Control del formol y el xilol en el laboratorio de histopatología.

por

René J. Buesa

Supervisor/Administrador de Histología

(Retirado)

Tareas con exposición al formol

1. Describiendo los especímenes.
2. Caseteando.
3. Haciendo autopsias.
4. Cambiándolo en los procesadores de tejidos.
5. Llenando y vaciando los frascos para las muestras
6. Colectando el formol usado para desechar.

Las oportunidades de exposición al FORMOL son menos que las de exposición el XILOL, pero el FORMOL es **133** veces más tóxico que el XILOL.

Esencialmente la exposición se relaciona con la fijación de los tejidos y el trabajo con éstos después de fijados.

La acción evidente a tomar es pues la substitución del formol como fijador.

El camino seguido ha sido ensayar substitutos del formol:

1. Substitutos alcohólicos.

2. Substitutos no alcohólicos.

3. Fijadores que contienen menos de 10% de formaldehído.

1 - Substitutos alcohólicos

1. Todos actúan por coagulación con la ventaja común que, por no producir el cruzamiento de las proteínas, la recuperación de los antígenos por calor no es necesaria.
2. Existen **13** substitutos alcohólicos, la mayoría de composición "propietaria" con relación a sus componentes o a sus concentraciones.
3. **Los resultados son muy variables** y la mayoría no han sido evaluados independientemente.
4. "OmniFix" (etanol, etilén glicol, acético, sales de sodio y zinc, y agua) es el más estudiado, pero los resultados son inconsistentes y a veces contradictorios y usualmente con pobre preservación de los nucleótidos.

2 - Substitutos no alcohólicos

1. Hay **10** fijadores comerciales no alcohólicos.
2. Excepto por **2**, los **6** restantes contienen etanedial, un "di-aldehído" no volátil que los fabricantes consideran el substituto "ideal" para el formol.
3. De los fijadores con etanedial (conocido como "glioxal") "Prefer" y "Preserve" han sido evaluados sólo por los fabricantes.
4. La morfología con estas **2** alternativas es semejante al formol, pero requieren modificar los protocolos de IHQ.
5. Los otros **4** (HistoCHOICE, HistoFix, fijador de Mirsky y NOTOXhisto) producen una **morfología peor** que la obtenida con el formol.

3 - Fijadores con menos de 10% de formaldehído

- Existen **4** fijadores comerciales con formaldehído entre **<3%** y **<10%**
- Otros no especifican cuánto formaldehído contienen.
- Todos contienen además alcoholes y otros productos declarados o desconocidos en proporciones también desconocidas.
- Las evaluaciones son contradictorias y nunca evaluadas independientemente.
- La mayor desventaja es que **el modo de acción** de estos fijadores, y lo mismo se puede decir de casi todos los sustitutos comerciales del formol, **es desconocido**.

Ningún sustituto del formol es capaz de igualarlo como fijador, ninguno le permite al patólogo alcanzar el **estándar visual** que provee el formol y al cual está acostumbrado.

¿Qué hacer con el FORMOL?

A pesar de su peligrosidad, **no existe otro fijador** con las características del formol y la solución es

1. Usar **MENOS** formol
2. en áreas con presión negativa y un recambio total del aire por lo menos **5** veces cada hora.

USAR FORMOL en una proporción de 2:1

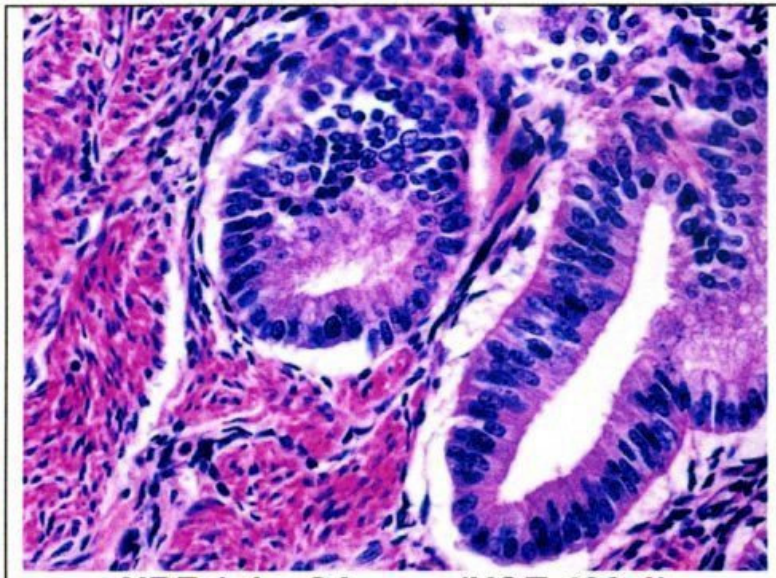
Experimentos con formol: tejido a 1:1; 2:1; 5:1 y 10:1 durante 8; 24 y 48 horas

Tejidos a fijar durante 24 horas

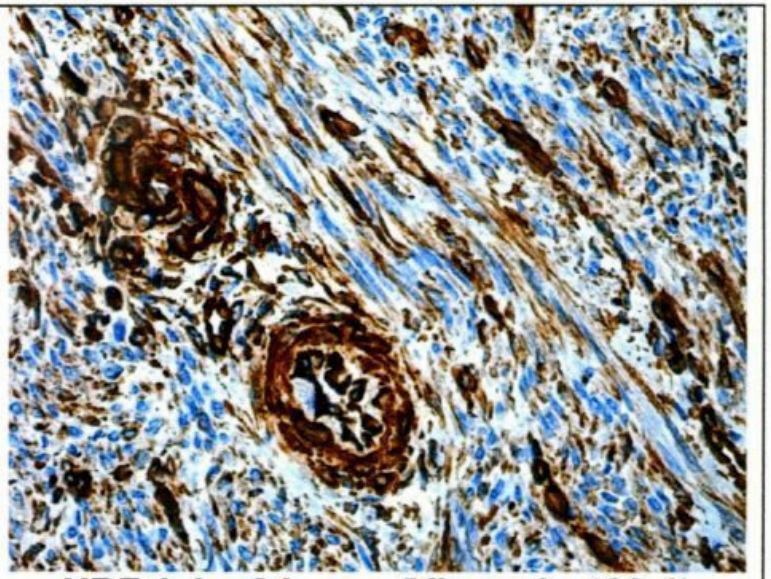
Resultado de la microtomía

Relación Formol a tejido	Tiempo de fijación (horas)	Tejido procesado manualmente					Total	Averaje
		útero	mama	grasa	piel	hígado		
1:1	8	3	2	0	0	2	7	1.4
	24	3	3	0	0	2	8	1.6
	48	3	3	1	2	2	11	2.2
Total 1:1	**8 a 48**	**9**	**8**	**1**	**2**	**6**	**26**	**1.7**
2:1	8	3	2	0	1	2	8	1.6
	24	3	3	0	0	2	8	1.6
	48	3	3	1	3	3	13	2.6
Total 2:1	**8 a 48**	**9**	**8**	**1**	**4**	**7**	**29**	**1.9**
5:1	8	3	2	0	3	3	11	2.2
	24	3	2	0	2	3	10	2.0
	48	3	3	2	3	3	14	2.8
Total 5:1	**8 a 48**	**9**	**7**	**2**	**8**	**9**	**35**	**2.3**
10:1	8	3	2	0	0	3	8	1.6
	24	3	3	2	2	3	13	2.6
	48	3	3	3	3	3	15	3.0
Total 10:1	**8 a 48**	**9**	**8**	**5**	**5**	**9**	**36**	**2.4**
Total	por 8 horas	12	8	0	4	10	**34**	**1.7**
	por 24 horas	12	11	2	4	10	**39**	**2.0**
	por 48 horas	12	12	7	11	11	**53**	**2.7**
	8 a 48 horas	**36**	**31**	**9**	**19**	**31**	**126**	**2.1**
Averaje		**3.0**	**2.6**	**0.8**	**1.6**	**2.6**	**2.1**	

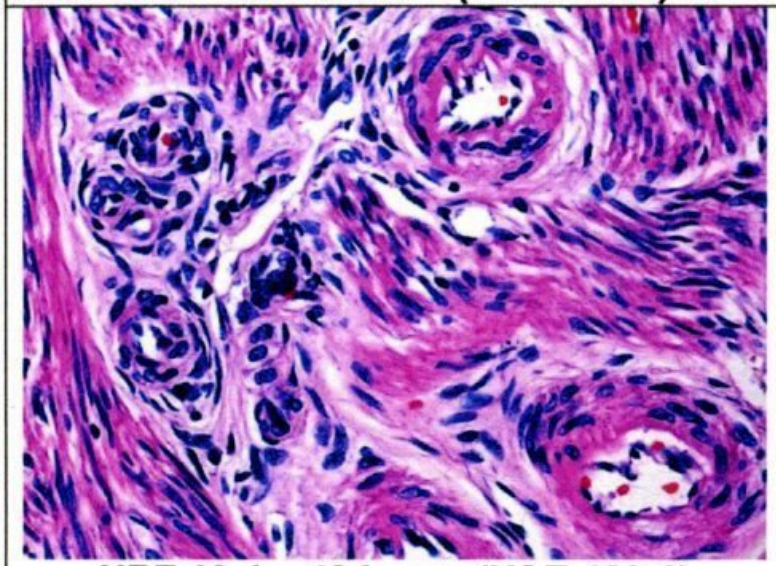
Calidad de la microtomía: Buena → 3; Regular → 2; Mala → 1; No sección → 0



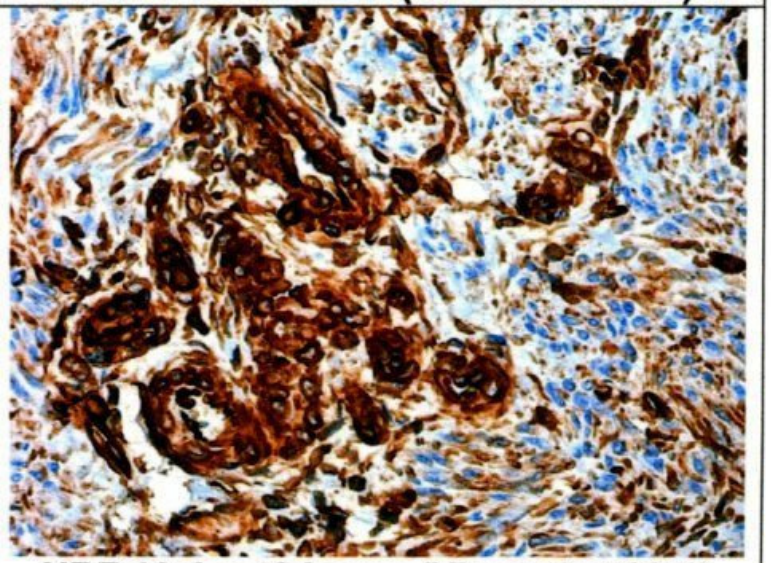
NBF 1:1 x 8 hours (H&E 400:1)



NBF 1:1 x 8 hours (Vimentin 400:1)



NBF 10:1 x 48 hours (H&E 400:1)



NBF 10:1 x 48 hours (Vimentin 400:1)

ASEGURAR UN INTERCAMBIO DE AIRE ADECUADO EN LAS AREAS DE DESCRIPCION

Entrada al área de descripción en el Hospital General de Castellón de la Plana diseñada por el Dr. José Ma. Vera

Área de descripción de biopsias: note la campana y dos salidas de circulación del aire en la pared.

