



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud

Procedimientos de Laboratorio

LABORATORIOS LOCALES I

LABORATORIOS LOCALES II

manua
l



2013



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ

MINISTRA

Midori Musme de Habich Rospigliosi

VICEMINISTRO

José Carlos del Carmen Sara

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

ALTA DIRECCIÓN

Jefe

César Cabezas Sánchez

Subjefe

Marco Bartolo Marchena

ÓRGANOS DE LÍNEA

Centro Nacional de Alimentación y Nutrición

Director General

Oscar Aquino Vivanco

Centro Nacional de Control de Calidad

Director General

Ruben Tabuchi Matsumoto

Centro Nacional de Productos Biológicos

Director General

Alberto Valle Vera

Centro Nacional de Salud Intercultural

Director General

Oswaldo Salaverry García

Centro Nacional de Salud Ocupacional y Protección del Ambiente para la Salud

Director General

Estela Ospina Salinas

Centro Nacional de Salud Pública

Director General

Máximo Espinoza Silva

ÓRGANOS DE ASESORAMIENTO

Oficina General de Asesoría Técnica

Director General

Pedro Valencia Vázquez

Oficina General de Asesoría Jurídica

Marita Mercado Zavaleta

Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnología

Director General

Gabriela Minaya Martínez

ÓRGANOS DE APOYO

Oficina General de Administración

Directora (e) General

Elizabeth Ojeda Alegría

Oficina General de Información y Sistemas

Directora General

Javier Vargas Herrera

COMITÉ EDITOR

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

PRESIDENTE

César Cabezas Sánchez

MIEMBROS

Zuño Burstein Alva

Rosario Belleza Zamora

Daniel Cárdenas Rojas

Flor Fuentes Paredes

Lucio Huamán Espino

Oswaldo Salaverry García

Diana Vergara Nuñez

Liliana Vigil Romero

Secretaria

Bertha Huarez Sosa

manual

Procedimientos de Laboratorio

LABORATORIOS LOCALES I
LABORATORIOS LOCALES II

ELABORADO POR:

Dra. Susana Zurita Macalupú

LIMA, 2013

Catalogación hecha por el Centro de Información y Documentación Científica del INS

Zurita Macalupú, Susana
Procedimientos de laboratorio : manual : laboratorios locales I : laboratorios
locales II / Elaborado por Susana Zurita Macalupú. – Lima: Ministerio de Salud,
Instituto Nacional de Salud, 2013.
554 p. : il., tab. ; 20.5 x 29.5 cm.

1. MANUALES DE LABORATORIO 2. EXPOSICIÓN A AGENTES
BIOLÓGICOS 3. ESTERILIZACIÓN 4. MANEJO DE ESPECÍMENES 5.
PERÚ

- I. Perú. Ministerio de Salud
- II. Instituto Nacional de Salud (Perú)

ISBN: 978-612-310-018-6

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N.º 2013-06495

1era edición (dic, 1999)

2da edición (mayo, 2013)

2000 ejemplares

© Ministerio de Salud, 2013

Av. Salaverry cuadra 8 s/n, Jesús María, Lima, Perú

Teléfono: (511) 431-0410

Telefax: (511) 315-6600 anexo 2669

Página web: www.minsa.gob.pe

© Instituto Nacional de Salud, 2013

Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú

Teléfono: (511) 748-1111

Página web: www.ins.gob.pe

Publicación aprobada con:

- Resolución Viceministerial 011 - 99 - SA - DGSP

- Resolución Viceministerial 290 - 99 - J - OPD / INS

La versión electrónica de este documento se encuentra disponible en forma gratuita
en la página web www.ins.gob.pe

Se autoriza su reproducción total o parcial, siempre y cuando se cite la fuente.

Presentación

El Instituto Nacional de Salud, tiene como uno de sus fines el que la población del país cuente con diagnósticos de laboratorio de calidad. Una de las más importantes estrategias para este fin es fortalecer la red de laboratorios.

Para enfocar la atención de pacientes en los servicios de salud, es importante considerar los aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio, que permitan valorar más adecuadamente tanto el diagnóstico como el tratamiento.

Es necesario contar con procedimientos de laboratorio estandarizados en todos los niveles de atención y, en particular, en el primer nivel de atención, que es donde se da el primer contacto de la población con los servicios de salud. El Instituto Nacional de Salud, en cumplimiento de una de sus funciones de fortalecer las capacidades de diagnóstico para el control y prevención de riesgos y daños asociados a enfermedades transmisibles y no transmisibles, saca a luz la segunda edición del Manual Procedimientos de Laboratorio para el primer nivel de atención.

Este Manual contiene los procedimientos más comunes utilizados en un laboratorio básico, e incluye una descripción simple y amigable de los pasos a dar desde la obtención de las muestras biológicas (sangre, orina, esputo, secreciones, etc.), así como los procedimientos de laboratorio de microbiología básica, hematología y otros, con datos actualizados frente a la versión que saliera en el año 1999.

Es de esperar que el desarrollo de nuevas técnicas de laboratorio, y las sugerencias de los usuarios de este Manual, obliguen a versiones más actualizadas, para lo cual el INS siempre estará disponible.

Dr. César Cabezas Sánchez
Jefe institucional
Instituto Nacional de Salud

Índice

Procedimientos generales de laboratorio	11		I
Uso, cuidados y mantenimiento preventivo de equipos y materiales de laboratorios	47		II
Sangre	77		III
Espuito	175		IV
Orina	207		V
Parasitología y micología	241		VI
Secreciones	323		VII
Bacteriología	341		VIII
Bioquímica sanguínea	381		IX
Serología	401		X
Red de laboratorios	449		XI
Anexos	479		XII

PROCEDIMIENTOS GENERALES DE LABORATORIO

PROCEDIMIENTOS DE BIOSEGURIDAD.....	13	ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN DE MATERIAL.....	35
MICROORGANISMOS INFECTANTES POR GRUPOS DE RIESGO.....	13	Esterilización.....	35
LABORATORIOS BÁSICOS NIVELES DE BIOSEGURIDAD 1 y 2.....	17	Desinfección intensiva.....	35
Las reglas más importantes.....	17	DESECHO DE MUESTRAS Y MATERIALES INFECTADOS.....	36
Medidas en caso de accidentes.....	22	MATERIAL CONTAMINADO PARA ELIMINACIÓN	36
Material de bioseguridad recomendado.....	23	Incineración.....	39
PROCEDIMIENTOS PARA LA ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN DE MATERIAL.....	25	Entierro de desechos.....	40
OBJETIVOS.....	25	MATERIAL CONTAMINADO PARA EL TRATAMIENTO EN AUTOCLAVE Y REUTILIZACIÓN.....	40
MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN	26	Esterilización y limpieza de los recipientes no desechables.....	40
Calor húmedo.....	26	TRANSPORTE DE DESECHOS.....	44
Calor seco.....	28		
Desinfección intensiva por inmersión en productos químicos.....	30		
Desinfección por frotación con un producto químico.....	33		

PROCEDIMIENTOS DE BIOSEGURIDAD

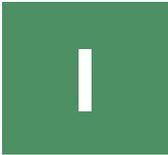
- ◆ La bioseguridad es un conjunto de procedimientos técnicos que se debe practicar diariamente y que no debe olvidar el personal de laboratorio.
- ◆ Los procedimientos de bioseguridad tienen por finalidad:
 - **PROTEGER**
Al personal de laboratorio contra la exposición innecesaria e injustificada a microorganismos infecciosos.
 - **EVITAR**
La contaminación de las muestras que puede echar a perder el trabajo del laboratorista con resultados falsos.
 - **MANTENER**
Los microorganismos infecciosos dentro del ambiente del laboratorio.

MICROORGANISMOS INFECTANTES POR GRUPOS DE RIESGO

- ◆ **Es importante** conocer los tipos de microorganismos infectantes con los que trabajamos, para tomar las medidas de bioseguridad respectivas.
- ◆ Los microorganismos infectantes se clasifican por grupos de riesgo, dependiendo de:
 - La capacidad infectante del microorganismo.
 - Los modos de transmisión (por ejemplo: aerosoles).
 - Si son prevenibles por medio de inmunización (vacuna contra la hepatitis B, fiebre amarilla, etc.).
 - Si se dispone de medidas eficaces para el tratamiento contra el microorganismo infectante (por ejemplo: uso de antibióticos).



