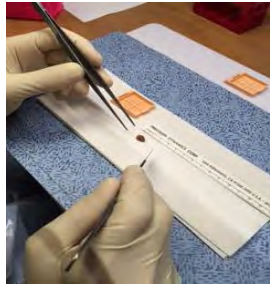
- ✚ Artefactos Previo a la Fijación
- ✚ Artefactos durante la Fijación
- ✚ Artefactos durante pase de la biopsia
- ✚ Artefactos durante el procesamiento de las biopsias
- ✚ Artefactos durante la inclusión en parafina
- ✚ Artefactos durante el corte de los bloques de parafina
- ✚ Artefactos durante el montaje del tejido en el las laminas
- ✚ Artefactos de la Coloración
- ✚ Artefactos durante el montaje del cubre objeto
- ✚ Artefactos del microscopio

A continuación, se muestran y comentan los artefactos más comúnmente encontrados:

Tipos de Artefactos, y recomendaciones para prevenirlos en el trabajo diario del histólogo

TIPO	ARTEFACTOS	RECOMENDACIONES	IMAGENES
Pre-fijación	TRAUMA MECANICO Los tejidos deben manipularse durante la cirugía, con extremo cuidado, y evitar el uso de pinzas con dientes, que aplasten el área del tejido que va a removerse para ser estudiado posteriormente, evitar aplastamiento o desgarros durante la cirugía	No usar pinzas dentadas, sobre todo en pequeñas muestras. Como por ejemplo en biopsias de musculo y de piel. 	En las imágenes microscópicas este artefacto se ven las células alargadas muy basófilas
	TRAUMA POR DESHIDRATACIÓN O HIPERHIDRATACIÓN Si no se va a fijar inmediatamente, evitar dejar secar la muestra o dejar la muestra con mucho volumen de fluido. En biopsias de músculo, este es un paso esencial para preservar la estructura normal del tejido fresco, posteriormente se congela, use el método de snap-frozen. Si usa otros métodos de congelación en músculo, provocara artefactos irreversibles en los miocitos, lo que imposibilita el correcto diagnostico histopatológico. Evite dejar secar la muestra, la deshidratación del tejido también provoca cambios irreparables que afectan la calidad del espécimen. En IHC , si se deja secar el tejido, producirá posteriormente una coloración no especifica.	Después que se remueve el tejido, si este no va a ser fijado inmediatamente se recomienda poner en una gaza ligeramente húmeda con solución salina, poner en un recipiente a 4°C, en el refrigerador, si va a ser transportado, poner el recipiente bien cerrado, en recipiente más grande con hielo regular.	
Pre-fijación	TRAUMA PROVOCADO POR QUIMICOS Algunas soluciones desinfectantes que contienen sulfato ferroso causan coagulación y necrosis. Artefactos provocados por uso de anestésico local, en biopsias de piel. Pigmentos de tatuajes y tinta para señalar los márgenes de las biopsias de piel	No aplicar antes de hacer biopsia No aplicar grandes volúmenes de anestésico local en las biopsias de piel. Estos pigmentos pueden interferir en el procesamiento y coloración de los tejidos. Deben ser documentados en la hoja de reporte y descripción del espécimen	Se observa excesivos depósitos de hierro en la superficie del espécimen. Cause vacuolización del epitelio y separación del tejido conectivo

TIPO	ARTEFACTOS	RECOMENDACIONES	IMAGENES
Fijación	FIJADOR Use suficiente fijador en un recipiente de tamaño apropiado, el volumen del fijador a usar es de 20: 1 Debe evitarse poner piezas grandes en pequeños recipientes pues el tejido fresco puede distorsionarse.	El volumen del fijador a usar es de 20: 1 Debe evitarse poner piezas grandes en pequeños recipientes pues el tejido fresco puede distorsionarse.	Incorrecta relación tamaño volumen de fijador. 
	Debe revisar la fecha de expiración del fijador y chequear su pH. Si utiliza formalina a un pH ácido por debajo de 6.8, se formará un precipitado cristalino de finos gránulos de color carmelita oscuro a negro, debido a la reacción de la formalina con la hemoglobina, dichos gránulos se conocen como pigmentos de formalina, una preparación de óptima calidad dichos pigmentos deben eliminarse antes de la coloración.	El fijador para usar debe ser de alta calidad y óptimo pH 6.8-7.0 Los pigmentos pueden ser eliminados antes de la coloración, para lo cual se desparafina el corte, hasta llevarlo a DW, y pone en la siguiente solución; Hidróxido de Amonio, 58% --- 2ml Alcohol 70% --- 100ml Dejar en solución por 30-60 min, y posteriormente lavar bien en agua corriente para eliminar amonio. Continúe con la coloración de la muestra	 Controlar que el pH del fijador sea el óptimo. Pigmentos de (formaldehído ácido-hematina) asociados a los vasos sanguíneos. 