Pared a un patio exterior con dos salidas de aire adicionales cerca del piso.

Ubicación de los dos extractores, uno alto en la pared y el otro en el piso en un patio abierto.

Muchos fabricantes de productos para histología han desarrollado productos para “neutralizar” el formol para eliminarlo “económicamente”.

De las diferentes marcas propietarias existentes ensayamos **5** (ALDEX-AMS 410, FORMALEX, VYTAC, TRANSFORM-121 y Neutralex®) y todas dejaron cantidades de formol por encima del límite “aceptable” o dieron valor (+) para el PAS

La solución adecuada es contratar la eliminación del formol usado en forma segura y **nunca verterlo en las aguas de albañal**.

1. Además de usar menos formol (sólo a **2:1**) y describir los especímenes en un área ventilada adecuadamente, las otras medidas de protección son:
2. Usar máscaras o trabajar con formol siempre en una campana de gases.
3. Nunca manipular sin guantes tejidos fijados con formol.
4. Monitorear la presencia del formol en el aire.

6. NUNCA neutralizar o reciclar formol.

Usando XILOL

Tareas con exposición al xilol

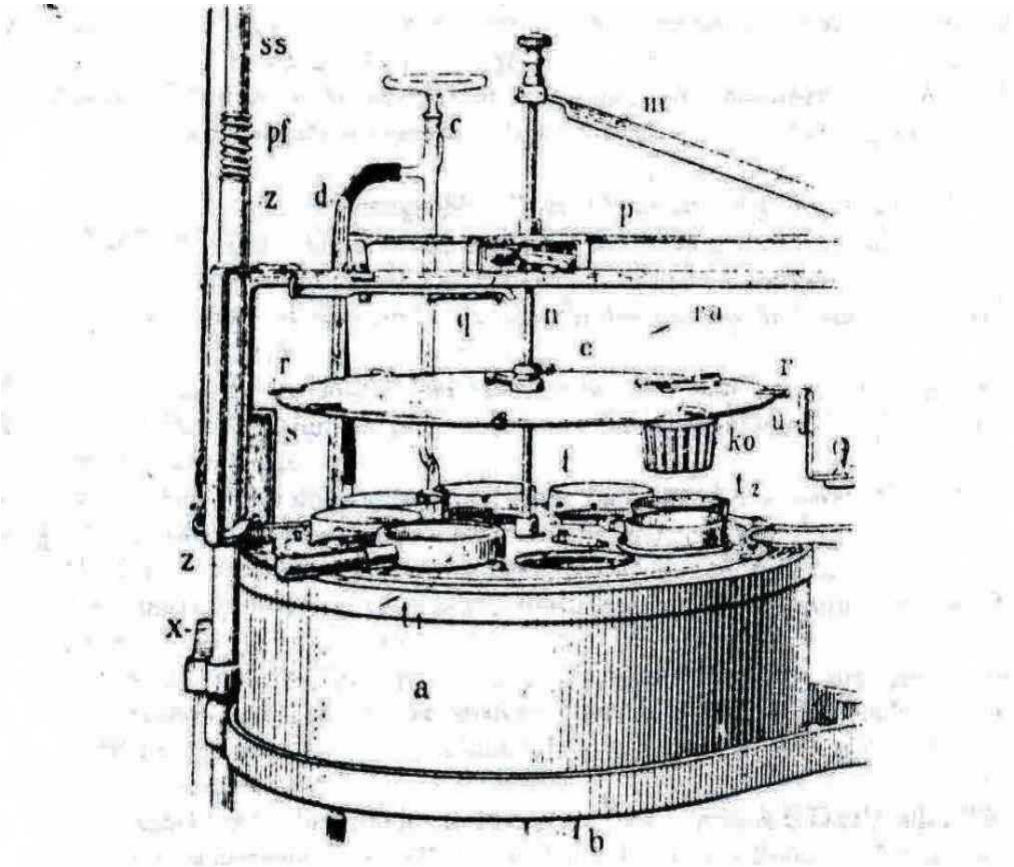
1- Procesar tejidos manualmente.
2- Desparafinando secciones antes de teñir.
3- Aclarando las secciones teñidas antes de montar.
4- Montando manualmente o usando montadores automáticos fuera de una campana para gases.
5- Cambiando los reactivos de los procesadores y teñidores.
6- Desparafinando los procesadores de tejidos y los moldes y pinzas de inclusión.
7- Reciclando xilol.

Vamos a discutir cómo **eliminar** el xilol de

TODAS

Primer desafío
¡Aclarar tejidos
SIN Xilol!

1943 – El AutoTechnicón es una modificación del diseño de Arendt de 1909 y fue el primer procesador de tejidos producido en grandes cantidades.



De 1943 al momento presente

1- El Auto Technicón (1943) es un **procesador abierto de transferencia de tejidos.**. Variantes modernas aún se fabrican y son populares.

2- Fue seguido por el Miles Tissue-Tek (1975) el cual es un **procesador cerrado con retorta y transferencia de reactivos** con numerosas variantes y fabricantes actualmente.

3- El xilol era el ante-medio recomendado para ambos tipos.

4– El amplio uso de los procesadores automáticos determinó un protocolo estándar de:

etanol → xilol → parafina

1 - Aclarar con aceites vegetales.

- Se ha experimentado con aceites de Oliva, Coco, Maní, Soya y Algodón, aislados o mezclados
- Son **inmiscibles** con los alcoholes
- Tienen una **viscosidad** entre **3,1** y **4,5** veces **mayor** que la parafina.
- Su costo varía desde menos (Soya, Maní y Algodón) a más (Oliva y Coco) que el xilol..

NO son buenos substitutos del xilol.

2 - Derivados del D-Limonene (terpeno).

1- Abundantes y más baratos que otros terpenos.

2- **22** marcas comerciales

3- usados en **32**% de laboratorios con substitutos del xilol

4- **67**% de los laboratorios usando terpenos usan las marcas Americlear, Histoclear, e Histosolve (Bio-clear)

5- **59**% de los usuarios reportan problemas de salud y técnicos.

6- no son reciclables

7- su precio comparativo es entre **0,1** a **3** (media de **1**) veces el del xilol

No son buenos substitutos del xilol

3 - Aclarando con alcanos.

1- Existen **35** marcas comerciales
2- usadas en **68**% de los labs con substitutos del xilol
3- **76**% de labs usando alcanos usan las marcas Clear Rite, Formula 83 y Pro-par
4- **23** % de los usuarios reportan problemas de salud y
5- **40**% problemas técnicos
6- algunos son reciclables
7- sus precios comparativos varían entre **1** a **7** (media de **2**) veces el precio del xilol.

Los alcanos son **mejores substitutos que los derivados del D-Limonene** pero **NO** son substitutos **IDEALES** del xilol.

Procesando sin un agente aclarante.

ETANOL: coeficiente dieléctrico alto (ε = 25 at 20º C) que no se reduce a altas temperaturas → **inmiscible** con substancias no polares, como la parafina.

ISO-PROPANOL: coeficiente dieléctrico más bajo (ε = 18 a 25º C) reducido a 50º C hasta el rango de las substancias no polares → **miscible** con parafina a partes iguales.

El iso-propanol es un substituto potencial del xilol.

4 - “Aclarando” con iso-propanol (IP)

Etanol → Etanol :IP → IP → Parafina

Rolls (2005): buenos resultados

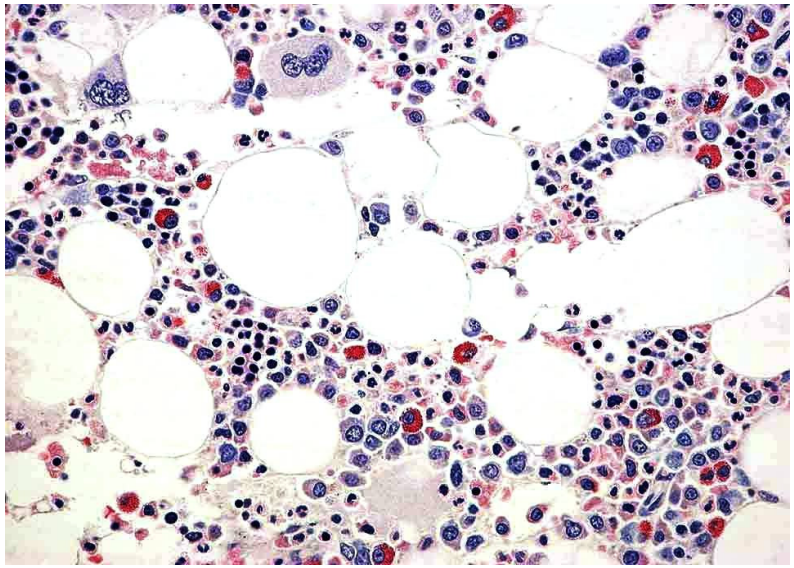
IP → Parafina

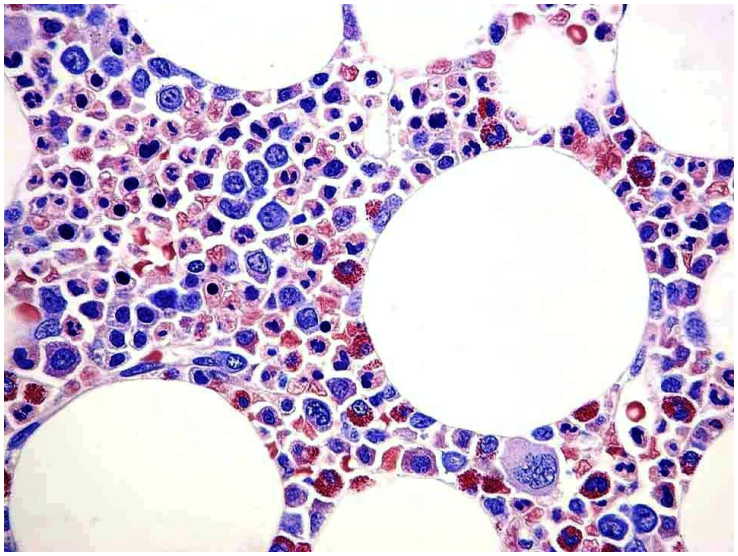
Falkeholm *et al*.(2001), Krivolapov (2006) y Peshkov (2009): buenos resultados.