GRUPO DE RIESGO	MICROORGANISMO
I	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> cepa K12
II	<p>BACTERIAS, CHLAMYDIAS, MYCOPLASMAS Y RICKETTSIAS <i>Actinobacillus</i> spp. <i>Actinomadura pelletieri</i>, <i>Actynomices</i> spp <i>Bacillus cereus</i>. <i>Bacteroides</i> spp. <i>Bartonella</i> spp. <i>Bordetella pertussis</i> (V). <i>B. parapertussis</i>. <i>B. bronchiseptica</i>, <i>Borrelia</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp. <i>Cardiobacterium hominis</i>. <i>Chlamydia pneumoniae</i>, <i>C. psittaci</i> (cepas no aviares), <i>C. trachomatis</i>. <i>Clostridium botulinum</i> (T), <i>C. chauvoei</i>, <i>C. difficile</i>, <i>C. haemolyticum</i>, <i>C. histolyticum</i>, <i>C. novui</i>, <i>C. perfringens</i>, <i>C. septicum</i>, <i>C. sordelli</i>, <i>C. tetani</i> (T, V) <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (T,V), <i>C. minutissium</i>, <i>C. pseudotuberculosis</i>, <i>Edwardsiella tarda</i>, <i>Ehrlichia</i> spp. <i>Eikenella corrodens</i>, <i>Enterobacter</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> <i>Escherichia coli</i> (excepto las cepas no patógenas) <i>Flavobacterium</i> spp. <i>Francisella tularensis</i> (tipo B). <i>F. novocida</i> <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Gardnerella vaginalis</i>. <i>Haemophilus</i> spp. <i>Helicobacter pylori</i> <i>Klebsiella</i> spp., <i>Legionella</i> spp., <i>Leptospira interrogans</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Mycobacterium</i> spp. (excepto <i>Mycobacterium tuberculosis</i>), <i>M. bovis</i> (no BCG), <i>M. africanum</i>, <i>M. leprae</i>, <i>M. microti</i> y <i>M. ulcerans</i> <i>Mycoplasma</i> spp., <i>N. gonorrhoeae</i>, <i>N. meningitidis</i> (V), <i>Nocardia asteroides</i>, <i>N. brasiliensis</i>, <i>N. farcinica</i>, <i>Pasteurella</i> spp. <i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Plesiomonas shigueloides</i>, <i>Porphyromonas</i> spp. <i>Prevotella</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Providencia</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Rhodococcus equi</i>, <i>Rickettsia</i> spp. <i>Salmonella paratyphi</i> A, B, C (V). <i>Salmonella</i> spp. (excepto <i>S. typhi</i>), <i>Serpulina</i> spp. <i>Shigella boydii</i>, <i>S. Dysenteriae</i> (excepto tipo 1). <i>S. flexneri</i>, <i>S. sonnei</i>, <i>S. aereus</i> <i>Streptobacillus moniliformis</i>, <i>Streptococcus</i> spp. <i>Treponema carateum</i>, <i>T. pallidum</i>, <i>T. vincentii</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i>, <i>Vibrio cholerae</i>, <i>V. para haemolyticus</i>, <i>V. vulnificus</i>, <i>Vibrio</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i>, <i>Y. pseudotuberculosis</i></p> <p>HONGOS <i>Aspergillus fumigatus</i> (A) <i>Candida albicans</i> (A), <i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus neoformans</i> (A), <i>Emmonsia parva</i>. <i>Epidermophyton floccosum</i> (A) <i>Fonsecaea</i> spp. <i>Madurella</i> spp. <i>Microsporium</i> spp. (A). <i>Penicillium mameffeii</i> (A) <i>Scedosporium apiospermum</i>, <i>S. prolificans</i>. <i>Sporothrix schenckii</i>. <i>Trichophyton</i> spp. A: posible efecto alérgico</p> <p>VIRUS Adenoviridae: <i>Adenovirus</i> Adenoviridae: <i>Adenovirus</i> Arenaviridae: complejos virales LCM - Lassa: virus de la coriomeningitis linfocítica (cepas no neurotrópicas), virus Mopeia, otros complejos virales LCM - Lassa. Complejos virales Tacaribe: otros complejos virales Tacaribe. <i>Astroviridae</i> Bunyaviridae: virus <i>Bunyamwera</i> V de la encefalitis de California, virus <i>Germiston</i>, v. <i>Bhanja</i> virus <i>Hantavirus V Puumala</i> , v <i>Prospect Hill</i>, otros <i>hantavirus Nairovirus</i>, virus <i>Hazara</i>, <i>Flebovirus</i> virus de los flebotomos V <i>Toscana</i>. Otros <i>bunyavirus</i> de patogenicidad conocida. <i>Caliciviridae:</i> <i>Virus Norwalk</i>. Otros <i>Caliciviridae</i> <i>Coronaviridae</i> Herpesviridae: <i>Citomegalovirus</i> <i>Virus Epstein - Barr</i> <i>Herpes simplex virus</i> tipos 1 y 2 <i>Herpes varicella - zoster</i> <i>Virus linfotrópico humano B</i> (HBLV - HHV6) <i>Herpes virus humano 7</i>, <i>Herpes virus humano 8</i>. <i>Orthomyxoviridae:</i> <i>Virus de la influenza</i> tipos A, B y C <i>Ortomixovirus</i> transmitidos por garrapatas: <i>Virus Dhori</i> y <i>Thogoto</i>. Papovaviridae: virus BK y JC, virus del papiloma humano. Paramyxoviridae: virus del sarampión, virus de las paperas. <i>virus de la enfermedad de Newcastle</i> <i>virus de la parainfluenza</i> tipos 1 a 4 <i>virus respiratorio sincitial</i> Parvoviridae: <i>Parvovirus humano</i> (B 19) Picornaviridae: virus de la conjuntivitis hemorrágica (AHC). <i>Virus coxsackie</i>. <i>Echo virus de la hepatitis A</i> (<i>enterovirus humano</i> tipo 72), <i>Poliovirus</i>, <i>Rinovirus</i>. Poxviridae: <i>Buffalopox virus</i>, <i>Cowpox virus</i> <i>Elephantpox virus</i>. <i>Virus del nódulo de los ordeñadores</i> <i>Molluscum contagiosum</i>, <i>Orf virus</i> <i>Rabbitpox virus</i> (g) <i>Vaccinia virus</i>, <i>Yatapox virus</i> (Tana & Yaba) Reoviridae: <i>Coltivirus</i>, <i>Rotavirus humanos</i>, <i>Orbivirus</i> <i>Reovirus</i>, <i>Rhabdoviridae:</i> virus de la estomatitis vesicular Togaviridae: <i>Alfavirus</i>, virus <i>Bebaru</i>, virus <i>Onyong - nyong</i>, <i>Virus del río Ross</i>, virus del bosque <i>Semliki</i>, <i>Virus Sindbis</i>. Otros <i>alfavirus</i> conocidos <i>Rubivirus</i> (rubeola), <i>Toroviridae</i>.</p> <p>PARÁSITOS Protozoos: <i>Acanthamoeba castellani</i>, <i>Babesia microti</i>, <i>Babesia divergens</i>. <i>Balantidium coli</i>, <i>cryptosporidium</i> spp. <i>E. histolytica</i>. <i>Giardia lamblia</i>, <i>Leishmania</i> spp. (excepto <i>L. brasiliensis</i> y <i>L. donovani</i>), <i>Naegleria fowleri</i>, <i>Plasmodium</i> spp. <i>Humano</i> y <i>simico</i> (excepto <i>P. falciparum</i>), <i>Pneumocystis carinii</i>, <i>Sarcocystis sui hominis</i>, <i>Toxoplasma gondii</i>, <i>T. spiralis</i>, <i>Trypanosoma brucei brucei</i>, <i>T. brucei gambiense</i> Helmintos: Nemátodos <i>Ancylostoma duodenale</i>, <i>Angiostrogylus</i> spp. <i>Ascaris lumbricoides</i> (A), <i>A. suum</i> (A) <i>Brugia</i> spp. <i>Capillaria philippinensis</i>, <i>Dracunculus medinensis</i>, <i>Loa loa</i>, <i>Mansonella ozzardi</i>, <i>Necator americanus</i>, <i>Onchocerca volvulus</i>, <i>Strongyloides</i> spp., <i>Toxocara canis</i>, <i>Trichinella</i> spp., <i>Trichuris trichiura</i>, <i>Wuchereria bancrofti</i> Céstodos: <i>Hymenolepis diminuta</i>, <i>H. nana</i>, <i>Taenia saginata</i>. Tremátodos: <i>Clonorchis sinensis</i>, <i>C. viverrini</i>, <i>F. hepática</i>, <i>F. gigantica</i>, <i>Fasciolopsis buski</i> <i>Opisthorchis</i> spp. <i>Paragonimus westermani</i>, <i>Schistosoma haematobium</i>, <i>S. intercalatum</i>, <i>S. japonicum</i>, <i>S. mansoni</i>, <i>S. mekongi</i></p>



GRUPO DE RIESGO	MICROORGANISMO
III	<p>BACTERIAS, CHLAMYDIAS Y RICKETTSIAS <i>Bacillus anthracis</i>, <i>Brucella</i> spp., <i>Burkholderia mallei</i>, <i>B. Pseudomallei</i>, <i>Chlamydia psittaci</i> (cepas aviares) <i>Coxiella burnetii</i>, <i>Escherichia coli</i> (cepas verocitotóxicas como O157:H7 uO103, <i>Francisella tularensis</i> tipo A, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, <i>M. africanum</i>, <i>M. bovis</i> (excepto la cepa BCG), <i>M. leprae</i>, <i>M. Microti</i>, <i>M. ulcerans</i>, <i>Rickettsia akari</i>, <i>R. canada</i>, <i>R. montana</i>, <i>R. conorii</i>, <i>R. mooseri</i>, <i>R. prowazekii</i>, <i>R. rickettsii</i>, <i>R. Tsutsugamushi</i>, <i>Salmonella typhi</i>, <i>Shigella dysenteriae</i> (tipo 1), <i>Yersinia pestis</i>.</p>
	<p>HONGOS <i>Blastomyces dermatitidis</i>, <i>Cladophialophora bantiana</i>, <i>Coccidioides immitis</i>, <i>Histoplasma capsulatum</i>, <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.</p>
	<p>VIRUS <i>Arenaviridae</i>: complejos virales LCM-Lassa: virus de la coriomeningitis linfocítica (cepas neurotrópicas). Complejos virales Tacaribe: virus Flexal <i>Bunyaviridae</i>: virus Oropouche, virus de la encefalitis de California, virus Belgrade, virus sin nombre (Muerto Canyon), <i>Hantavirus virus</i>, <i>Hantaan</i> (fiebre hemorrágica de Corea), virus Seoul, <i>Flebovirus</i>, virus de la fiebre del valle Rift. <i>Caliciviridae</i>: virus de la hepatitis E. <i>Flaviviridae</i>: virus de la encefalitis del valle Murray, virus de la encefalitis de las garrapatas de Europa Central, virus Absettarov virus Hanzalova Virus Hypr, virus Kumlinge virus del Dengue tipos 1-4 virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis G, virus de la encefalitis B japonesa, virus del bosque de Kyasamur; virus del mal de Louping, virus Omsk, virus Powassan, virus Rocio, virus de la encefalitis de primavera-verano rusa, virus de la encefalitis de St. Louis virus Wesselsbron, virus del Nilo occidental virus de la fiebre amarilla. <i>Hepadnaviridae</i>: virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis D. <i>Herpesviridae</i>: <i>Herpesvirus simiae</i> (virus B) <i>Poxviridae</i>: Monkeypox virus <i>Retroviridae</i>: virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de las leucemias humanas de células T (HTLV) tipos 1 y 2, virus SIV. <i>Rhabdoviridae</i>: virus de la rabia. <i>Togaviridae</i>: <i>Alfavirus</i> virus de la encefalomielitis equina americana oriental, virus de la encefalomielitis equina americana occidental, virus Chikungunya, virus Everglades, virus Mayaro, virus Mucambo, virus Ndumu, virus Tonate, virus de la encefalomielitis equina venezolana, virus no clasificados Virus de la hepatitis todavía no identificados.</p>
	<p>Agentes no clasificados asociados a encefalopatías espongiiformes transmisibles: enfermedad de Creutzfeldt – Jakob, variante de la enfermedad de Creutz-feldt - Jakob (CJD), encefalopatía spongiforme bovina (BSE) y otras TSE de origen animal afines, síndrome de Gerstmann – Sträussler-Scheinker Kuru.</p>
	<p>PARÁSITOS <i>Echinococcus granulosus</i> (*), <i>E. multilocularis</i> (*), <i>E. vogeli</i> (*), <i>Leishmania brasiliensis</i> (*), <i>L. donovani</i> (*), <i>Plasmodium falciparum</i> (*), <i>Taenia solium</i> (*), <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> (*), <i>T. cruzi</i>. (*): normalmente no infecciosos a través del aire</p>
	<p>BACTERIAS, CHLAMYDIAS, MYCOPLASMAS Y RICKETTSIAS Ninguno</p>
	IV
<p>PARÁSITOS Ninguno</p>	
<p>VIRUS <i>Arenaviridae</i>: complejos virales LCM-Lassa: virus de Lassa. Complejos virales Tacaribe: virus Junín, virus Machupo, virus Sabia, virus Guaranito. <i>Bunyaviridae</i>: <i>Nairovirus</i>, Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea/Congo. <i>Filoviridae</i>: virus Marbug, virus Ebola. <i>Flaviviridae</i>: virus Kyasanur. <i>Poxiviridae</i>: <i>Variola</i> (major & minor), virus (variola virus), virus no clasificados <i>Morbilivirus</i> equino.</p>	

ESQUEMA COMPARATIVO ENTRE LOS NIVELES DE BIOSEGURIDAD

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD (CONTENCIÓN)	NBS		
	2	3	4
El lugar de trabajo se encuentra separado de toda actividad que se desarrolle en el mismo edificio	No	Aconsejable	Sí
El aire introducido y extraído del lugar de trabajo se filtra mediante la utilización de filtros de alta eficacia para partículas en el aire (HEPA) o de forma similar	No es necesario	Sí, para la salida de aire	Sí, para la entrada y salida de aire
Solo se permite el acceso al personal designado	Aconsejable	Sí	Sí
El lugar de trabajo debe poder precintarse para permitir su desinfección	No	Aconsejable	Sí
Procedimientos de desinfección específicos	Sí	Sí	Sí
El lugar de trabajo se mantiene con una presión negativa respecto a la presión atmosférica	No	Aconsejable	Sí
Control eficiente de vectores, por ejemplo, roedores e insectos	Aconsejable	Sí	Sí
Superficies impermeables al agua y de fácil limpieza	En banco de pruebas y mesa de trabajo	En banco de pruebas y mesa de trabajo y suelo	En banco de pruebas y mesa de trabajo, suelo, paredes y techo
Superficies resistentes a ácidos, álcalis, disolventes y desinfectantes	Aconsejable	Sí	Sí
Almacenamiento de seguridad para agentes biológicos	Sí	Sí	Sí almacenamiento seguro
Se instala una ventanilla de observación o un dispositivo alternativo en las zonas de manera que se pueda ver a sus ocupantes	Aconsejable	Aconsejable	Sí
Laboratorio con equipo propio	No	Aconsejable	Sí
El material infectado, animales incluidos, debe manejarse en una cabina de seguridad biológica o en un aislador u otra contención apropiada	Cuando proceda	Sí, cuando la infección se propague por el aire	Sí
Incinerador para destrucción de animales muertos	Aconsejable	Sí, disponible	Sí, en el mismo lugar

LABORATORIOS BÁSICOS NIVELES DE BIOSEGURIDAD 1 y 2

- ◆ El fundamento de una buena seguridad en el laboratorio es el desarrollo de técnicas microbiológicas apropiadas.