TIPO	ARTEFACTO	RECOMENDACIONES	IMAGENES
Pase-Biopsias	Revisar si la muestra está bien fijada, si es una pieza grande Con abundante grasa o con áreas aun cubiertas de sangre. Dejar más tiempo en el líquido fijador.	Cambie la solución fijadora, use fijador fresco y deje fijar la muestra por el tiempo requerido.	Espécimen de gran tamaño y abundante grasa use volumen adecuado de fijador y déjelo más tiempo en fijador.  
	CONTAMINACION debido a la incorrecta manipulación del tejido, trabajando en áreas contaminadas con residuos de la muestra procesada anteriormente. En estas condiciones se corre el riesgo de incluir tejidos malignos a otro que es benigno.	Mantener limpia el área de disección, cambiar frecuentemente las servilletas, sobre la cual se hace la disección para evitar	

Pase- Biopsias	Especímenes mal fijados, colocados en el casete entre almohadillas de espuma, ocasionan artefacto de aplastamiento del tejido. Especial cuidado debe tenerse con los cilindros obtenidos de biopsias de aspiración en mama, biopsias de piel, hígado, musculo u otros órganos.	Se recomienda poner algún separador entre las almohadillas de espuma para evitar el aplastamiento del tejido durante el procesamiento en parafina.	
	Pobre procesamiento del tejido debido al excesivo número o tamaño de los especímenes. Si los especímenes están aglomerados y apretados en el casete, no tendrá lugar el flujo adecuado de los reactivos durante los procesos de deshidratación, aclaramiento y cambios de las parafinas.	Utilice el número de casetes necesarios, teniendo en cuenta, que las lascas de la disección deben ser de 3 mm para que los reactivos penetren adecuadamente y así evitar que el procesamiento sea incompleto. El exceso de deshidratación, hace que el tejido quede duro, quebradizo y encogido, dificultando el posterior proceso de corte de los tejidos.	

TIPO	ARTEFACTOS	RECOMENDACIONES	IMAGENES
Proceso	La función del procesamiento del tejido esta designada a remover el agua del tejido, remplazándola con alcoholes, agentes clarificadores del tejido, miscibles con la parafina, la que proporciona el soporte y rigidez necesaria para realizar cortes de tejido. En este proceso hay un grupo de errores evitables que pueden ocasionar	Establecer plan semanal de cambio de los químicos y parafina. Chequear el funcionamiento diario de las corridas, y hacer los ciclos de limpieza de la máquina procesadora. Mantener récord diario.	
Des- hidratación	1. Inadecuado gradiente de deshidratación. 2. Hidratación excesiva 3. Deshidratación Incompleta	1. El gradiente de concentración entre el tejido dentro y fuera es excesivo, causando una corriente de difusión a través de la membrana plasmática incrementa la posibilidad de distorsión celular. 2. Hace el tejido duro, quebradizo y encogido causando dificultades durante el corte y coloración. 3. Resulta en inclusión de parafina inadecuada, difícil de cortar, secciones de tejido distorsionada o fragmentada.	

Aclarar	Exceso o insuficiente aclaramiento	Excesivo endurecimiento, también y dificulta la infiltración de la parafina. Dificulta el corte.	
Impregnación	En este paso la parafina remueve el agente aclarador del tejido, la cual endurece posteriormente para formar el bloque. El principal artefacto en este paso es la cristalización.	La contaminación de la parafina con agentes aclaradores ocasiona impregnación incompleta, por cristalización de la parafina, ocasionando que el tejido se desmorone, durante el corte. Mantener el plan de mantenimiento de la maquina procesadora, evitar cambiar de lugar los líquidos de los contenedores. Evitar no escribir en las hojas de control y maquina procesadora los cambios ejecutados.	