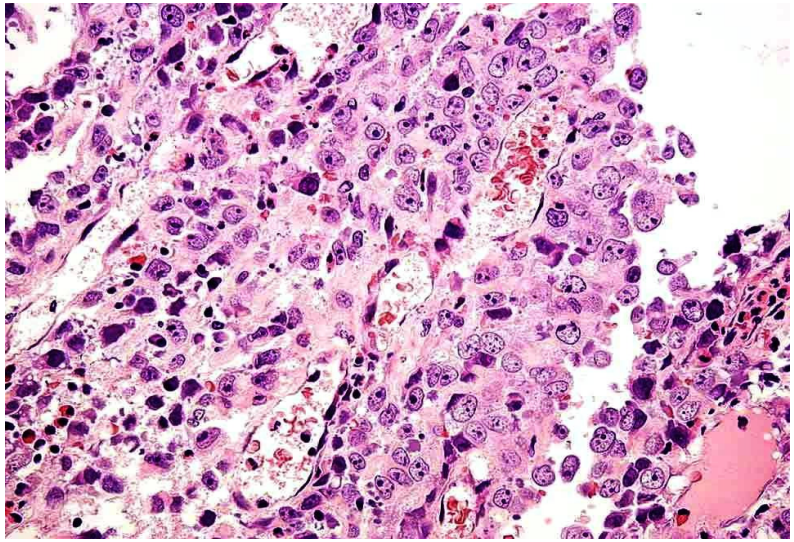
IP → IP: parafina → Parafina

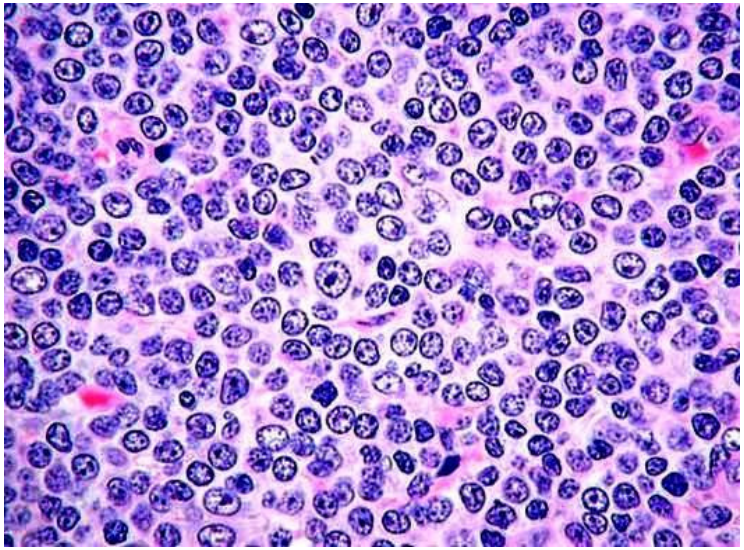
Romeis (1948) y Andre *et al*.(1994): buenos resultados.

Tejidos procesados con iso-propanol [Yu. A. Krivolapov – S. Petersburgo, Rusia]









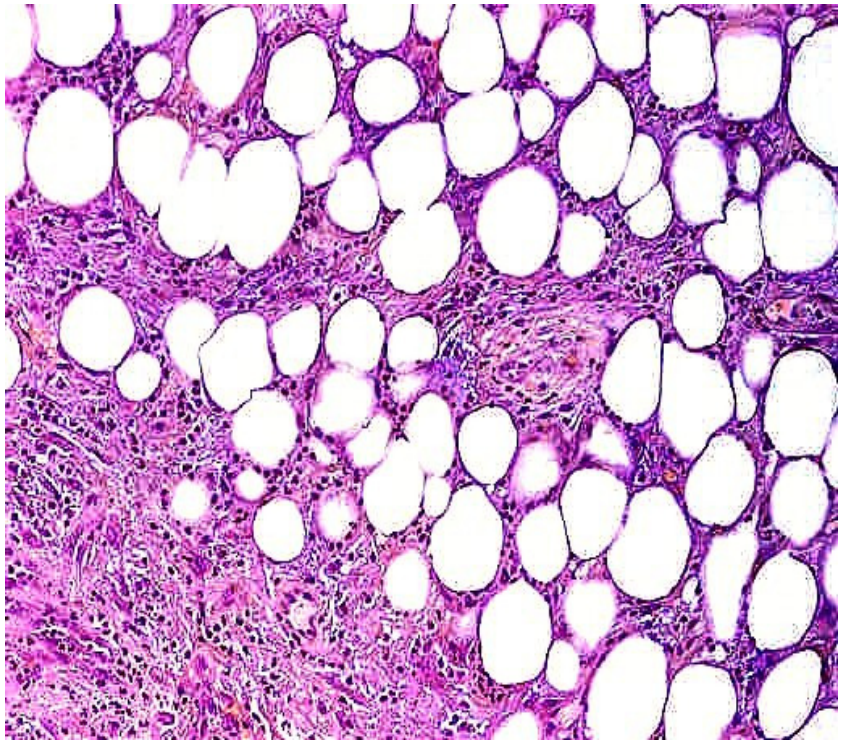
Aclarando con **aceite mineral + etanol + IP**

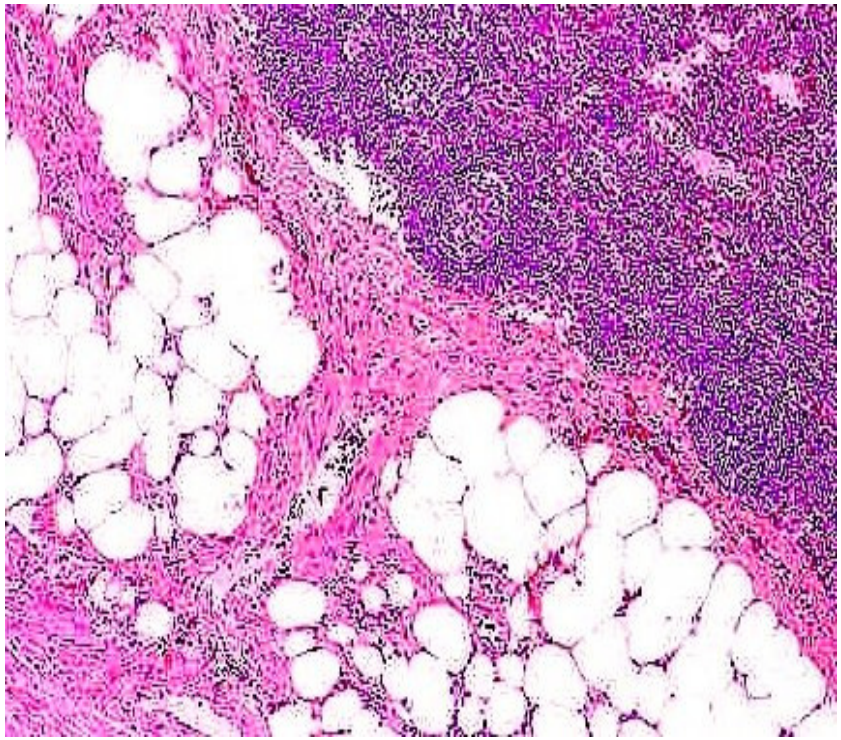
(2000- Buesa) Evaluación cuantitativa: **36** tipos de tejidos; **12** tinciones de HQ; **21** anticuerpos; **92** pares de láminas; **9** árbitros; **828** resultados con <1% de calidad subestándar y **82**% de las preparaciones iguales o mejores que con xilol (Junio 1999).

Comparación de la calidad de microtomía: X^2 = ns P>0,90;

Valor diagnóstico: X^2 = *ns* P>0,005

Procesando con mezclas **EIM** *

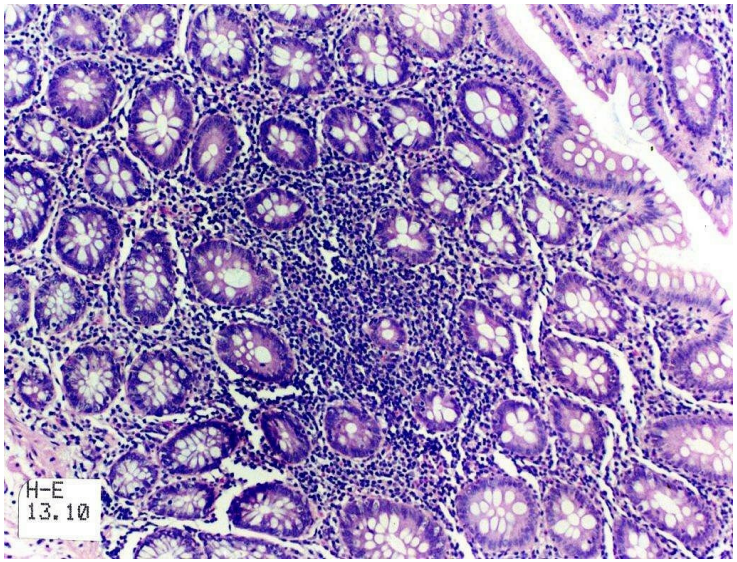


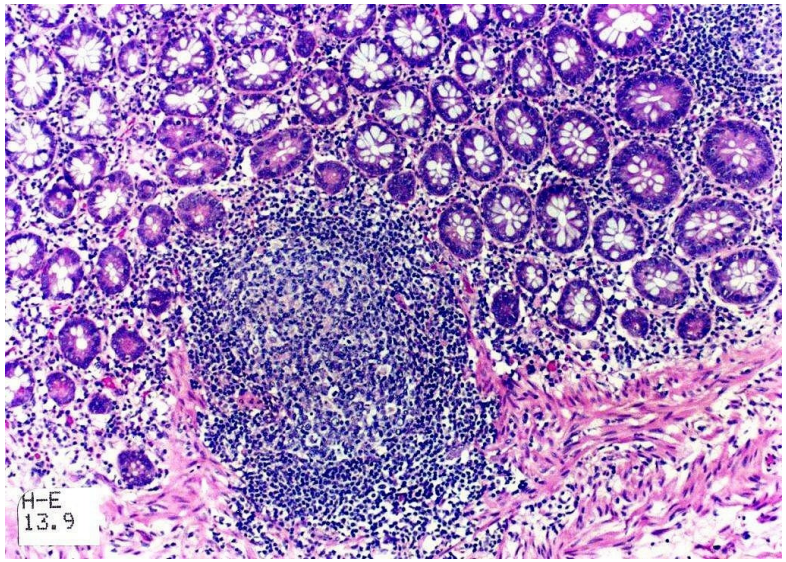


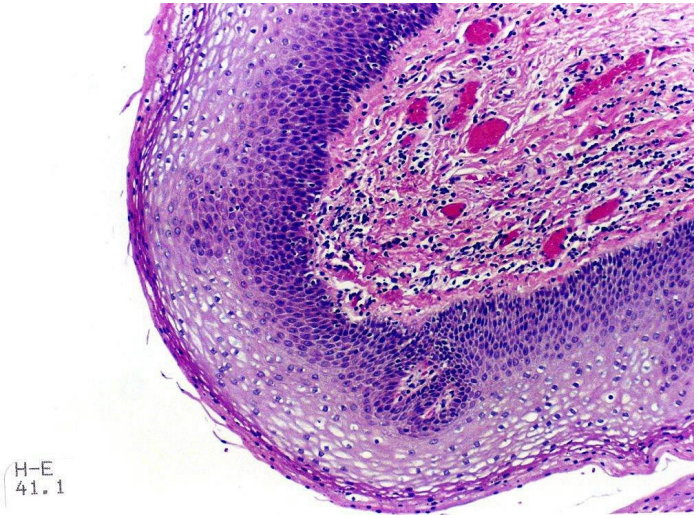
¿Puede Ud. Identificar cuál de los dos tejidos fue procesado con la mezcla **EIM** y cuál con la secuencia etanol → xilol?