LAS REGLAS MÁS IMPORTANTES

a. Del ambiente

- ◆ Colocar un cartel que indique: "**Riesgo biológico**" en las puertas de los ambientes en donde se manipulan microorganismos infectantes de **Riesgo 2**.



- ◆ El laboratorio debe mantenerse limpio y aseado, retirando cualquier material que no tenga relación con el trabajo. Los pisos deben limpiarse con soluciones desinfectantes. No se debe barrer el piso en seco, ni encerar.

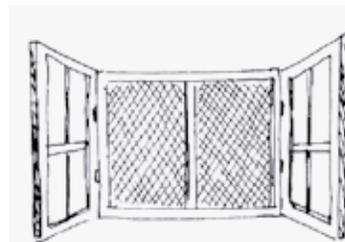
- ◆ La mesa de trabajo se descontaminará al terminar la jornada laboral y en caso de derramamiento de sustancias peligrosas.

- ◆ El desempolvado debe ser hecho con una tela limpia, saturada con desinfectante y exprimida. No hacerlo con un plumero.





- ◆ Cuando no se disponga de ventilación mecánica, las ventanas podrán abrirse y deben estar provistas de mosquiteros. Se deben eliminar tragaluces y claraboyas.
- ◆ Deberá haber un programa de lucha contra insectos y roedores.



- ◆ Se debe colocar extinguidores, que deben ser recargados cada año.

b. Del Personal

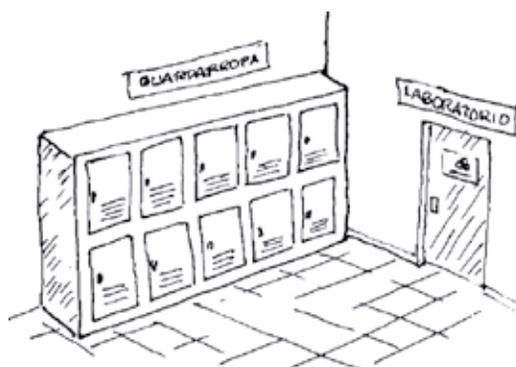
- ◆ En la zona de trabajo del laboratorio no se permitirá al personal comer, beber, fumar, guardar alimentos, ni aplicarse cosméticos.



- ◆ En el laboratorio se utilizarán batas, uniformes u otras prendas apropiadas. Esta ropa **no se llevará fuera del laboratorio**, es decir, no se llevará a las oficinas, bibliotecas, salas de personal, cafeterías, etc.

- ◆ La ropa protectora no se guardará en los mismos armarios que la ropa de calle.
- ◆ Las personas que tengan cabello largo deben protegerse con gorro o mantenerlo amarrado hacia atrás.

El cabello largo es peligroso cerca al fuego del mechero, incluso puede contaminarse con muestras clínicas y puede ser un riesgo cerca de los equipos. Asimismo, se deben quitar los brazaletes o collares largos antes de comenzar a trabajar.



- ◆ Fuera de la zona de trabajo deben existir espacios para guardar la ropa de calle y los objetos personales, así como para comer y beber.

- ◆ Todo personal del laboratorio **debe recibir inmunización protectora**, según la naturaleza de sus funciones, contra tétanos, difteria, hepatitis viral B, rabia, etc.

c. De las muestras y su procesamiento

- ◆ Se debe usar guantes en todos los trabajos con riesgo de contacto accidental directo con sangre, material infeccioso o animales infectados.





- ◆ **No se utiliza pipetas para aspirar con la boca ("pipetear"), se deben usar propipetas, pipetas automáticas u otro equipo adecuado.**



- ◆ **No se pasa la lengua por las etiquetas, ni se deben colocar los materiales en la boca.**

- ◆ **El personal del laboratorio se lavará las manos antes y después de haber manipulado material o animales, así como al retirarse del laboratorio.**

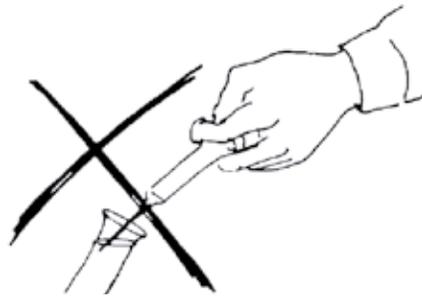


- ◆ **Es necesario proteger los ojos y la cara de salpicaduras o impactos de sustancias. Se debe usar gafas, viseras u otro elemento de seguridad.**

- ◆ **Durante el trabajo se mantendrán cerradas las puertas del laboratorio, no se permitirá la entrada de niños en las zonas de trabajo del laboratorio.**



- ◆ Para manipular líquidos **no se usarán jeringas ni agujas hipodérmicas**. Se debe usar pipetas automáticas, propipetas u otros.



- ◆ Todos los materiales, muestras y cultivos contaminados **se descontaminarán antes de eliminarlos o de limpiarlos para volverlos a usar**. Se introducirán en bolsas de recolección de residuos sólidos diferenciados por colores (residuos biocontaminados: color rojo; residuos químicos: color amarillo; residuos comunes: color negro) que se anudarán para esterilizarse en autoclave o incinerarse fuera del laboratorio.



Si es necesario desplazar las bolsas a otro lugar para proceder a la descontaminación, se colocarán en recipientes de fondo sólido, que se puedan cerrar antes de sacarlas del laboratorio.

- ◆ Por el sistema de desagüe solo se deben eliminar los microorganismos infecciosos o reactivos químicos **previamente descontaminados, neutralizados o inactivados**.

- ◆ **Limpiar periódicamente los congeladores y las refrigeradoras** en los cuales se almacenan los cultivos o los sueros y retirar los frascos y tubos rotos. Usar mascarilla y guantes de jebe durante su limpieza.



- ◆ Todos los accidentes y exposiciones reales o potenciales a material infeccioso se notificarán inmediatamente al jefe del laboratorio. **Se debe hacer un informe escrito de tales accidentes** (ver Anexos).

MEDIDAS EN CASO DE ACCIDENTES

a. *Inoculación accidental, cortes o abrasiones, quemaduras pequeñas*

- ◆ Se deberá quitar la ropa protectora de la persona afectada.
- ◆ Lavarse las manos y las partes lesionadas con agua y jabón.
- ◆ Aplicarse un desinfectante cutáneo adecuado, dirigirse al médico e informarle sobre la causa de la herida y sobre los microorganismos implicados.



b. *Rotura o derramamiento de recipientes con cultivos*

- ◆ En caso de accidentes por derrame de una muestra en el piso o la mesa, cubrir con papel periódico. Empapar este cuidadosamente con fenol al 5% y dejar que actúe durante 30 minutos como mínimo antes de limpiar el área.
- ◆ En todo momento usar guantes.



c. *Ingestión accidental de material posiblemente infeccioso.*

- ◆ Quitarse la ropa protectora, trasladarse al servicio médico. Se informará al médico sobre el material ingerido y se seguirá sus consejos.
- ◆ **El accidente deberá ser registrado.** (Ver Anexos).



c. **Emisión de un aerosol posiblemente peligroso**

- ◆ Todas las personas deberán evacuar inmediatamente la zona afectada. Se colocarán señales que indiquen: **"Prohibida la entrada"**.



- ◆ Al cabo de una hora podrá efectuarse la descontaminación, para ello se usará ropa protectora y protección para las vías respiratorias.
- ◆ Las personas afectadas serán atendidas en el servicio médico.

MATERIAL DE BIOSEGURIDAD RECOMENDADO

a. **Dispositivos para sustituir el uso de la pipeta con la boca**

- ◆ El uso de tapón de algodón en la pipeta, **no constituye un filtro bacteriano eficaz y puede permitir el paso de partículas durante la succión.**
- ◆ Cuando el tapón está muy ajustado puede requerirse una succión enérgica, con el riesgo de aspirar el algodón, un aerosol e incluso líquido.
- ◆ El empleo de dispositivos especiales permite evitar la ingestión de agentes patógenos o de sustancias químicas.



b. Cámaras o cabinas de seguridad biológica

- ◆ Constituye el principal elemento que actúa como barrera física para evitar el riesgo de infecciones transmitidas por el aire (aerosoles).
- ◆ Impide la salida de estos aerosoles a la atmósfera del laboratorio y por lo tanto su inhalación por el personal. No impiden las salpicaduras y no son eficaces contra los riesgos químicos.
- ◆ Estas cámaras de seguridad biológica se utilizan en los siguientes casos:
 - En los procedimientos con grandes posibilidades de producir aerosoles, con riesgo de infección transmitida por el aire. Por ejemplo en la trituración, el mezclado, las agitaciones o mezclas enérgicas, o la apertura de envases con material infeccioso.
 - Cuando se manejan concentraciones elevadas o grandes cantidades de material infeccioso.



b. Frascos y tubos con tapa rosca

- ◆ Se usan para lograr una barrera física de las muestras y cultivos.



c. Autoclaves

- ◆ Se usan para esterilizar el material contaminado.

PROCEDIMIENTOS PARA LA ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN DE MATERIAL

◆ Esterilizar

Significa **eliminar** de un objeto o de una sustancia **todos los virus, bacterias y esporas**. En consecuencia, el material de laboratorio que se ha esterilizado queda libre de microorganismos vivos.

◆ Desinfección

Se realiza mediante **productos químicos** que matan todos los virus y bacterias, pero **no las esporas**.

OBJETIVOS

- ◆ Preparar los materiales para la recolección de muestras (deben estar estériles placas Petri, tubos, etc.).
- ◆ Desinfectar los materiales contaminados.
- ◆ Preparar los materiales que se emplean en los cultivos bacterianos (placas Petri, pipetas Pasteur, tubos, etc.).



MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN

- ◆ En el laboratorio médico, la esterilización y la desinfección se logra con los siguientes métodos:
 - **Calor húmedo.**
Autoclave, olla de presión, ebullición.
 - **Calor seco.**
Horno de aire caliente, flameado.
 - **Desinfección intensiva por inmersión en productos químicos.**
Hipoclorito sódico, cloramina, etc.
 - **Desinfección por frotación con un producto químico.**

CALOR HÚMEDO

- ◆ La esterilización por vapor (autoclave) es el procedimiento de elección para el instrumental médico de uso repetido.
- ◆ Las autoclaves y las ollas a presión deben funcionar a 121 °C (250 °F) durante un mínimo de 20 minutos. Esta temperatura equivale a una presión de 1 atmósfera por encima de la presión atmosférica (010,325 newtons/m²).

a. Olla de presión

- ◆ Un tipo de autoclave barato es la olla a presión corriente, convenientemente modificada (OMS/UNICEF).
- ◆ Las ollas de presión son cacerolas amplias, construidas para cocinar alimentos con gran rapidez empleando vapor a presión. En laboratorios pequeños se usan para esterilizar los utensilios con que se recolectan las muestras.



PROCEDIMIENTO

1. Llenar con agua el fondo de la olla.
2. Colocar los materiales que se van a esterilizar en la canastilla, que se sostendrá arriba del nivel del agua por medio de un soporte.
3. Los utensilios envueltos se deberán poner en posición vertical, **nunca en posición horizontal**.

b. Autoclave

PREPARACIÓN DE MATERIALES PARA LA ESTERILIZACIÓN EN AUTOCLAVE

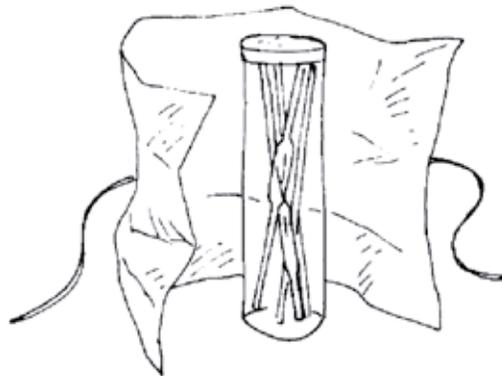
MATERIAL DE VIDRIO



- ◆ Los tubos de muestras, las placas Petri, etc.; se envolverán en papel Kraft y se atarán con cordeles.