TIPO	ARTEFACTOS	RECOMENDACIONES	IMAGENES
Coloración	Artefactos de coloración: Coloración débil, intensa, o desapareja. Artefactos debido depósitos de la coloración. Residuos de parafina en el tejido, parches. Trazas de parafina evita la penetración del alcohol, xileno y tinte.	Monitorear: Calidad de la Hematoxilina Evite oxidación continua que puede variar debido a la temperatura ambiente, Asegure. Tener en cuenta que el agua corriente puede variar el pH. Después lavar bien para eliminar residuos alcalinos que pueden causar la eosina teñirse muy débil o desapareja. La eosina debe mantenerse pH cercano a 5.0	Núcleo con color rosado, muy diferenciados sobre tenido por la eosina. Residuos de parafina en el tejido, tienen un efecto en la coloración, dejando parches de tejido sin coloración, el núcleo se observa borroso, sin detalle nuclear
Montaje	Artefactos como lagos, burbujas de aire, agua residual	Usar el apropiado medio de montar. Acuoso cuando es necesario Garantizar que en los pasos previos el agua a sido removida, con alcoholes de 95 a Absoluto, aclarar con soluciones frescas de xileno. No usar excesivo medio de montar	

PO	ARTEFACTOS	RECOMENDACIONES	IMAGENES
	Partículas de polvo, residuos de carbón provenientes del lápiz, o tinta de los equipos automáticos con que se identificó la lámina histológica. Microscopios sin el debido Mantenimiento con polvo en oculares, diafragma..	Garantice que el laboratorio cumpla con el plan anual de mantenimiento de los equipos	Apariencia nublada, grasa en los oculares u objetivos.

Conclusiones:

El director técnico del laboratorio, los patólogos, los técnicos de histología y el supervisor son los responsables de la ejecución de la evaluación técnica del laboratorio.

El control de calidad es una parte esencial del trabajo rutinario del laboratorio.

Los artefactos en la técnica histológica son comunes, pero deben ser considerados inaceptables, ya que en su mayoría son debido a errores humanos, fallas o accidentes en el procesamiento de la muestra, por falta de conocimientos o de atención del personal del laboratorio en los múltiples pasos del procesamiento de la muestra del paciente, la cual inicia con la pre- fijación, colección y correcta identificación de la muestra, fijación, inclusión en parafina, corte y tinción del corte de tejido.

Los artefactos son de diversa índole y es importante aprender a reconocerlos para no distraer nuestra atención de ellos, y rectificar los errores.

Los artefactos no son más que el reflejo de un ineficiente plan integral de control de calidad en el laboratorio.

Bibliografía:

1- Karnovsky M.J, Obituary Dedication to Albert H. Coons, 1912-1978. J. Histochemical Cytochem. 22: 1117-1118. 1979

2- Coons A.H, Kaplan M.H, Localization of antigen in tissue cells. II improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescence antibody. J. Exp. Med 91:1. 1950.

3- Taylor C.R. immunohistological approach to Tumor diagnostic. Oncology. 35-189, 1978.

4- Benditt, E.P, Gown A.M, Immunohistochem New Vista in biology and Pathology. Histochemistry: The widening horizons. Stoward, P.J, Polak, J.M, Eds, Imprint John Willey & Son. New York 1981, p 21- 29.

5- Bancroft, J.D, Stevens, A. A Theory and Practice of Histological Techniques Fourth Edition Churchill Livingstone.1996, ISBN 0-443-047 60 X.

- 6- Martinez M.R. Histologia Textbook Eds. Editorial, Pueblo y Educacion. 1990. SNLC RA. 01.03900.8. Imprint,
- 7- Taylor C.R, Cote R.J, Immunomicroscopy a diagnostic tool for the surgical pathologist Third edition, 2006, Imprint Saunder Elsevier Inc. ISBN-0-443-04760-X, 1996.
- 8- Elias J.M, Immunohistopathology A practical approach to diagnosis. ASCP, Second edition 2003
- 9- Mohammedsalch. Z.M , The role of technical quality control in Histology Laboratories. J. Cytol. Histol 2014- 5.5
- 10- Carson F. L, Cappellano C.H, Histotechnology. A self-instructional Text, 4th Edition. Copyright 2016, ASCP
- 11- Miller T.M, Technical immunohistochemistry: Achieving Reliability and Reproducibility of Immunostains. Society for applied Immunochemistry 2001, Annual meeting.
- 12- Fritschy J.M, Is my antibody staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. EJN-European Journal of Neuroscience, vol 28, pp 2365-2370, 2008.
- 13-Buchwalow I. Samoila V., Boecker W., Tiemann M
Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. Nature.com, Sc.Report 1. ArtNo. 28 doi.19 1038/srep00028 Published 01.july.2011