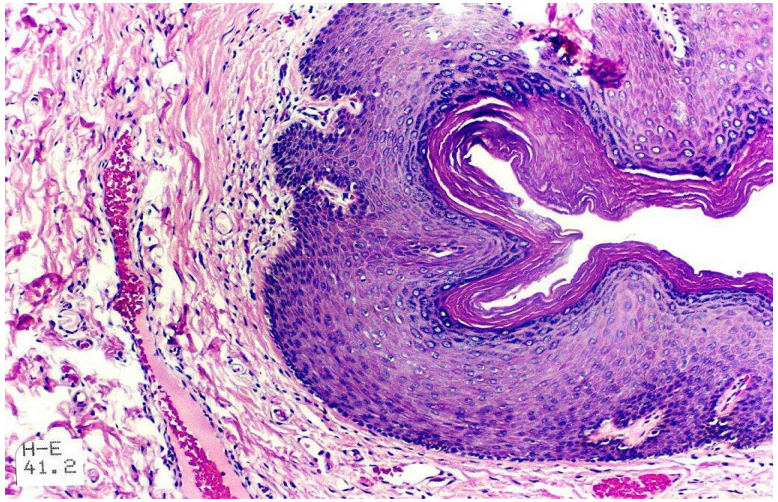
* BUESA RJ: Mineral oil: the best xylene substitute for tissue processing yet? *J.Histotechnol.,*2000:23(2):143-149

Rutina Hematoxilina & Eosina (H & E)

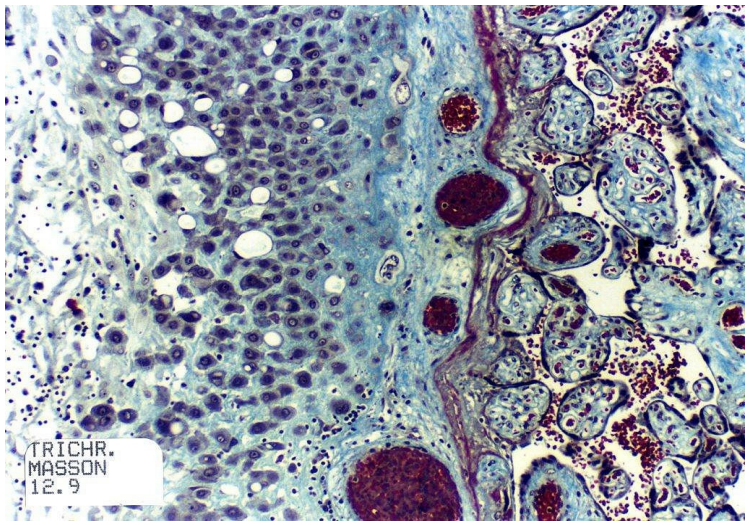


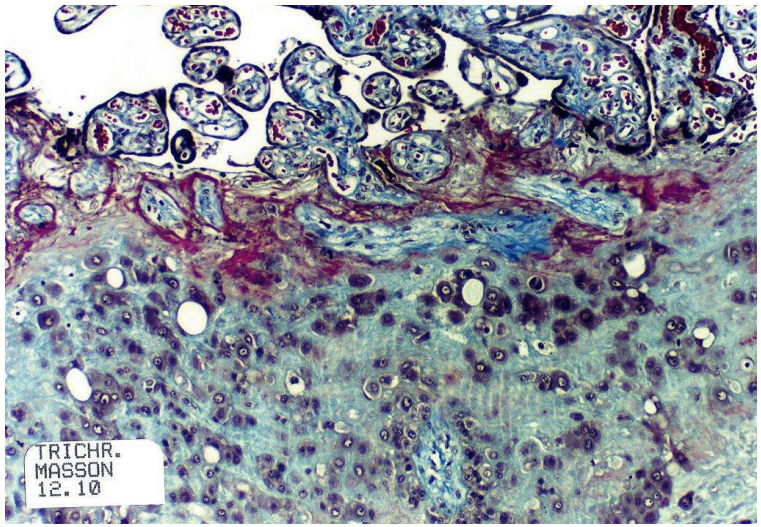


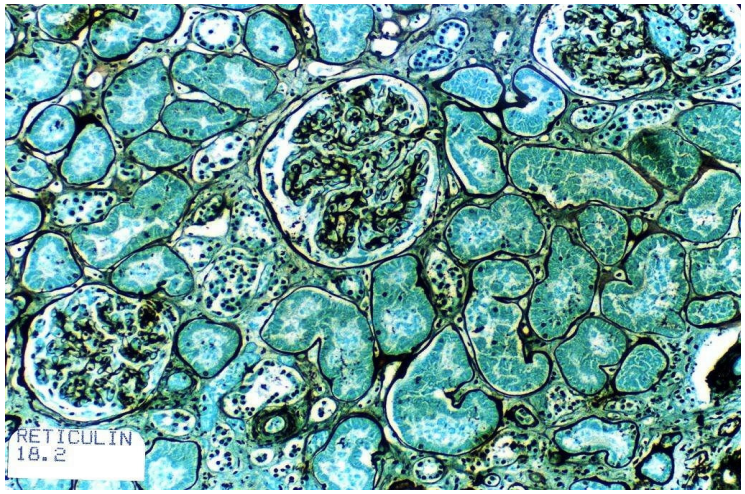


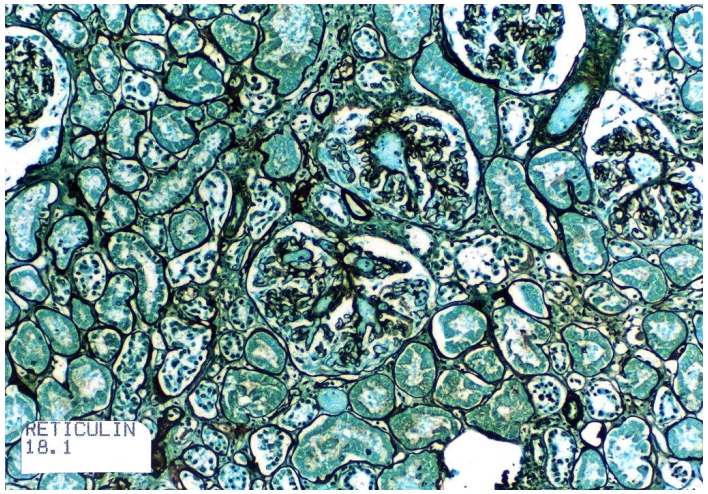


Histo-Química (HQ): Masson y Gomori



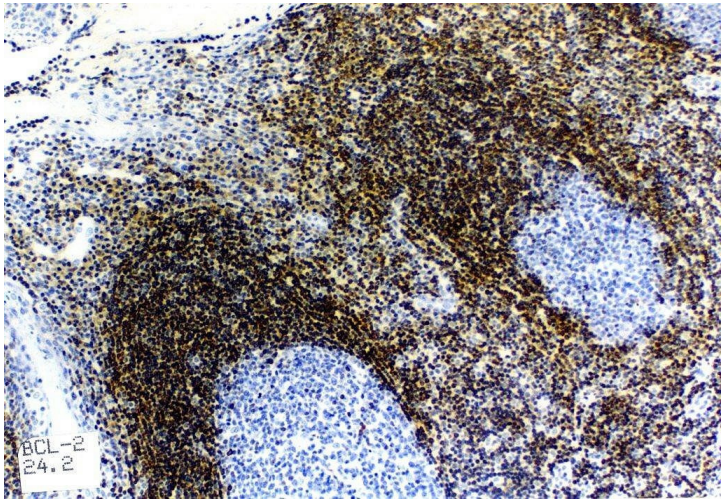


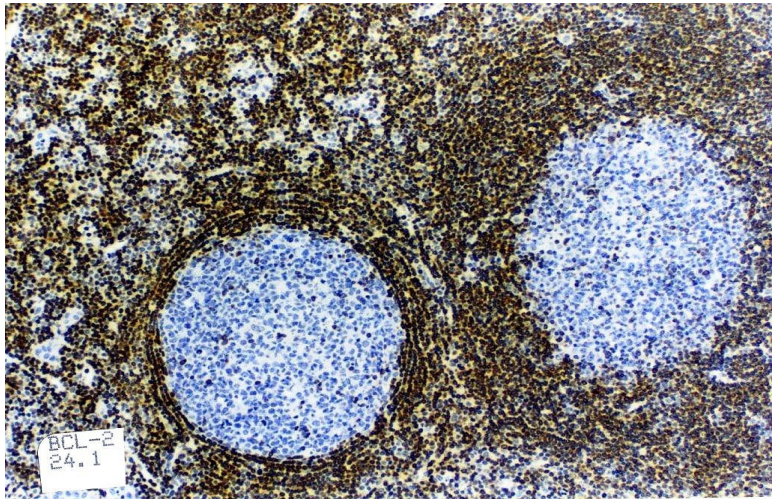


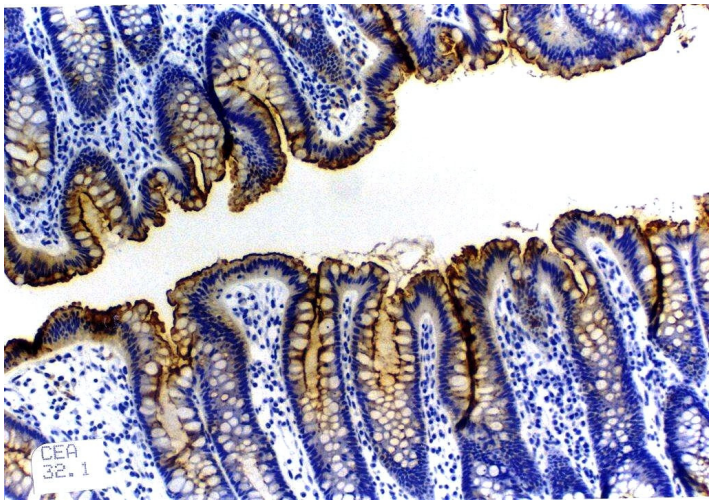


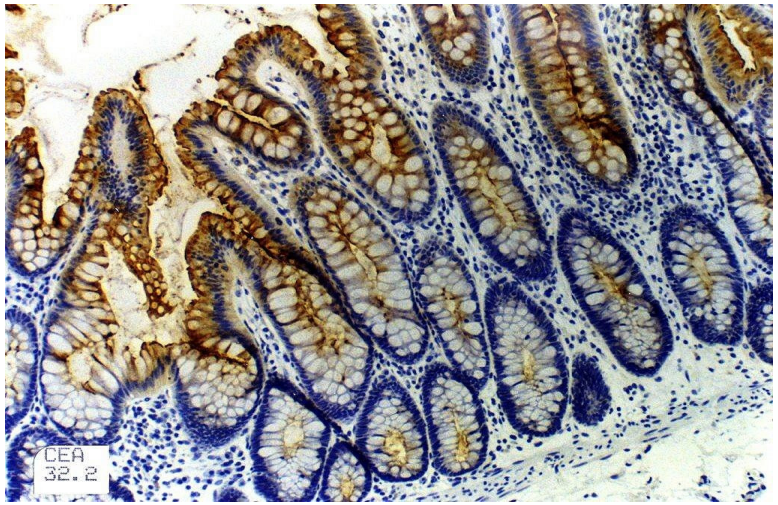
<u>Inmuno Histo Química</u> (IHQ): BCL-2 y CEA

La debilitación de los antígenos causada por el xilol es eliminada con el aceite mineral resultando en una señal IHQ más fuerte. [Matthews, 1981]









Aclarando con Aceite mineral + IP

(2009 - Peshkov): IP (70% a puro) → **IM** a 5:1 (M=1/5) a 50º C → **IM** a 2:1 (M=1/3) a 50º C → M a 50º C → parafina a 60º C

Evaluación cuantitativa: 29 tipos de tejidos;16 tinciones de HQ; 4 anticuerpos; 56 pares de láminas; 5 árbitros; 560 resultados (Agosto 2007)