PIPETAS PASTEUR

- ◆ Se colocarán en tubos amplios y largos, que se taponarán inmediatamente después.
- ◆ También se pueden envolver con varias hojas de papel Kraft.





c. **Ebullición**

- ◆ **Este procedimiento solo se debe usar cuando no hay otra alternativa.** Usar un recipiente especial para esterilizar por ebullición, o si no una cacerola.

PROCEDIMIENTO

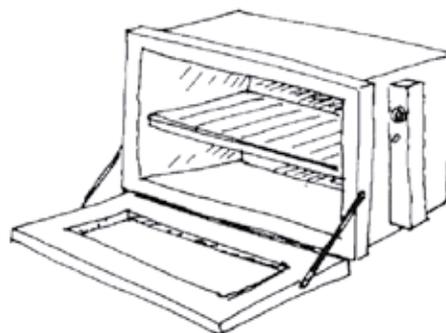
1. Llenar con agua el fondo de la olla.
2. Colocar los materiales que se van a esterilizar en la canastilla, que se sostendrá arriba del nivel del agua por medio de un soporte.
3. Los utensilios envueltos se deberán poner en posición vertical, nunca en posición horizontal.
4. Colocar los utensilios metálicos (pinzas, etc.) en el recipiente cuando el agua esté hirviendo.
5. Hervir durante 20 minutos los utensilios para coleccionar muestras.



CALOR SECO

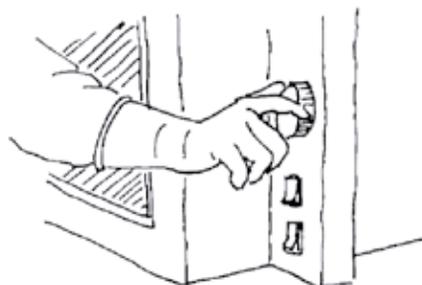
a. **Horno de aire caliente**

- ◆ La esterilización por el calor seco en horno eléctrico solo se puede emplear con utensilios de vidrio o metal (pipetas, etc.) que puedan soportar una temperatura de 170 °C (340 °F).
- ◆ **Los hornos domésticos corrientes constituyen un buen recurso para la esterilización por calor seco.**



PROCEDIMIENTO

1. Preparar el material para esterilizar, del mismo modo que para el procedimiento de autoclave.
2. Los tapones de algodón no deberán ser demasiados gruesos, de modo que pueda entrar el aire. Levantar ligeramente las tapas de los estuches metálicos y disponer de modo que miren a la parte posterior del horno.
3. El tiempo de esterilización es de 2 horas a 170 °C (340 °F).
4. Apagar el horno. Esperar a que la temperatura descienda hasta 40 °C. Abrir la puerta del horno. Cerrar las tapas de los estuches metálicos. Sacar los materiales estériles.
5. El papel empleado para envolverlos deberá haber tomado un color marrón oscuro. Si el color del papel es amarillo pálido indicará que el horno no se ha calentado lo suficiente; si el papel se ha ennegrecido indicará que el horno se ha calentado demasiado.

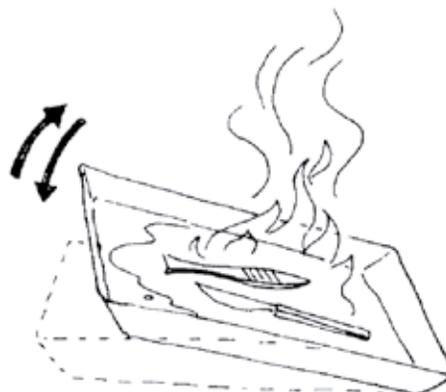


b. Flameado

Este procedimiento solo se deberá utilizar con utensilios metálicos como pinzas y bisturíes. **No es conveniente para uso general.**

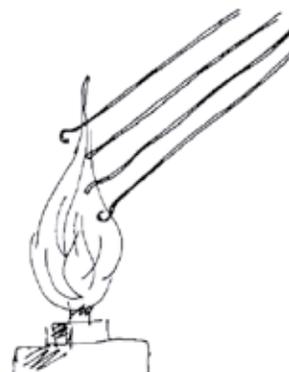
PROCEDIMIENTO

1. Colocar los utensilios en una bandeja metálica.
2. Añadir unas diez gotas de etanol y encender el fuego.





3. Durante el flameado, inclinar la bandeja de un lado a otro.
4. Calentar las asas bacterianas en la llama de un mechero Bunsen o de alcohol, hasta que el asa se ponga al rojo vivo.



DESINFECCIÓN INTENSIVA POR INMERSIÓN EN PRODUCTOS QUÍMICOS

a. *Desinfectantes químicos*

- ◆ Las fórmulas de los productos desinfectantes comerciales presentan grandes diferencias. Es esencial, por lo tanto, que las diluciones se hagan de acuerdo con lo recomendado por los fabricantes.

PRINCIPIOS GENERALES

1. La mayoría de los desinfectantes químicos **tienen efectos tóxicos, por lo que se utilizarán guantes, delantal y protección ocular**, al diluir desinfectantes a granel.
2. **En la práctica, los desinfectantes químicos no son confiables** porque pueden quedar inactivados por la sangre o por cualquier otra materia orgánica. También pueden perder rápidamente potencia si se guardan en un sitio caluroso.
3. **En el caso de instrumentos punzantes o cortantes, solo debe utilizarse como último recurso**, cuando no se pueda recurrir a la esterilización, asegurando que se limpie minuciosamente el instrumental antes de sumergido en el desinfectante químico.



b. Desinfectantes químicos eficaces para inactivar el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

- Hipoclorito sódico	0,1 - 0,5% de cloro disponible.
- Cloramina	2% (tosilcloramida sódica)
- Etanol	70%
- Alcohol isopropílico	70%
- Yodopolividona	2,5%
- Formaldehído	4%
- Glutaral (glutaraldehído)	2%
- Peróxido de hidrógeno	6%

HIPOCLORITO SÓDICO (LÍQUIDOS BLANQUEADORES, LEJÍA, ETC.)

- ◆ Son baratos y fáciles de adquirir. Matan bacterias y virus.
- ◆ Tienen dos inconvenientes importantes:
 - **Se deterioran**
Las soluciones **deben estar preparadas recientemente**, la descomposición rápida puede ser un problema importante en las ciudades de clima cálido.
 - **Son corrosivas**
Corroen el acero, que contiene níquel, cromo, hierro y otros materiales oxidables. Las soluciones no deben prepararse en recipientes metálicos, ya que estos se corroen rápidamente.
El contacto no debe durar más de 30 minutos e irá seguido de un enjuague y secado minucioso.

CLORAMINA (TOSILCLORAMIDA SÓDICA, CLORAMINA T)

- ◆ Es más estable que el hipoclorito sódico. Sin embargo, debe protegerse de la humedad, la luz y el calor excesivo.
- ◆ Puede obtenerse en forma de polvo o de tabletas.



ALCOHOL ETÍLICO Y ALCOHOL ISOPROPÍLICO

- ◆ El alcohol etílico (etanol) y el alcohol isopropílico tienen propiedades desinfectantes semejantes. Son eficaces para formas vegetativas de bacterias, mycobacterias, hongos y virus, luego de algunos minutos de contacto. No son eficaces contra esporas bacterianas.
- ◆ Para conseguir la máxima eficacia, deben usarse en una concentración de 70% (70 mL de alcohol absoluto y 30 mL de agua destilada). El etanol puede emplearse en su forma desnaturalizada, que puede ser más barata.

YODOPOLIVIDONA

- ◆ Es un compuesto que lleva yodo. No debe usarse sobre aluminio y cobre. Puede usarse diluida al 2,5% (una parte de solución al 10% y tres partes de agua hervida). La inmersión durante 15 minutos en una solución al 2,5% permite hacer una desinfección intensiva del material limpio. Las soluciones diluidas (2,5%) para sumergir el instrumental deben renovarse todos los días.

FORMALDEHÍDO (FORMOL, FORMALINA)

- ◆ Las preparaciones comerciales de formaldehído (formol, formalina) contienen un 35 - 40% de formaldehído, un 10% de metanol y agua. Deben usarse en dilución 1: 10 (la solución final contiene 3,5 - 4% de formaldehído).
- ◆ Esta solución diluida destruye las formas vegetativas de bacterias, los hongos y los virus en 30 minutos y las esporas bacterianas al cabo de 3 horas. Después de la inmersión, enjuagar bien todo el material antes volver a utilizarlo. La solución y los vapores que emite son tóxicos e irritantes lo que limita su uso como desinfectante.

GLUTARAL (GLUTARALDEHÍDO)

- ◆ Se comercializa en forma de solución acuosa al 2% que hay que "activar" antes de usar, añadiendo polvo o líquido de glutaral que se mezcla con la solución acuosa y que la hacen alcalina. Una vez activada la solución, **no se debe guardar más de 2 semanas**. Si se enturbia, habrá que desecharla.

- ◆ Como solución activada, destruye las formas vegetativas de bacterias, los hongos y los virus en 30 minutos. Para destruir las esporas se precisa 10 horas de inmersión.
- ◆ El glutaral se considera actualmente un producto tóxico, irritante. Debe evitarse el contacto con la piel, los ojos y las vías respiratorias.

PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (AGUA OXIGENADA)

- ◆ La inmersión de material limpio en una solución al 6% proporciona una desinfección intensiva en 30 minutos.
- ◆ Se prepara a partir de una solución estabilizada al 30% (una parte de solución estabilizada al 30% y cuatro partes de agua hervida).
- ◆ El peróxido de hidrógeno no debe usarse en un ambiente caluroso. Tiene poder corrosivo, no debe usarse con objetos de cobre, aluminio, zinc o latón.

DESINFECCIÓN POR FROTACIÓN CON UN PRODUCTO QUÍMICO

- ◆ La frotación con un desinfectante adecuado es un procedimiento aceptable en el caso de superficies (mesas, etc.) y de salpicaduras de sangre. Cuando estas son visibles, se empezará por derramar desinfectante sobre la superficie; luego se retirará la mezcla de sangre y desinfectante.



- ◆ El hipoclorito sódico es el desinfectante más indicado.
- ◆ Si se usa alcohol hay que frotar la superficie varias veces porque el producto se evapora.



DILUCIONES DE COMPUESTOS QUE LIBERAN CLORO

Situaciones	"Limpias"(a)	"Sucias"(b)
Cloro libre requerido	0,1%(1 g/L)	0,5%(5 g/L)
Solución de hipoclorito sódico (5% de cloro libre)	20 mL/lL	100 ml/L
Hipoclorito cálcico (70% de cloro libre)	1,4 g/L	7,0 g/L
NaDCC en polvo (60% de cloro libre)	1,7 g/L	8,5 g/L
NaDCC en tabletas (1,5 g de cloro libre/ tableta)	1 tableta/L	4 tabletas/L
Cloramina	20 g/L	20 g/L

(a) Situaciones "limpias": Por ejemplo: instrumental médico limpio

(b) Situaciones "sucias": Por ejemplo: salpicaduras de sangre, instrumental sucio.

- ◆ La cantidad de cloro disponible que se precisa en las soluciones usadas para la desinfección intensiva depende de la cantidad de materia orgánica presente, ya que esta (por ejemplo: la sangre y la pus) inactiva el cloro.
- ◆ Los líquidos blanqueadores de uso doméstico suelen tener un 5% de cloro disponible.
- ◆ La lejía de sosa tiene cerca de un 5% de cloro disponible.
- ◆ La lejía concentrada tiene cerca de un 15% de cloro disponible.

ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN DE MATERIAL

ESTERILIZACIÓN

- ◆ Inactiva (mata) todos los virus, bacterias y esporas.
-
- Esterilización por vapor a presión durante 20 minutos o más:
121 °C (250 °F) a 1 atmósfera adicional.  En olla a presión o autoclave.
-
- Esterilización por calor seco:  En horno eléctrico
2 horas a 170 °C (340 °F).
-

DESINFECCIÓN INTENSIVA

- ◆ Inactiva (mata) todos los virus y bacterias, pero no las esporas.
-
- Ebullición durante 20 minutos  En cacerola
-
- Inmersión en desinfectantes durante 30 minutos 
 - Hipoclorito sódico al 0,5%
 - Cloramina al 2%
 - Alcohol etílico al 70%
 - Alcohol isopropílico al 70%
 - Yodopolividona al 2,5%
 - Formaldehído al 5%
 - Glutaral al 2%
 - Peróxido de hidrógeno al 6%
-

¡ATENCIÓN!

- ◆ En la práctica y sobre el terreno, la desinfección intensiva con productos químicos no es confiable.



DESECHO DE MUESTRAS Y MATERIALES INFECTADOS

MANEJO DE DESECHOS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La gestión de residuos debe ser considerada como una parte importante de la seguridad en los laboratorios.
- ◆ Los desechos que se generan pueden estar contaminados por microorganismos o contener sustancias químicas tóxicas y peligrosas.
- ◆ La mejor manera de racionalizar los residuos es mediante una gestión integrada cuyos pilares básicos son la minimización, segregación y eliminación.
- ◆ El manejo y tratamiento de los desechos infecciosos debe considerarse antes, durante y después de realizadas las actividades de laboratorio.
- ◆ Hay que establecer un **sistema de identificación** y separación de desechos de muestras y materiales infectados:
 - Material contaminado para eliminación.
 - Material contaminado para el tratamiento en autoclave y reutilización.
 - Desechos no contaminados que pueden eliminarse con la basura.
- ◆ **No existe una clasificación universalmente aceptada de los residuos según su peligrosidad**; sin embargo, desde el punto de vista general, los residuos sanitarios, incluyendo los que se generan en un laboratorio de microbiología pueden agruparse en residuos biocontaminados, especiales y comunes. Una clasificación aceptable puede ser:
 - **Clase A: residuos biocontaminados**
 - Tipo A 1: atención al paciente. Instrumentos y materiales utilizados en la toma de muestra de sangre, tejidos y otros.

Tipo A 2: material biológico.
Tipo A 3: sangre humana y productos derivados.
Tipo A 4: quirúrgicos y anatomopatológicos.
Tipo A 5: animales contaminados.

- **Clase B: residuos especiales**

Tipo B 1: químicos peligrosos.
Tipo B 2: farmacéuticos
Tipo B 3: radioactivos

- **Clase C: residuos comunes**

Similares a los domésticos. Incluye a los generados en administración como: cartón, papel, material de oficina, basura orgánica, etc.

- ◆ **Para fines de manejo y tratamiento de residuos infecciosos**, material capaz de producir una enfermedad infecciosa, estos se clasifican en: líquidos, sólidos y objetos punzantes - cortantes.

- **Residuos líquidos**

- ✓ La sangre, líquidos orgánicos, secreciones y otros pueden eliminarse directamente por el desagüe con agua abundante.
- ✓ Los líquidos infecciosos que se generan en el laboratorio como sobrenadantes de los cultivos, se aconseja recogerlos en un recipiente que contenga una solución de hipoclorito sódico recién preparada. Luego pueden ser eliminados por los desagües. No obstante, muchos laboratorios someten a los residuos líquidos, sangre incluida a un tratamiento en el autoclave.

- **Residuos sólidos**

- ✓ Las formas más frecuentes de tratamiento de los residuos sólidos son la incineración y esterilización por autoclave. **La incineración, es una actividad cada vez más restringida, debido a la contaminación que origina en las zonas urbanas donde están implantados.** Se aconseja transferir los residuos a empresas autorizadas para su eliminación.



- ✓ Las muestras examinadas en el laboratorio (heces, sangre, pus, esputo, orina, etc.) frecuentemente son infectantes. La esterilización en autoclave es la forma más común de tratar este tipo de residuos. Se debe asegurar que el ciclo del autoclave permita la esterilización en toda la masa de los residuos.
 - ✓ Los procedimientos para materiales limpios no sirven para el tratamiento de los desechos, siendo aconsejable prolongar el tiempo y aumentar la presión del proceso de autoclavado (Ejemplo: material de vidrio contaminado autoclavado por una hora a 121 °C y 1,5 atmósferas de presión).
 - ✓ La utilización de indicadores químicos y el tratamiento térmico no siempre asegura el control de la eficacia. Para evitar una falsa seguridad; alternativamente se debe considerar el control riguroso sistemático en cada proceso (por ejemplo: registros de presión y temperatura) y el mantenimiento apropiado del autoclave.
- **Residuos sólidos**
- ✓ Constituyen un claro riesgo de inoculación accidental de microorganismos. Todos estos materiales deben ser colocados en recipientes específicos que sean resistentes a la punción y con cierre seguro, para posteriormente depositarlos en los recipientes rígidos destinados a los residuos sólidos.
- ◆ **Para fines de manejo y tratamiento de residuos químicos** (agentes químicos) considerada como la segunda fuente de riesgo de exposición de las personas que trabajan en laboratorio, se debe contar con un procedimiento para el tratamiento de residuos químicos como:
- Ácidos inorgánicos.
 - Bases inorgánicas, sales básicas y disoluciones básicas.
 - Azida de sodio.
 - Aldehídos, cetonas y disolventes orgánicos.
 - Bromuro de etidio.
 - Colorantes utilizados en las tinciones de Gram, Giemsa, Papanicolau, Auramina,
 - Naranja de acridina.
 - Metales pesados, mercurio y compuestos organomercuriales.
 - Residuos radiactivos

INCINERACIÓN

a. Fabricación de un incinerador

1. Disponer de un barril o latón metálico grande, usado.
2. Fijar con firmeza una **rejilla de metal resistente (R)** aproximadamente a un tercio de la altura del barril.
3. Cortar en el metal una **abertura amplia o ventanilla (V)** abajo del nivel que ocupa la rejilla.
4. Conseguir una **tapa suelta (T)** para el barril.

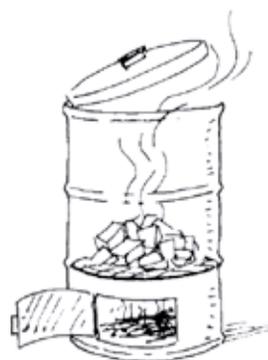


b. Procedimiento de incineración

1. Al terminar el trabajo de cada mañana y cada tarde colocar en la rejilla del incinerador todas las cajas usadas con heces y esputo.

El barril metálico deberá estar firmemente cerrado (por medio de la tapa y la ventanilla) excepto durante la incineración.

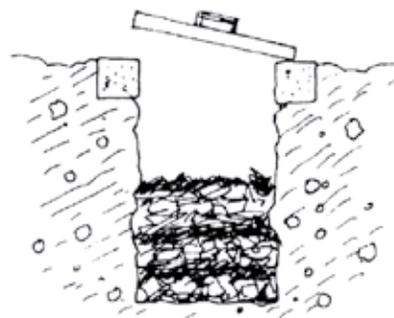
2. Incinerar una vez por semana o más frecuentemente, si es necesario. Llenar el fondo del barril con papeles, palos, virutas, etc.
 3. Quitar la tapa. Encender el fuego y alimentarlo hasta que todos los materiales infectados se encuentren reducidos a cenizas.
- ♦ **Estas cenizas no son peligrosas y se pueden arrojar al basurero.**





ENTIERRO DE DESECHOS

1. Abrir una fosa de 4 a 5 metros de profundidad y de 1 a 2 metros de ancho.
2. Fabricar una tapa que se ajuste con firmeza a la boca de la fosa. Es conveniente reforzar el borde de la boca de la fosa con un revestimiento de ladrillos o piedras.
3. Dos veces al día arrojar en la fosa las cajas usadas con heces, esputo u otras materias infectadas. Colocar inmediatamente la tapa en su lugar.
4. Una vez por semana cubrir los desechos con una capa de hojas secas (de 10 centímetros de espesor, aproximadamente). Si es posible, en vez de hojas secas depositar una capa de cal viva por semana.



MATERIAL CONTAMINADO PARA EL TRATAMIENTO EN AUTOCLAVE Y REUTILIZACIÓN

ESTERILIZACIÓN Y LIMPIEZA DE LOS RECIPIENTES NO DESECHABLES

- ◆ Los frascos y matraces pueden contener:
 - Materias sumamente infecciosas (heces, esputo, pus, líquido cefalorraquídeo).
 - Otras muestras (sangre, orina).

a. Recipientes con heces

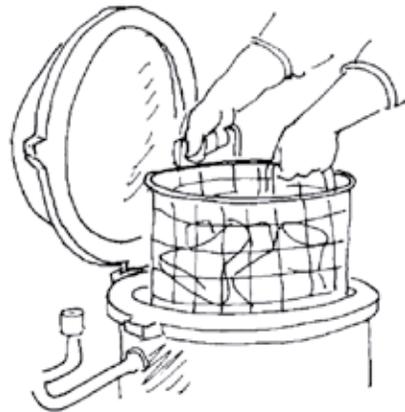
- ◆ Llenar los frascos que contengan heces con una solución de fenol al 5% u otro desinfectante similar. Dejarlos en reposo por 24 horas. A continuación, vaciarlos en el lavadero. Limpiar los frascos con detergente y agua.

**b. Recipientes con esputo y tubos con pus o líquido cefalorraquídeo**

- ◆ Existen varios procedimientos.

USO DEL AUTOCLAVE

- ◆ Este es el procedimiento más conveniente.
1. Colocar los recipientes en el autoclave tal como se encuentran y esterilizarlos durante 60 minutos a 121 °C para destruir todos los microorganismos.
 2. Una vez que se hayan enfriado vaciarlos en el lavadero.
 3. Limpiarlos con agua y detergente.





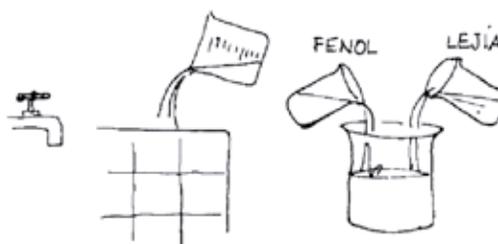
EBULLICIÓN EN SOLUCIÓN DETERGENTE

1. Se requiere un recipiente o cacerola amplia especial para este propósito.
2. Hervir los recipientes de esputo, durante 30 minutos, en agua que contenga polvos para lavar en solución fuerte (cristales de carbonato sódico), a razón de 60 mL por cada litro de agua.



EMPLEO DE SOLUCIÓN DE FORMALDEHÍDO O FENOL

1. Colocar en cada recipiente de esputo:
 - 10 mL de solución de formaldehído sin diluir, o
 - 5 mL de fenol al 5%.
Dejar en reposo durante 24 horas.



2. Luego, enjuagar.

c. *Matraces con orina*

1. Vaciar los matraces en el lavadero.
2. A continuación, llenarlos con:
 - Una solución de lejía comercial al 10%, o
 - Una solución de fenol al 2%.
3. Dejarlos en reposo durante 24 horas. Luego enjuagar.

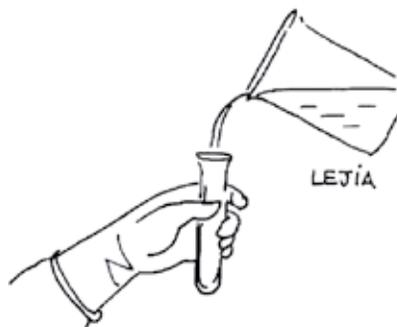




d. Tubos con sangre

1. Los tubos con sangre **extraída el mismo día** se deberán:

- Enjuagar con agua fría corriente.
- Remojar en una solución detergente.



2. Los tubos con sangre que han permanecido varios días a temperatura ambiente, donde los microorganismos se pueden multiplicar, se deberán:

- Llenar con una solución de lejía comercial al 10%.
- Dejar en reposo durante 12 horas.
- Enjuagar y limpiar enseguida.