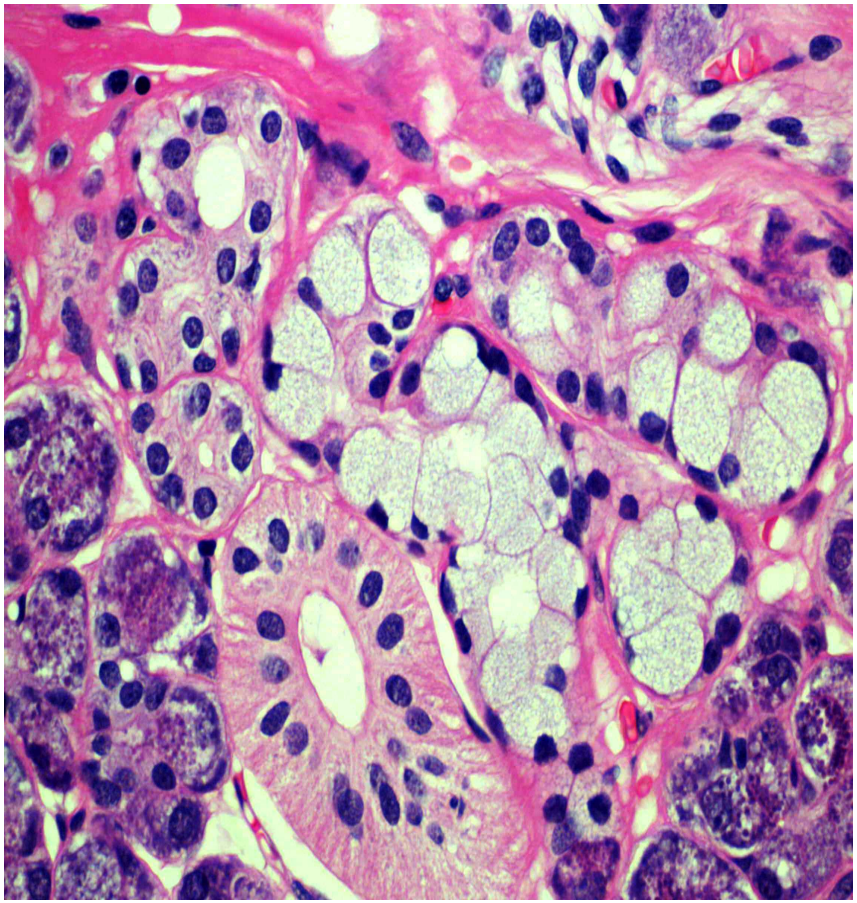
Comparación de microtomía: X^2= ns P>0,14

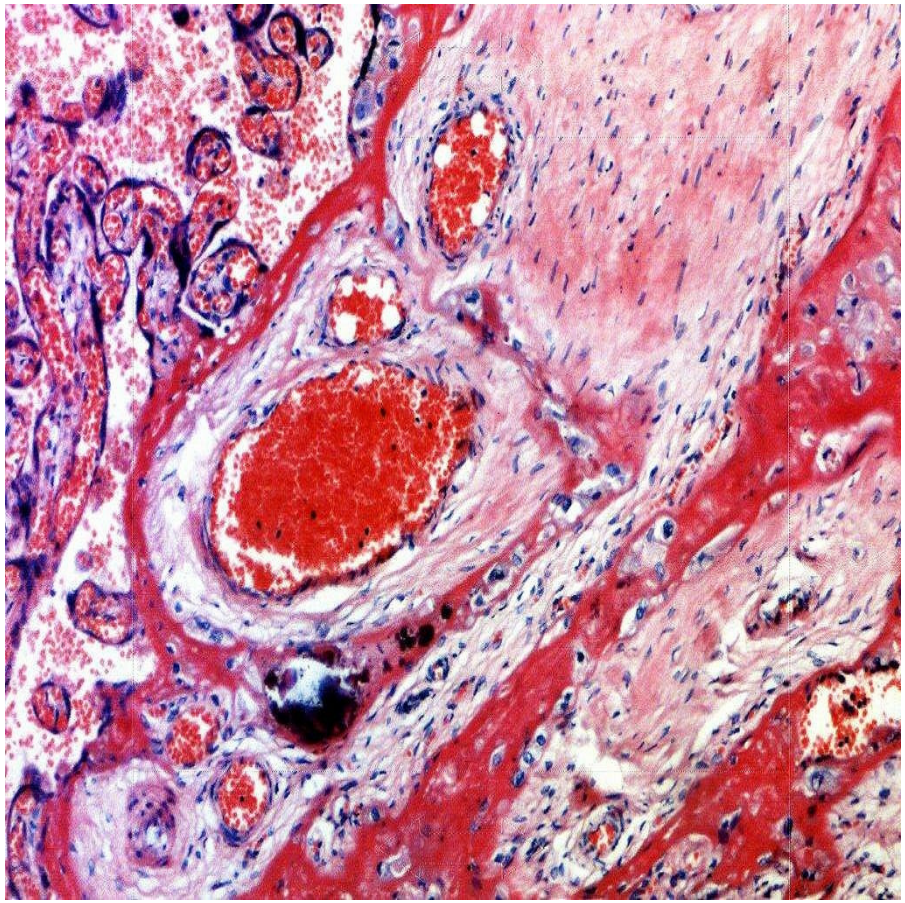
Valor diagnóstico: X^2 = ns P>0.001

Procesando con la mezcla **IM**

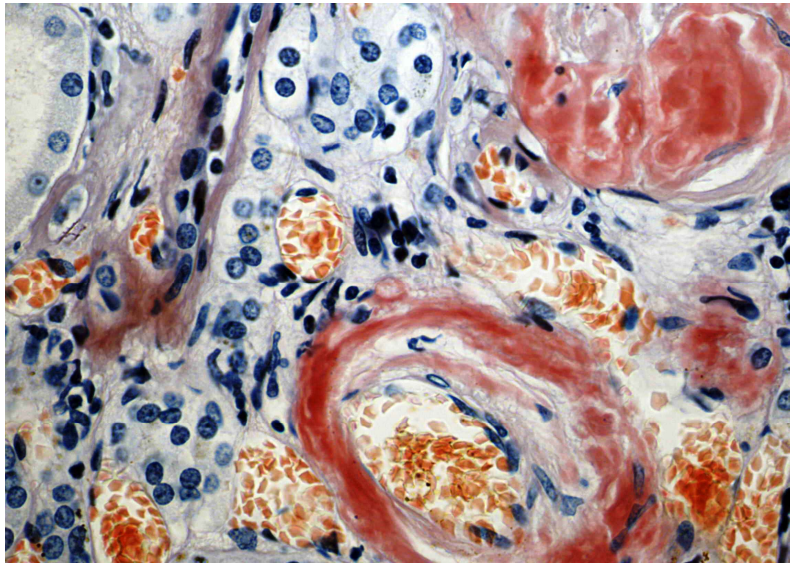
(Desarrollada por *MV Peshkov*)*

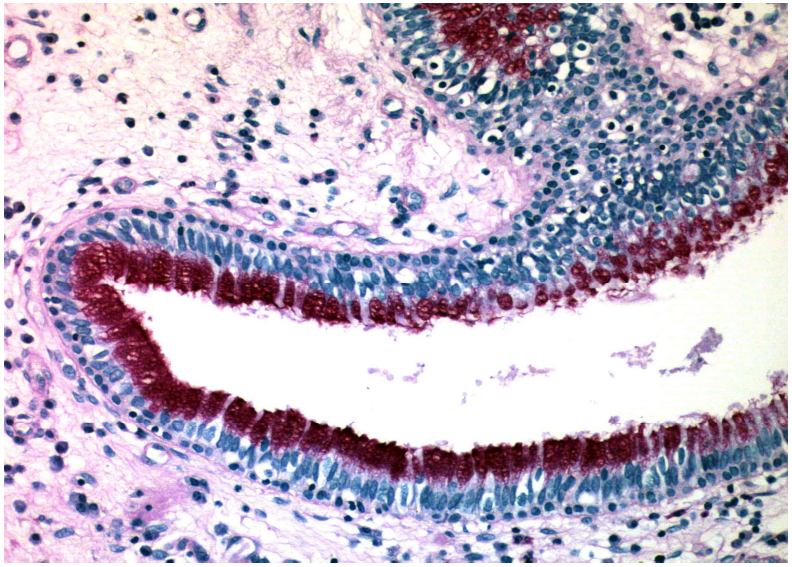
* BUESA RJ & PESHKOV MV: Histology without xylene. *Ann.Diag.Pathol.,*2009; 13(4):246-256

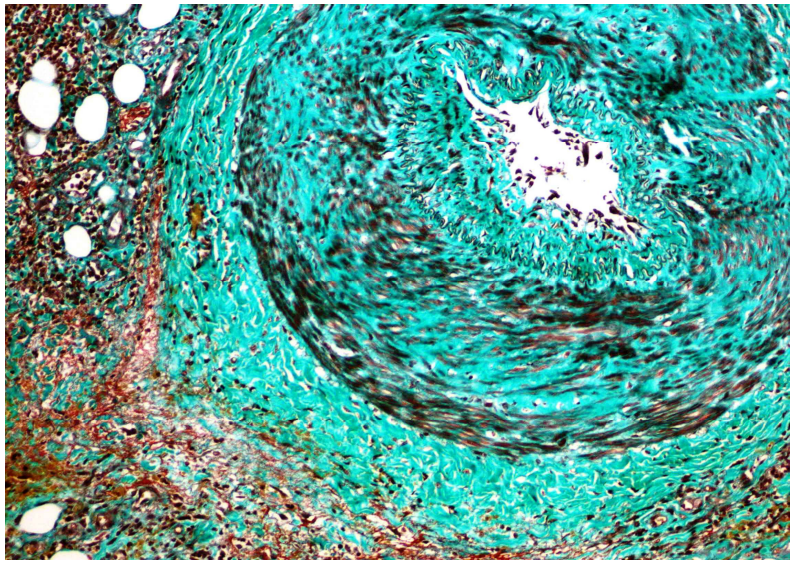


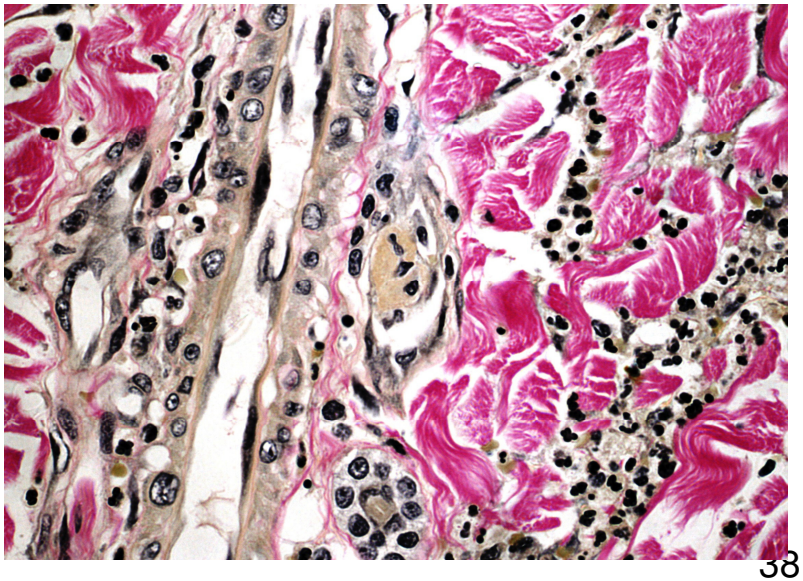


Tejidos procesados con la mezcla **IM**









Opción 1:

Fijación → iso-propanol (IP) → parafina

[Accesible a todos los procesadores].