PROCEDIMIENTO PARA EL TRATAMIENTO DE MATERIAL INFECTADO

Procedimiento	Material infectado	Material infectado reutilizable
Desinfectar	Sí	Sí
Usar autoclave	Sí	Sí
Incinerar	Sí	No
Lavar	No	Sí



TRANSPORTE DE DESECHOS

PRINCIPIOS GENERALES

a. Transporte de desechos infecciosos

- ◆ Los recipientes para desechar los residuos de riesgo deben ser rígidos, impermeables, resistentes a ácidos, álcalis y de cierre hermético.
- ◆ El transporte del material contaminado del laboratorio al área de auto clavado o incineración, lo realiza el personal técnico que cuente con los medios adecuados y equipo de protección personal.
- ◆ Las bolsas de color rojo rotuladas como “Riesgo Biológico” ó “Material Contaminado” son autoclavadas y eliminadas con la basura o incineradas.
- ◆ Los recipientes con residuos nunca se apilan o se colocan en zonas elevadas, tanto durante su almacenamiento intermedio (no debe superar las 24 horas) como durante el transporte.
- ◆ Si los residuos son punzantes o cortantes debe utilizarse recipientes rígidos resistentes a la perforación cuyo volumen no supere los 2 L y que contengan desinfectante.
- ◆ Los residuos biocontaminados y especiales se transportan en los propios recipientes en los que se depositan. No se recomiendan recipientes de un volumen superior a los 60 L.
- ◆ No se transportan a la vez residuos de riesgo junto con residuos comunes.
- ◆ Debe evitarse originar aerosoles durante el transporte de los residuos biológicos, en especial aquellos que contengan patógenos cuya vía de transmisión sea la aérea. Los recipientes que los contengan se manipulan sin hacer movimientos bruscos.
- ◆ No es apropiada la utilización de escaleras para el transporte de los residuos de Biocontaminados.
- ◆ Las bolsas de recolección de residuos sólidos se deben de diferenciar por

colores: residuos biocontaminados: color rojo; residuos químicos: color amarillo; residuos comunes: color negro. Estas bolsas deben ser de polietileno de 7,5 μ de espesor, con una capacidad del 20 % superior al volumen del recipiente que la contiene.

b. Transporte de residuos químicos

- ◆ La manipulación de los desechos químicos debe llevarse a cabo por personal capacitado en el manejo de los mismos, provisto de equipos de protección personal.
- ◆ En principio se debe procurar reciclar los desechos químicos.
- ◆ Los desechos químicos no deben eliminarse directamente al sistema de desagüe, sin el tratamiento previo. Se debe tomar en cuenta que las cañerías antiguas, manufacturadas de metal, pueden ser dañadas incluso por sustancias diluidas.
- ◆ Los solventes miscibles con el agua (previamente diluidos a lo menos 1 en 10, los ácidos y los álcalis previamente diluidos 1 en 30), se pueden desechar en el desagüe tomando las precauciones del caso.
- ◆ Los recipientes con residuos nunca se apilan o se colocan en zonas elevadas, tanto durante su almacenamiento intermedio como durante el transporte.
- ◆ Los residuos que puedan originar tóxicos volátiles se almacenan en un área bien ventilada.
- ◆ Debe evitarse la proximidad de los residuos inflamables a cualquier fuente de calor.
- ◆ Debe evitarse originar aerosoles durante el transporte de los residuos químicos. Los recipientes que los contengan se manipulan sin hacer movimientos bruscos.
- ◆ No es apropiada la utilización de escaleras para el transporte de los residuos especiales.
- ◆ En los Anexos se muestran los criterios para el almacenamiento adecuado de sustancias químicas.

USO, CUIDADOS Y MANTENIMIENTO PREVENTIVO DE EQUIPOS Y MATERIALES DE LABORATORIOS

EL MICROSCOPIO.....	49	ESPECTROFOTÓMETRO.....	70
COMPONENTES DEL MICROSCOPIO.....	49	AGLUTINOSCOPIO.....	71
MEDIDAS GENERALES DE CONSERVACIÓN DEL MICROSCOPIO.....	53	HEMOGLOBINÓMETRO DE SAHLÍ.....	72
Materiales.....	53	ROTADOR.....	72
Limpieza de los objetivos.....	54	MATERIAL DE VIDRIO.....	73
Limpieza de los oculares.....	54	PROCEDIMIENTOS PARA LIMPIAR MATERIAL DE VIDRIO SUCIO.....	73
Limpieza del condensador y el espejo.....	55	PROCEDIMIENTOS PARA LIMPIAR MATERIAL DE VIDRIO NUEVO.....	74
Limpieza del bastidor y la platina.....	55	PROCEDIMIENTOS PARA LIMPIAR LÁMINAS PORTAOBJETOS NUEVAS.....	74
Precauciones adicionales.....	55	PROCEDIMIENTOS PARA LIMPIAR LÁMINAS PORTAOBJETOS SUCIAS.....	75
EL AUTOCLAVE.....	58	PROCEDIMIENTOS PARA LIMPIAR PIPETAS.....	75
TIPOS DE AUTOCLAVES.....	58	PROCEDIMIENTOS PARA LIMPIAR CUBREOBJETOS.....	76
COMPONENTES DEL AUTOCLAVE.....	58		
CALENTAMIENTO DEL AUTOCLAVE.....	59		
PROCEDIMIENTOS PARA LA ESTERILIZACIÓN.....	60		
BALANZAS.....	63		
TIPOS DE BALANZAS.....	63		
PROCEDIMIENTO PARA PESAR.....	64		
CENTRÍFUGAS.....	65		
COMPONENTES DE UNA CENTRÍFUGA.....	65		
TIPOS DE CENTRÍFUGAS.....	66		
PROCEDIMIENTO PARA USAR LA CENTRIFUGA ELÉCTRICA.....	67		
INCUBADORA.....	69		
POTENCIÓMETRO.....	69		

EL MICROSCOPIO

COMPONENTES DEL MICROSCOPIO

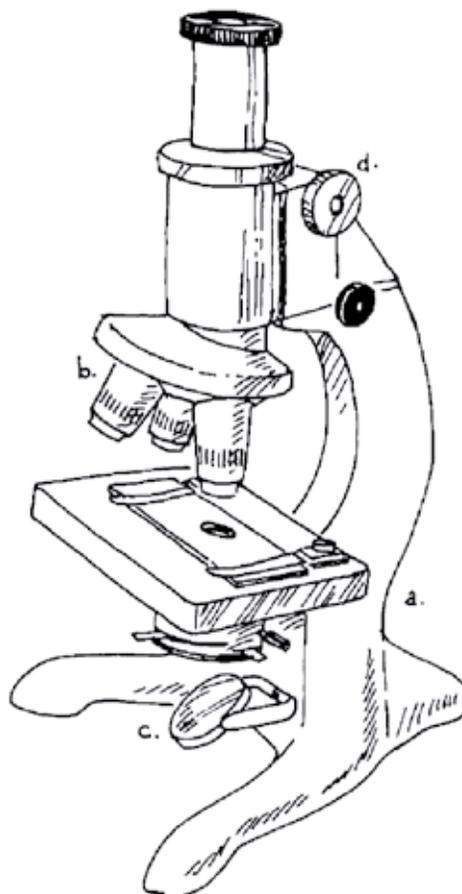
◆ Se pueden agrupar en cuatro sistemas:

- El sistema de soporte.
- El sistema de aumento.
- El sistema de iluminación.
- El sistema de ajuste.

a. El sistema de soporte

◆ Consiste en:

- El pie.
- El bastidor.
- El revólver (cambiador de objetivos).
- La platina.
- La platina mecánica, que imprime un movimiento lento y regulado al porta objeto.



b. El sistema de aumento

LOS OBJETIVOS

◆ El poder de aumento de cada objetivo se indica por un número grabado en la manga de la lente:

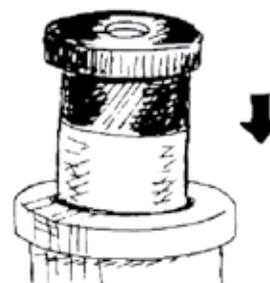
- El objetivo 10x aumenta 10 veces. Su distancia de operación es de 5 - 6 mm.



- El objetivo 40x aumenta 40 veces. Su distancia de operación es de 0,5 - 1,5 mm.
- El objetivo 100x aumenta 100 veces. Su distancia de operación es de 0,15 - 0,20 mm.
- ◆ El objetivo de 100x generalmente se encuentra marcado con un anillo rojo para indicar que se debe usar con aceite de inmersión.
- ◆ Cuanto mayor sea el **poder de resolución del objetivo**, más clara será la imagen.

EL OCULAR

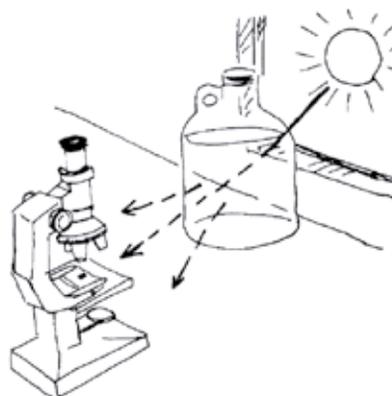
- ◆ El poder de aumento se encuentra marcado en el ocular:
 - Un ocular 4x aumenta 4 veces la imagen que produce el objetivo.
 - Un ocular 10x aumenta la imagen 10 veces.
- ◆ Para calcular el aumento total de la imagen del objeto que se observa, se multiplica el poder de aumento del objetivo por el del ocular. El poder de aumento de los microscopios, utilizados en los laboratorios médicos oscila entre 50 y 1 000.



c. El sistema de iluminación

LA FUENTE LUMINOSA

- ◆ Luz eléctrica
Puede proporcionarla un foco contenido en el microscopio por debajo de la platina o mediante un foco exterior colocado frente al microscopio.

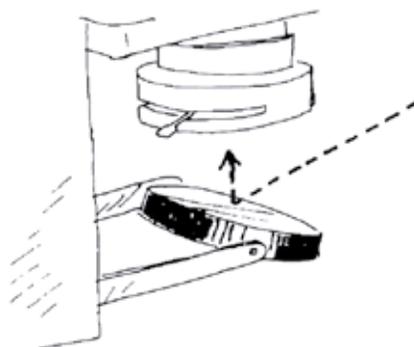


- ◆ Luz del día
El microscopio nunca se debe utilizar ni debe permanecer bajo la luz directa del sol. Deberá estar bien iluminado, pero se usará una luz amortiguada. Si la luz del sol es excesivamente brillante, se colocará frente al microscopio una botella de vidrio claro, llena de agua, para reducir la intensidad de la luz.



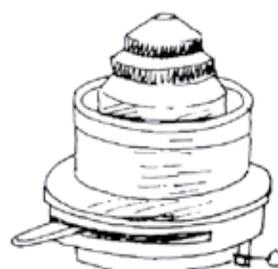
EL ESPEJO

- ◆ El espejo refleja los rayos de la fuente luminosa sobre el objeto. Tiene una superficie plana y otra cóncava. El lado cóncavo constituye un condensador de escaso poder.



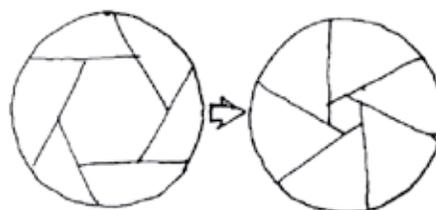
EL CONDENSADOR

- ◆ Lleva los rayos luminosos a un foco común sobre el objeto que se habrá de examinar.
- ◆ Se encuentra colocado entre el espejo y la platina.
- ◆ Se puede elevar (iluminación máxima) y bajar (iluminación mínima). Se debe centrar y ajustar adecuadamente.



EL DIAFRAGMA

- ◆ Se encuentra dentro del condensador, se utiliza para reducir o ampliar el ángulo, y, por lo tanto, también la cantidad de luz que entra en el condensador.





FILTROS

- ◆ En algunos microscopios se ajustan filtros de colores (por ejemplo: azules) debajo del condensador.

d. *El sistema de ajuste*

Este sistema comprende:

1. LA CREMALLERA DE AVANCE RÁPIDO

- ◆ Es el tornillo mayor. Se utiliza para lograr la aproximación del enfoque.

2. EL TORNILLO MICROMÉTRICO DE AVANCE LENTO

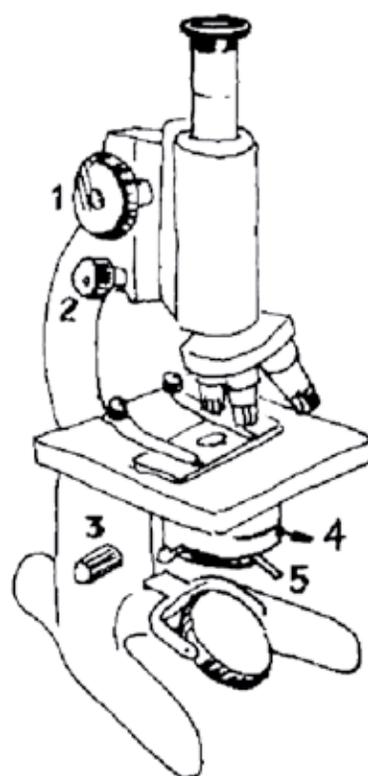
- ◆ Hace que el objetivo se desplace más lentamente. Se emplea para conseguir un enfoque perfecto del objeto.

3. EL TORNILLO DE AJUSTE DEL CONDENSADOR

- ◆ Se utiliza para elevar el condensador y aumentar la iluminación o descenderlo y reducir la iluminación.

4. LOS TORNILLOS PARA CENTRAR EL CONDENSADOR

- ◆ Puede haber tres tornillos colocados alrededor del condensador. Se usan para centrar el condensador exactamente en relación con el objetivo.

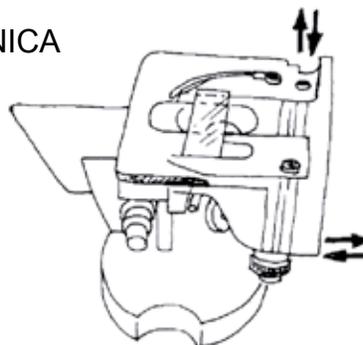


5. EL ELEVADOR DEL DIAFRAGMA IRIS

- ◆ Es un pequeño elevador que se encuentra fijo al condensador. Se puede mover para cerrar o abrir el diafragma, reduciendo o aumentando así el ángulo y la intensidad de la luz.

6. REGULADORES DE LA PLATINA MECÁNICA

- ◆ Se usa para desplazar el portaobjeto sobre la platina. Un tornillo lo desplaza hacia atrás y hacia delante. Otro tornillo lo desplaza a la izquierda o la derecha.



MEDIDAS GENERALES DE CONSERVACIÓN DEL MICROSCOPIO

- ◆ La inspección del microscopio antes de su uso y la limpieza después de su uso son hábitos que contribuyen a la buena conservación de este equipo.

MATERIALES

- Trapo de lino fino.
- Papel lente o papel absorbente tipo pañuelo descartable. También una piel de gamuza o trapo del tipo que no desprenda pelusa.
- Un frasco pequeño de xilol (o tolueno).
- Una pequeña pera de goma o pincel fino.



LIMPIEZA DE LOS OBJETIVOS

OBJETIVOS SECOS

- ◆ Limpiados con un trapo suave, moviendo el trapo de un lado a otro y no en círculos.

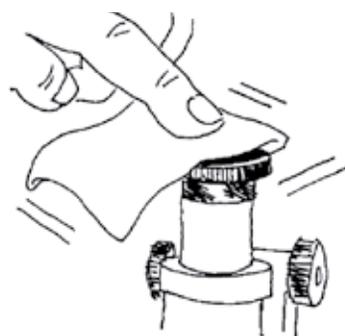


OBJETIVOS DE INMERSIÓN EN ACEITE

- ◆ Deben limpiarse después de su uso con papel especial para lentes o papel absorbente, humedecido con tolueno o xilol para eliminar el aceite de inmersión. **Por ningún motivo la lente de inmersión quedará sin limpiarse, en caso contrario el aceite se secaría y ocasionaría la inutilización del objetivo.**
- ◆ Al terminar la jornada diaria de trabajo, antes de guardar el microscopio, quitar el polvo de los objetivos arrojándoles aire con la pera de goma. Si es necesario, limpiar el polvo remanente usando el pincel fino.

LIMPIEZA DE LOS OCULARES

- ◆ Limpiar la superficie superior de la lente (en la que se aplica el ojo) con un trapo suave o papel de seda.
- ◆ Limpiar la superficie inferior de la lente (dentro del tubo del microscopio) con el pincel fino.



LIMPIEZA DEL CONDENSADOR Y EL ESPEJO

- ◆ El condensador se limpia de la misma manera que los objetivos, con un trapo suave o papel de seda humedecido con xilol. El espejo se limpia con trapo suave humedecido con alcohol etílico de 95°.

LIMPIEZA DEL BASTIDOR Y LA PLATINA

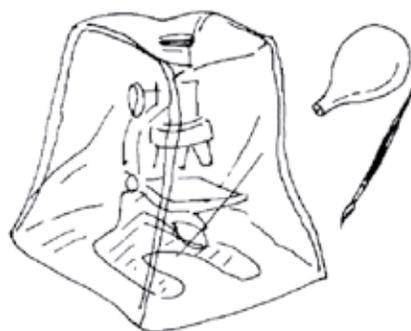
- ◆ Limpiar con una pieza de piel de gamuza o un trapo suave, que no desprenda pelusa.
- ◆ Nunca se debe usar xilol ya que puede desprender la pintura negra del microscopio.
- ◆ La platina se puede limpiar usando papel absorbente impregnado de vaselina.

PRECAUCIONES ADICIONALES

EN CLIMAS CÁLIDOS Y SECOS

- ◆ El problema principal es el polvo. Las partículas finas penetran en las roscas de los tornillos y debajo de las lentes. Se puede evitar tomando en cuenta lo siguiente:

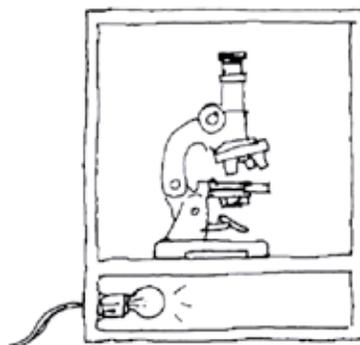
- Mientras no se use, conservar el microscopio bajo una cubierta de material plástico a prueba de aire.
- Limpiar el microscopio con aplicaciones de aire de la pera de goma.
- Limpiar las lentes con una brocha especial o un pincel fino.



EN LOS CLIMAS CÁLIDOS Y HÚMEDOS

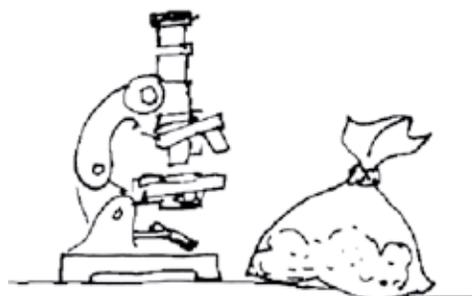
EN LOS LABORATORIOS QUE CUENTAN CON ELECTRICIDAD

- ◆ Guardar el microscopio en un armario templado, acondicionado mediante uno o dos focos de 50 vatios.



EN LOS LABORATORIOS QUE NO CUENTAN CON ELECTRICIDAD

- ◆ Colocar junto al microscopio una bolsa de 15 - 20 cm de diámetro, con no menos de 250 g de gel de sílice azul (que indica humedad al tomar un color rojizo). Cuando el silicagel se torne rosado se debe cambiar por otro o calentar hasta que se tome azul para su reutilización.



 **¡ATENCIÓN!**

- ◆ **Nunca debe** limpiar las lentes de los objetivos o los oculares del microscopio **con etanol**.
- ◆ **Nunca debe** sumergir los objetivos del microscopio **en xilol o etanol**, pues se aflojarían.
- ◆ **Nunca debe** emplear **papel ordinario o algodón** para limpiar las lentes.
- ◆ **Nunca debe** tocar los objetivos con los dedos.
- ◆ **Nunca debe** limpiar los soportes o la platina con xilol.
- ◆ **Nunca debe** limpiar las lentes internas de los oculares o los objetivos **con trapo o papel** (esto desprendería la capa antirreflejante); utilizar solamente un pincel fino.
- ◆ **Nunca debe** dejar el microscopio sin los oculares, a menos que se taponen los orificios.
- ◆ **Nunca debe** guardar el microscopio en estuches de madera cerrados si la región es cálida y húmeda.
- ◆ **Nunca debe** dejar el microscopio con aceite de inmersión en el objetivo.
- ◆ **Nunca debe** llevar el microscopio cogiéndolo por el bastidor con una mano; utilizar ambas, una en el pie y la otra en el bastidor

EL AUTOCLAVE

- ◆ El vapor de agua a presión constituye el procedimiento más eficaz de esterilización del material de laboratorio.

TIPOS DE AUTOCLAVES

- Autoclave de desplazamiento por gravedad.
- Autoclave de vacío.
- Autoclave de olla a presión.

COMPONENTES DEL AUTOCLAVE

1. CALDERA

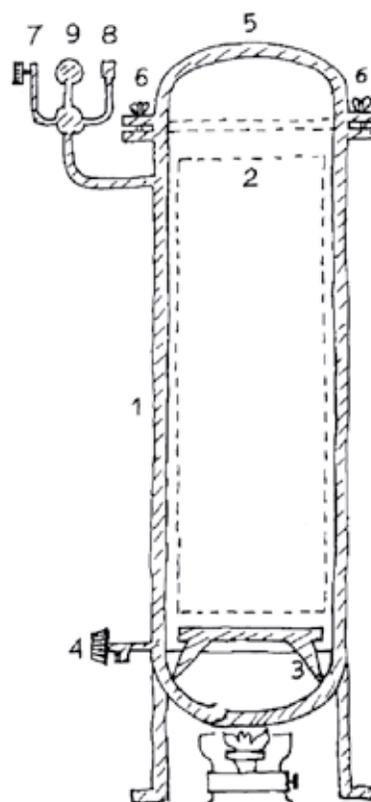
- ◆ Consiste en un cilindro amplio y profundo en el que se colocan los utensilios para esterilizar.

2. CANASTA

- ◆ Es una canasta amplia de alambre donde se ponen los utensilios que se esterilizarán.

3. SOPORTE DE CANASTA

- ◆ Se encuentra en el fondo del autoclave y sostiene la canasta por encima del nivel del agua.



4. DRENAJE

- ◆ Dispositivo colocado en la base de la caldera, por donde sale el exceso de agua.

5. TAPA

- ◆ La tapa cubre y cierra herméticamente la caldera; se ajusta mediante una arandela de goma.

6. SUJETADORES DE LA TAPA

- ◆ Estos sujetadores, junto con la arandela de goma, cierran herméticamente la tapa e impiden que escape el vapor.

7. VÁLVULA DE SALIDA DEL AIRE

- ◆ Esta válvula, que se encuentra en la parte superior de la caldera o en la tapa, se emplea para dejar que salga el aire cuando empieza el agua a calentarse.

8. VÁLVULA DE SEGURIDAD

- ◆ Se halla en la parte superior de la caldera o en la tapa, y deja escapar el vapor cuando la presión se eleva demasiado, evitando así que ocurra una explosión.

9. INSTRUMENTOS INDICADORES DE LA TEMPERATURA O DE LA PRESIÓN

- ◆ Se encuentran en la parte superior de la caldera o en la tapa. La temperatura se indica en grados Celsius (°C).