Opción 2 (mezclas IM):

Fijación → IP → (mezcla **IM**) → aceite mineral → parafina

[Una infiltración más delicada que requiere 7 estaciones con temperatura controlable].

Opción 3:

Fijación → IP → IP: M a 1:1 → parafina

[La mezcla IP: M (1:1) se puede usar en la primera estación de parafina, y se dobla el tiempo en la segunda].

Recomendación:

Opción 2 para procesar manualmente o con procesadores cerrados con retorta.

Opción 3 para procesadores abiertos.

Protocolos con la opción 2 (mezcla **IM**).

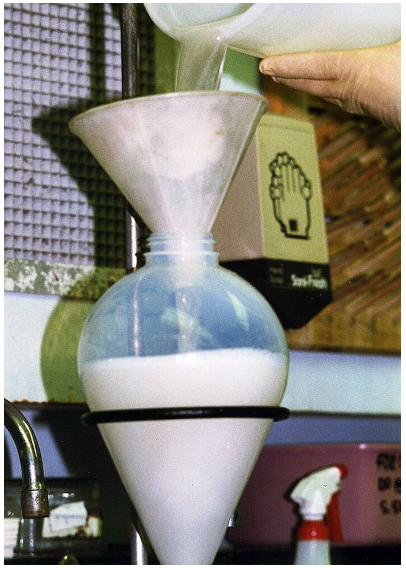
Station	Reagent	Manual processing		Automated processing (a)	
		time (hours)	Temp. (ºC)	Time (min.)	Temp (ºC)
1	Formaldehyde	(b)	20	25 (d)	35
2	Formaldehyde	(b)	20	25 (d)	35
3	70% IP	1	20	15	35
4	80% IP	1	20	15	35
5	90% IP	1	20	15	35
6	95% IP	1	20	15	35
7	Pure IP	1	20	15	35
8	IM (5:1) (e)	1.5	50	90	50
9	IM (2:1) (e)	1.5	50	90	50
10	Mineral oil	16 (c)	50	60	50
11	Paraffin wax	1	60	45	58
12	Paraffin wax	1	60	20	58
13	Paraffin wax	1	60	20	58
14	Paraffin wax	1	60	50	58
Total time		12 h + 16 h overnight = 28 h		8.3 h	
Clearing + infiltrating as % of the total time		23 h / 28 h = 82%		6.25 h / 7.5 h = 83% (f)	

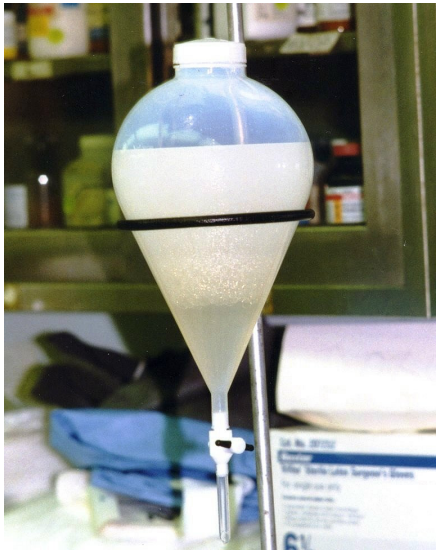
Procesamiento manual **IM** en el laboratorios de Taganrog (Rusia)

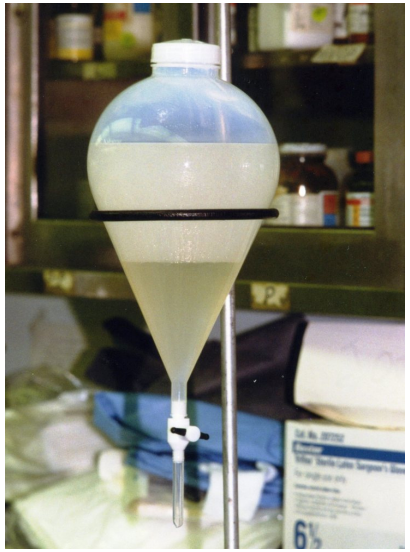
[Unos **19.000** casos y **650** autopsias anuales con **320** bloques / día]

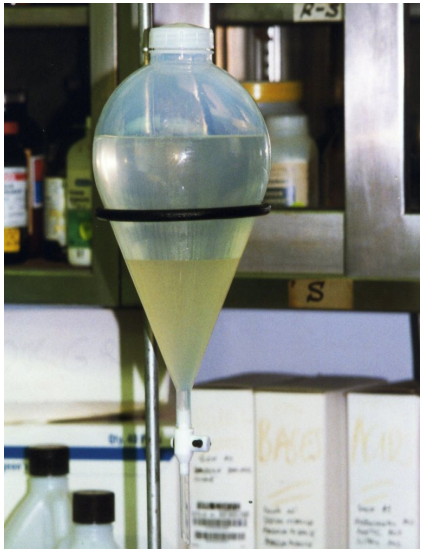
¿Cómo se eliminan las mezclas de alcohol y aceite mineral?

Debido a sus polaridades, los alcoholes y el aceite mineral se **separan físicamente a temperatura ambiente** en un embudo de separación.





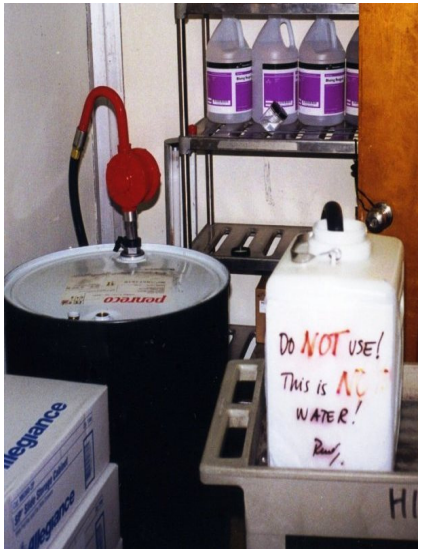


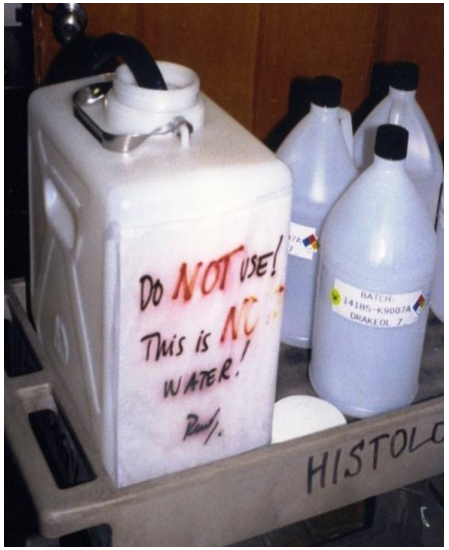


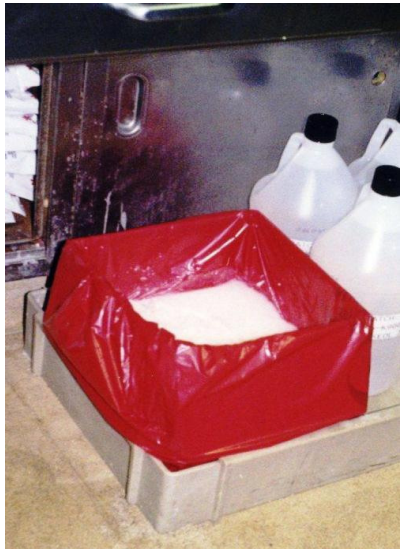
Barril con 208 L (55 galones) de Drakeol-7 transferidos al laboratorio.

Desechando el aceite mineral usado

El aceite mineral usado se mezcla con la parafina usada y se incinera.





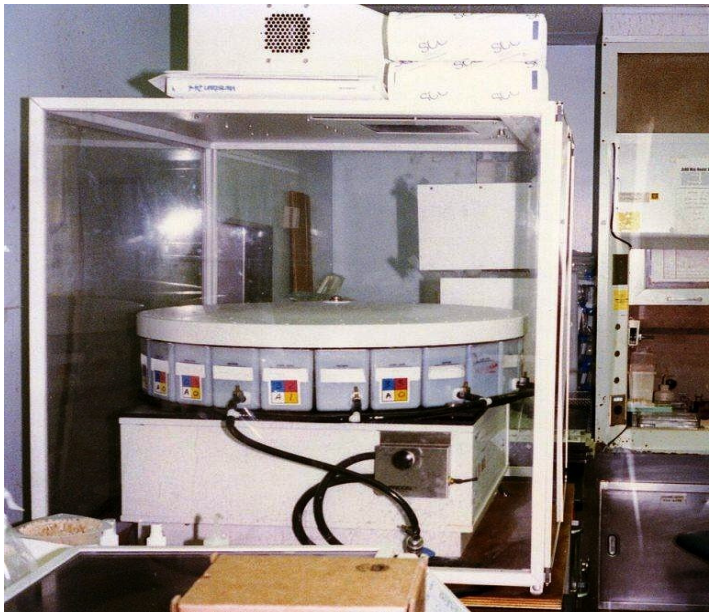


SEGUNDO DESAFÍO

DESPARAFINAR SIN XILOL

ANTES DE TEÑIR

Tinción manual y automática (expuesta, en campana de gases y auto-protegida.)



Agentes desparafinantes que no contienen xilol.

1. Aqua-DePar
2. EZ-Dewax
3. Skip Dewax
4. Trilogy®
5. Ultra Clear
6. Clearium
7. Bond Dewax®
8. Los auto-teñidores de IHQ de DAKO, Leica y Ventana usan soluciones deparafinantes sin xilol.
9. Buffer de citrato (pH7) con Tween 20 (en el protocolo HIER)

El protocolo **HIER** es práctica común en todos los laboratorios que hacen IHQ y ha hecho “aceptable” el calentar las láminas.

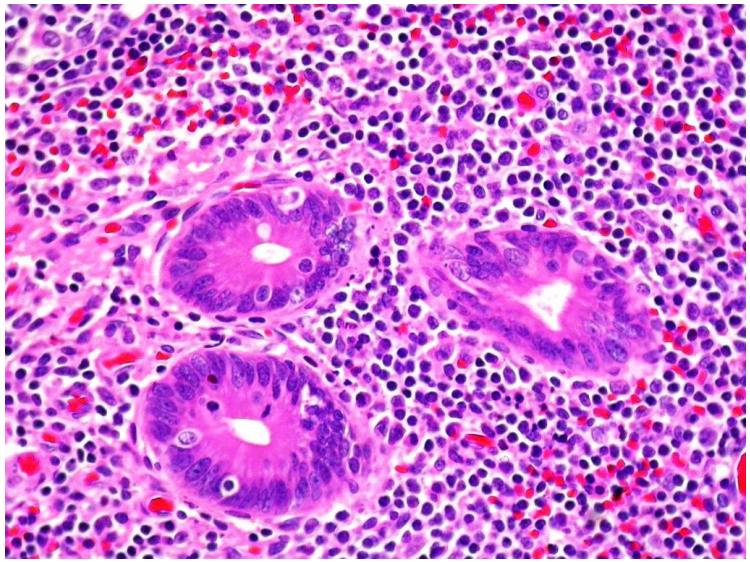
- 2001 (Falkeholm *et al.*) [Suecia]→ “Yes”, “Fairy” y “Ocean Handdisk”
- 2008 (Peshkov) [Rusia]→ “Fairy” que resultó f **4** veces más rápido y **750** veces más barato que usando xilol.
- 2008 (Montgomery) [Escocia]→ “Persil”
- 2010 (Henwood)[Australia]→ “Spree” resultando **839** veces más barato que usando “Bond Dewax®”
- 2010 (Goins)[USA]→ “Tween 20” al 1,25%
- 2010 (Moore)[US Islas Vírgenes]→ “ultra-Palmolive original”
- 2011 (Henwood)[Australia]→ introdujo la cafetera como fuente de agua caliente para diluir “Spree”.
- 2012 (Buesa)[USA]→ “ultra-Palmolive original” con cafetera

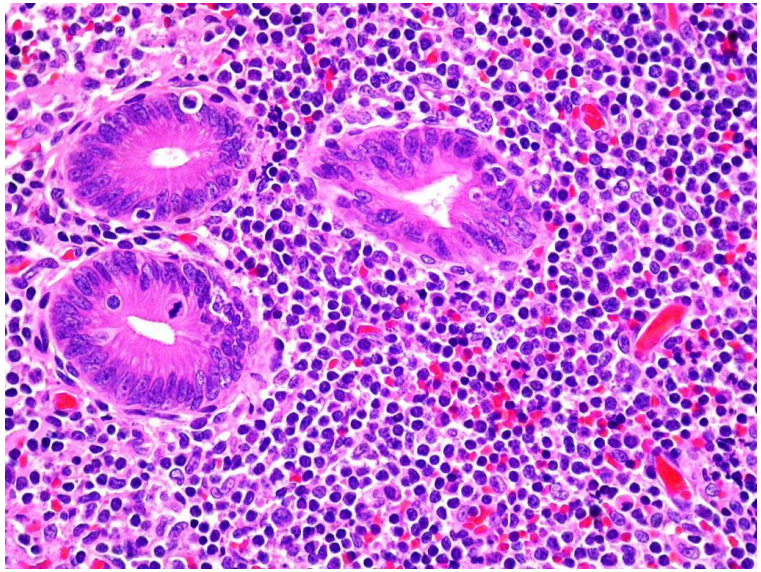
Protocolo para usar la solución de jabón líquido (SJL)

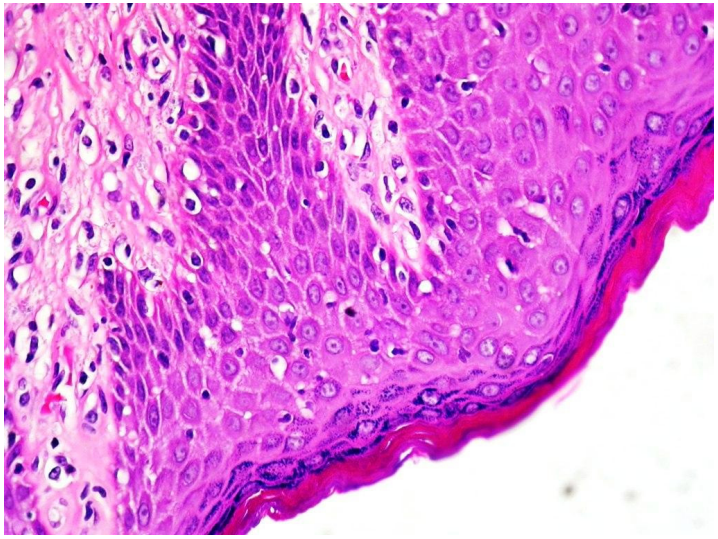
- Disolver 40 mL de un jabón líquido limpia platos (SJL) en 2 litros de agua destilada para hacer una solución al 2% v/v.
- Drenar las láminas antes de secarlas a 60º C por 20 minutos.
- Poner las láminas en la SJL a 90º C por 1 minuto.
- Transferirlas a otro contenedor con SJL a 90º C por 1 minuto.
- Lavar las láminas en agua potable a 90º C por 30 segundos.
- Volverlas a lavar en agua potable a 90º C por otros 30 segundos.
- Lavarlas en agua potable a 45º C por 30 segundos.
- Ponga las láminas en agua destilada a temperatura ambiente y proceder a colorearlas en forma usual.

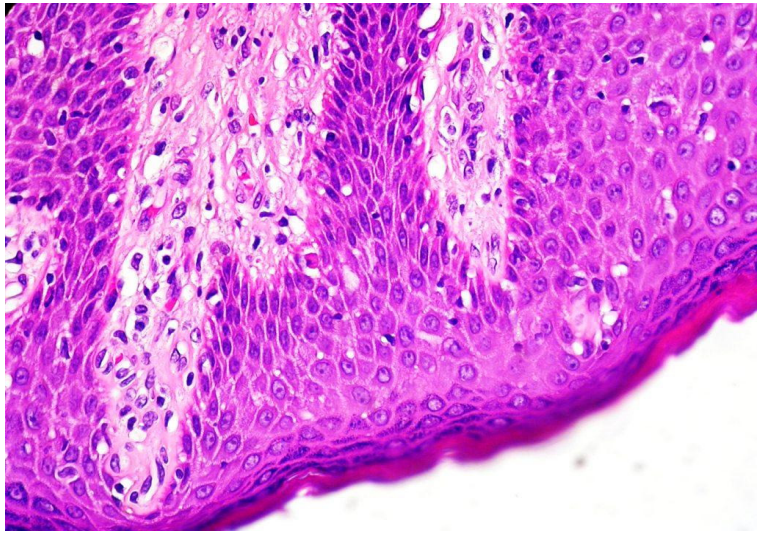
El procedimiento dura 3,5 – 4 minutos y cuesta €0.03 cada 100 láminas cuando la SJL (9,0 litros) se renueva cada 200 láminas.

¿Cuáles de estas láminas fueron desparafinadas con la **SJL** durante el experimento corroboratorio conducido en Australia por *T. Henwood?*



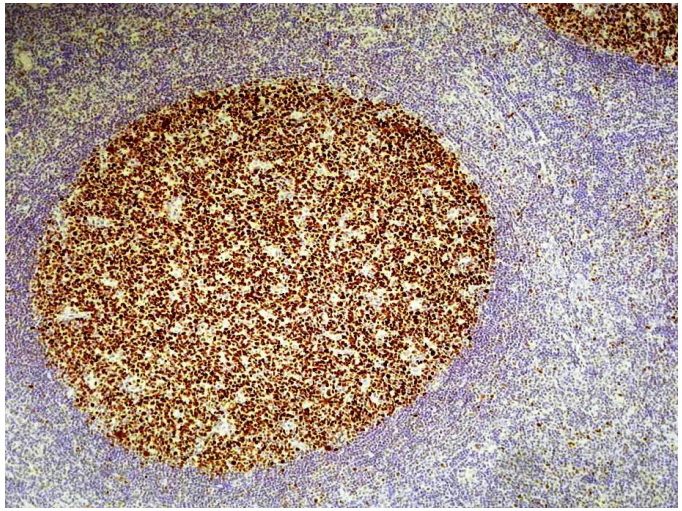






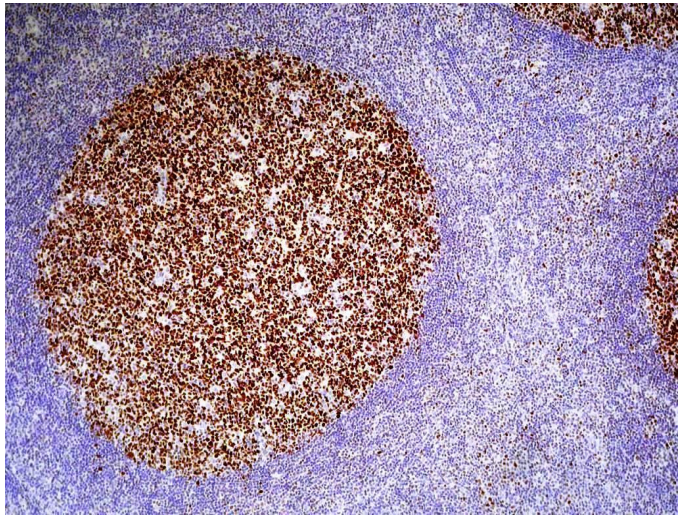
BCL-6 reacciones también del experimento en Australia

[Henwood (2010)**:** The application of heated detergent dewaxing and rehydration to immunohistochemistry. *Biotech. & Histochem., 1-5*]



- El efecto extractivo del xilol * se elimina usando la **SJL**

* Matthews (1981): Influence of clearing agent on immunohistochemical staining of paraffin-embedded tissue. *J.Clin.Pathol.*:34(1):103-105



- Con la **SJL** los tejidos procesados sin xilol tienen unas señal más fuerte permitiendo diluciones mayores de los anticuerpos con reducción en los costos.

Usando la SJL antes de teñir :

El protocolo ha sido **validado** y **corroborado** y es más sencillo, barato, rápido y, principalmente más **seguro** al eliminar el xilol de este paso.

FACILIDAD: sólo 5 baños, 2 con la SJL al 2 % a 90º C y 3 con agua potable (2 at 90º C y 1 a 45º C)

RAPIDEZ: el protocolo sólo requiere unos 4 minutos / grupo

ECONOMÍA: costo de € 0,03 / 100 láminas, **750** veces más barato que usando xilol + etanol y **839** que con "Bond Dewax®".

También 5 baños de agua cuestan entre 1/14 y 1/5 del costo de 1 auto-teñidor.

La fuente de agua a 90º C puede ser una cafetera de 2 litros de capacidad con el jabón disuelto en el agua.

Instalación en un laboratorio en Belgorod, Rusia

TERCER DESAFIO
PREPARAR PARA
MONTAR
SIN XILOL

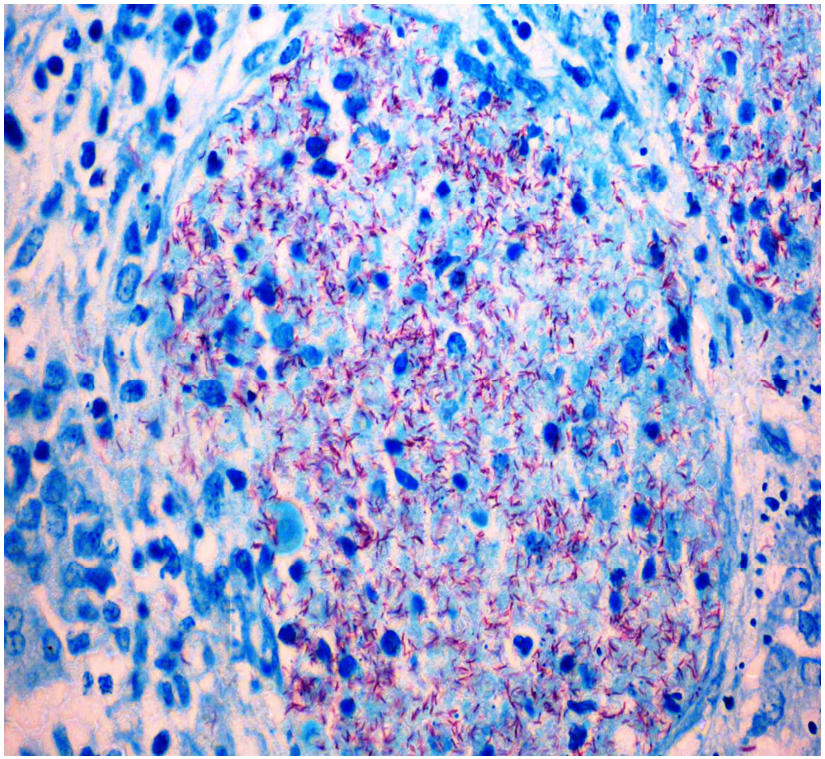
"**Aclarar**" los cortes antes de montar.*

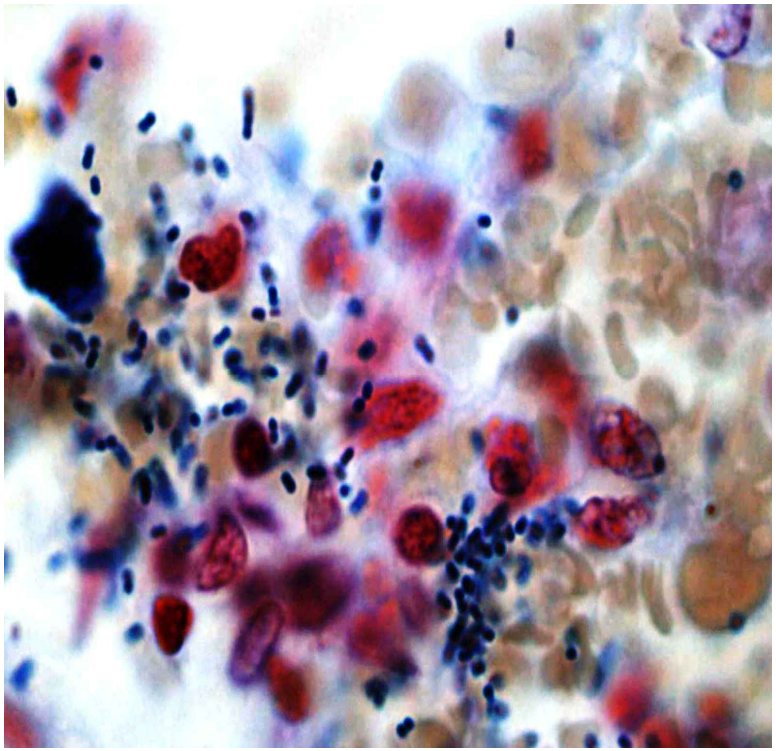
- Los cortes que han sido desparafinados con la SJL se tiñen como de costumbre.
- Después de teñir se lavan con etanol o con 2-propanol y se **escurren** totalmente.
- Se secan en un **horno a 60º C** durante 5 ó 10 minutos
- Los cortes teñidos están listos para ser montados con un medio fluido semejante al "Cytoseal™60" de Thermo Scientific.

* Buesa RJ: Coverslipping without xylene. *Biotechnic & Histochemistry, 2010; 85(4):269-270*

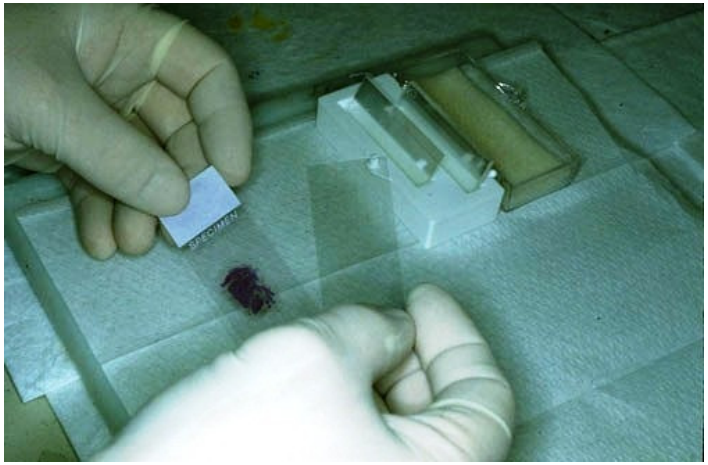
Eliminar el xilol después de teñir (antes de montar)

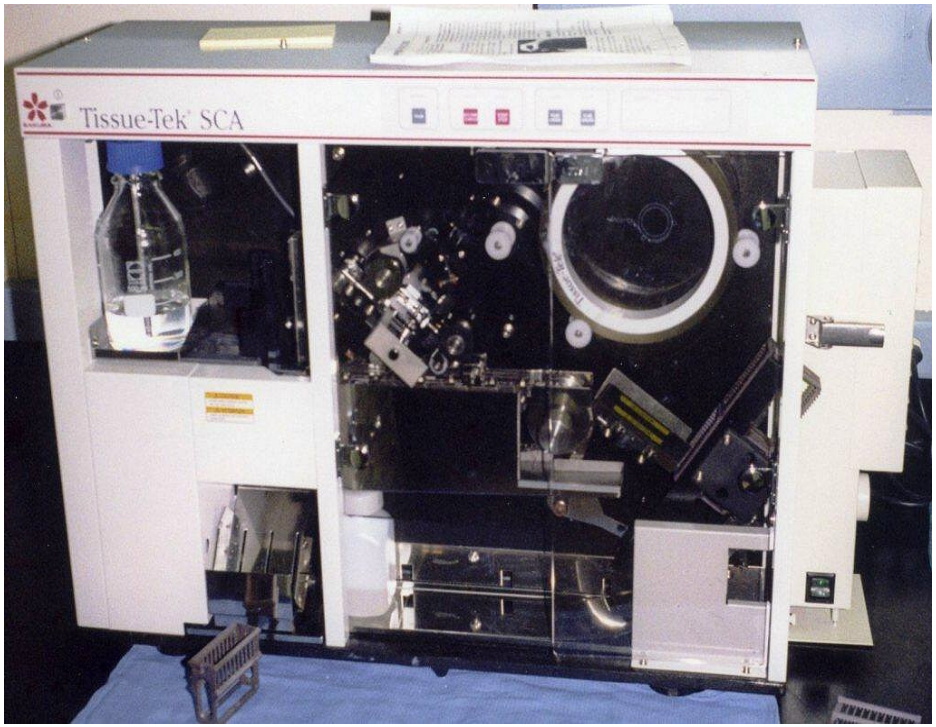
- Falkeholm *et al*. (2001): cortes deparafinados con la SJL → teñir → secados al horno a 60º C por 5 – 10 minutos → montar
- Peshkov (2008): esa misma secuencia se usó para cubrir las láminas usadas en la validación de la SJL lo cual significa que ambos métodos (SJL y secado al calor) se validaron simultáneamente.





Montar manualmente sin protección, con una campana portátil o con un montador de cinta con filtro de carbón.





Montar manual o automáticamente

- El **38**% de los laboratorios en EEUU montan manualmente y en el **18**% sin campana de gases.

- Los cortes teñidos secados al calor se montan como de costumbre as usual con el medio para montar más diluido.
- Para usar un montador automático sólo hay que asegurar que el líquido para montar sea suficientemente fluido.
- Algunos equipos “integrados” (teñidor+montador) requerirán una campana de mayor tamaño.

CUARTO DESAFIO
LIMPIAR
los procesadores de tejidos y los instrumentos para incluir
SIN XILOL

Limpiar (desparafinar) los procesadores de tejidos.

- Los procesadores se pueden desparafinar usando una solución 2% vol / vol en 2-propanol de un limpiador fuerte de cristalería de laboratorio como “Pyroneg®” en lugar del xilol.

Hasta ahora se ha discutido la **eliminación del xilol** de:

1- **Procesar tejidos** (substituido con una mezcla de 2-propanol y aceite mineral).

2- **Desparafinar cortes** antes de teñir (con una sol. acuosa al 2% de un jabón líquido limpia platos).

3- **Secar en un horno los cortes teñidos** antes de montarlos.

4- **Montar** con el medio diluido a mano o con montador automático.

5- **Desparafinar los procesadores de tejidos** (con una sol. al 2% de un limpiador fuerte de cristalería de laboratorio en 2-propanol).

Después de vencer esos 4 desafíos

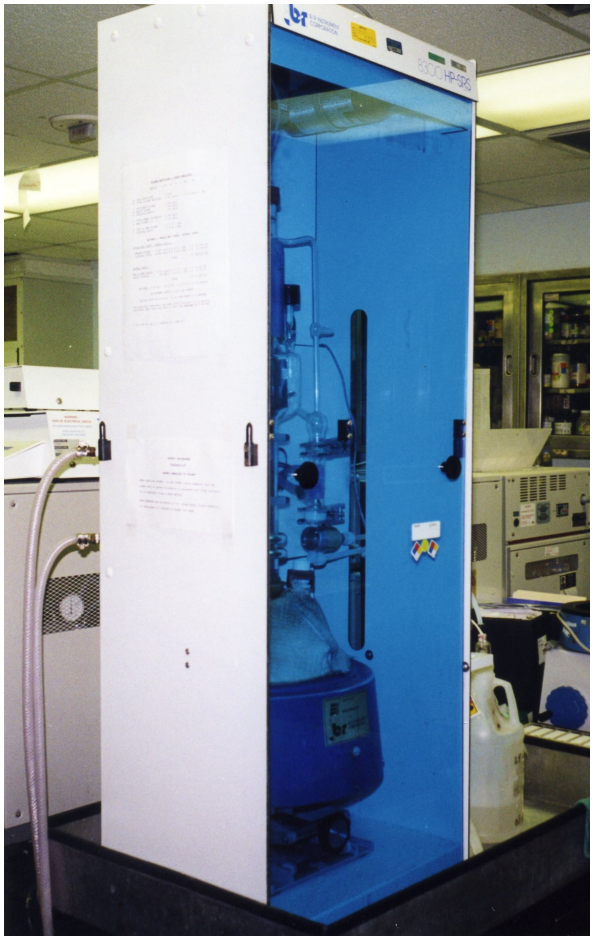
¿Hay que reciclar **XILOL** si **NO** se usa?

Los procesadores automáticos (abiertos y cerrados) son fuente del xilol usado para reciclar o eliminar.

6 – **Reciclar** XILOL es otra fuente de exposición.

54% de los laboratorios en EEUU * reciclan xilol, pero no necesitarían hacerlo si el xilol se elimina.

¡Tampoco habría xilol que eliminar!



* BUESA RJ: Histology safety: now and then. *Ann.Diag.Pathol.*, 2007; 11(5):334-339

En el laboratorio libre de XILOL :

- **DESHIDRATAR** con 2-propanol.
- **ACLARAR** con una mezcla de aceite mineral y 2-propanol (**IM**).
- **INFILTRAR** con aceite mineral y parafina.
- **DESPARAFINAR** los cortes antes de teñir con una sol. acuosa al 2% v/v de jabón lava platos (**SJL**) a 90º C
- **SECAR AL HORNO** los cortes teñidos antes de montarlos con el medio diluido.
- **LIMPIAR** los procesadores con una sol. acuosa al 2% v/v de un limpiador fuerte de cristalería de laboratorio.
- **RECICLAR** y **ELIMINAR** xilol **no será necesario**.

El resultado es un laboratorio al fin

LIBRE de **XILOL**

donde el trabajo transcurre en un ambiente más

SEGURO

RESUMEN

1. **NO EXISTE** un substituto del FORMOL capaz de producir le imagen requerida por los patólogos. Por lo tanto la **UNICA OPCION** satisfactoria es continuar fijando con **MENOS CANTIDAD (2:1)** y tomando las **PRECAUCIONES NECESARIAS**.
2. **EXISTEN** substitutos para el XILOL en todas las tareas de histopatología donde se usa. Por lo tanto su eliminación es **totalmente posible** y los resultados que se obtienen son **completamente equivalentes** a los obtenidos con el xilol.