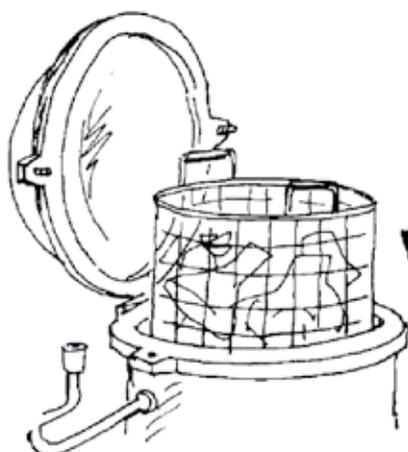
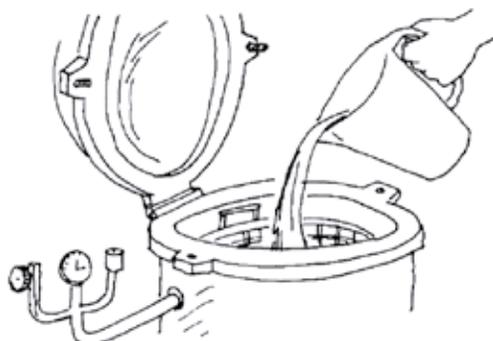
CALENTAMIENTO DEL AUTOCLAVE

- ◆ El sistema de calentamiento puede estar construido dentro del autoclave en forma de dispositivos eléctricos o de gas.
- ◆ De lo contrario, el autoclave se calentará sobre un quemador de gas butano o de gas de kerosene (primus).

PROCEDIMIENTOS PARA LA ESTERILIZACIÓN



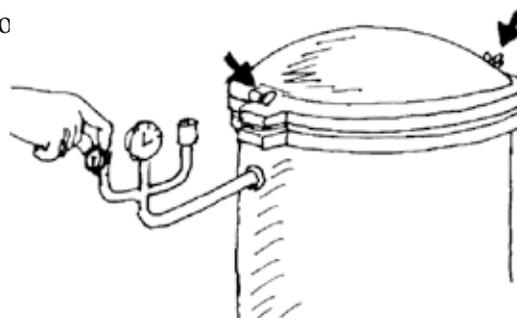
1. Llenar con agua el fondo de la autoclave, hasta el soporte de la canasta



2. Introducir en el autoclave la canasta con los materiales que se van a esterilizar.

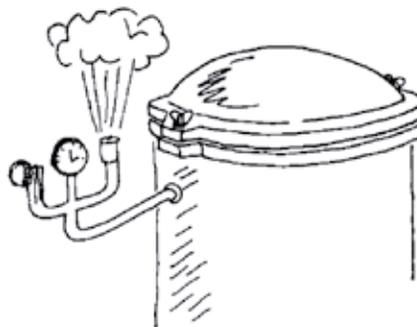
El material y los objetos que se han de esterilizar deben agruparse sin apretarlos de modo que el vapor pueda circular sin dificultad y que pueda salir fácilmente. Las bolsas de plástico estarán abiertas para que el vapor penetre en su contenido.

3. Cerrar la tapa del autoclave, cerciorándose que la arandela de goma se encuentre en su surco. Entornillar a niveles iguales lo sujetadores de la tapa.



4. Abrir la válvula de salida del aire.
5. Iniciar el calentamiento del autoclave.

6. Vigilar la válvula de salida del aire hasta que aparezca un chorro de vapor, que se hará uniforme y continuo en 3 - 4 minutos. Esto indicará que todo el aire se ha expulsado del autoclave.



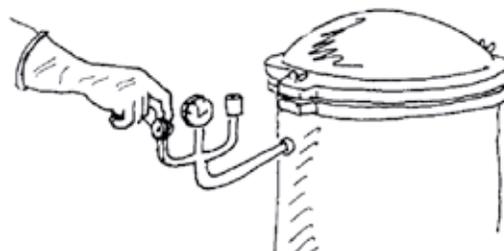
7. Cerrar a continuación la válvula de salida del aire.



8. Observar el indicador, cuando llegue a 121°C se deberá regular el calor para conservarlo y empezar a medir un tiempo mínimo de 20 minutos para material de vidrio y un tiempo de 30 minutos para recipientes que contengan material infectado (esputo, pus, etc.).

9. Reducir totalmente el calor tan pronto como se cumpla el tiempo requerido.
10. Cuando la temperatura descienda a menos de 100°C abrir la válvula de salida del aire para igualar las presiones dentro y fuera del autoclave.

11. Cuando cese el silbido aflojar los sujetadores de la tapa y quitarla. Dejar enfriar el autoclave y, a continuación, retirar la canasta con los materiales estériles.





¡ATENCIÓN!

1. **No** maniobrar el dispositivo de drenaje ni la válvula de salida del aire mientras se esté efectuando el calentamiento a presión.
2. **No** hacer un calentamiento demasiado rápido para aumentar la presión una vez que la válvula de salida se ha cerrado.
3. **No** permitir que el autoclave se enfríe durante demasiado tiempo. Si el aparato se deja varias horas sin abrir la válvula de salida, se forma un vacío y los materiales estériles se pueden romper.
4. **No permitir que los operadores no lleven guantes y viseras** para proteger los brazos, las manos, la cara y el cuello cuando abran la autoclave, incluso cuando la temperatura del contenido haya bajado a 80°C.

BALANZAS

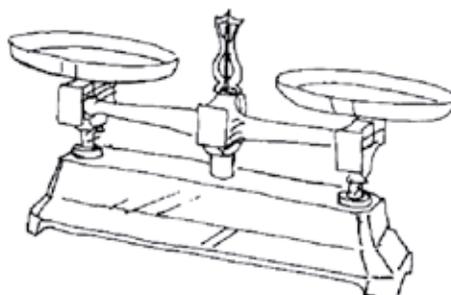
- ◆ La sensibilidad de una balanza es la masa más pequeña que esa balanza puede pesar con precisión.

TIPOS DE BALANZAS

a. **Balanza abierta de dos platillos**

Tiene dos platillos. Puede usar pesas separadas o tener una varilla graduada en la que se coloca una pesa corrediza. Se emplea para pesar cantidades grandes (hasta varios kilos).

Su sensibilidad es de 0,5 g (500 mg).



b. **Balanza analítica**

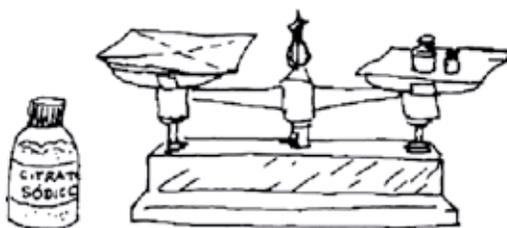
- ◆ Pesa cantidades pequeñas (0,001 a 410 g, dependiendo del modelo) o cuando se requiere gran precisión, por ejemplo: 3,88 g, 0,200 g.
- ◆ Su sensibilidad es de 0,5 mg - 0,1 mg, dependiendo del modelo de la balanza.
- ◆ Para usar correctamente la balanza analítica se deben seguir las siguientes instrucciones:
 1. Mantener conectado el equipo durante el día de trabajo a 220 v.
 2. Presionar la tecla Zero/ON para encender el equipo.

3. Seleccionar la unidad de pesaje con la tecla Mode/Off.
4. Colocar soporte o papel para pesar, sobre la plataforma del equipo.
5. Presionar nuevamente la tecla Zero/On, para volver a cero la pantalla.
6. Colocar el (los) elemento (s) a pesar sobre el soporte colocado en la plataforma.
7. Para hacer la lectura del peso, esperar que el indicador de estabilidad indique (0000) y se visualice en la pantalla.
8. Retirar el material pesado de la plataforma del equipo.
9. Apagar el equipo presionando momentáneamente la tecla Mode/Off
10. Al término del uso desconectar el equipo.

PROCEDIMIENTO PARA PESAR

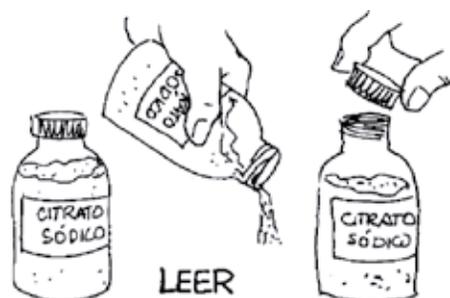
- ◆ Es importante seguir las siguientes instrucciones y así evitar confusiones.

1. Colocar a la izquierda de la balanza el papel en que pesará la sustancia.
2. En el platillo derecho colocar las pesas equivalentes al peso del papel más el de la cantidad de sustancia que va a pesar.



3. Leer la etiqueta de la sustancia:

- Antes de retirar el recipiente de la alacena.
- Mientras se pesa la sustancia.
- Después de pesar la sustancia.

**4.** Rotular la sustancia pesada

CENTRÍFUGAS

- ♦ La fuerza centrífuga hace que un cuerpo se ponga en movimiento circular a gran velocidad, de este modo las partículas que hay en los líquidos se colocan en el fondo de los tubos de centrifugación y se forman los sedimentos centrifugados.
- ♦ Estos sedimentos pueden contener, según el líquido centrifugado: células sanguíneas, huevos de parásitos, células de los conductos urinarios, etc.

COMPONENTES DE UNA CENTRÍFUGA

1. EJE CENTRAL

- ♦ El cual gira a gran velocidad.

2. CABEZAL FIJO AL EJE

- ♦ Está provisto de cubetas para sostener los tubos de centrifugación.



3. TUBOS DE CENTRIFUGACIÓN

- ◆ Contienen el líquido que se va a centrifugar. Se montan en el cabezal.

4. CRONÓMETRO

- ◆ Detiene la centrífuga automáticamente cuando se cumple el tiempo.

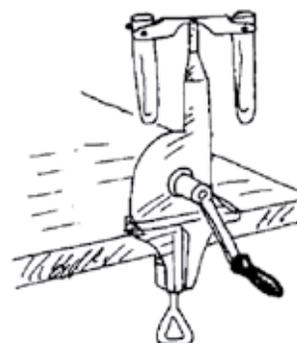
5. CONTADOR DE REVOLUCIONES

- ◆ Tiene una aguja que indica la velocidad en revoluciones por minuto.

TIPOS DE CENTRÍFUGAS

a. Centrífuga manual

- ◆ Gira por medio de un manubrio. Contiene de 2 a 4 tubos.
- ◆ Se usa para examinar sedimentos en la orina y para concentrar ciertos parásitos en las heces.



b. Centrífugas eléctricas

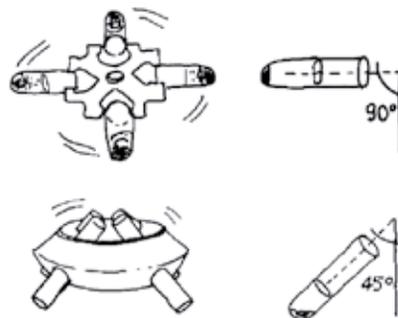
- ◆ Las centrífugas eléctricas se construyen con dos tipos de cabezal.

CABEZAL OSCILANTE

- ◆ Durante la centrifugación los tubos se colocan en posición horizontal.

CABEZAL OBLICUO

- ◆ Sostiene los tubos en un ángulo de 45° , durante la centrifugación. Es útil en los ensayos de aglutinación para determinar grupos sanguíneos por el método del tubo de ensayo.

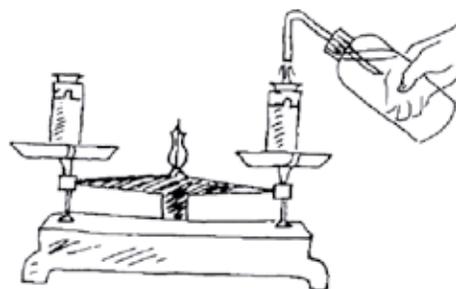


PROCEDIMIENTO PARA USAR LA CENTRÍFUGA ELÉCTRICA

1. Equilibrar las cubetas. Si están numeradas, colocar el tubo 1 frente al tubo 2, el tubo 3 frente al tubo 4.

Equilibrar los tubos que se encuentren frente a frente pesándolos en sus cubetas en una balanza de dos platillos:

- Agregar al tubo de menor peso cierta cantidad del líquido que va a centrifugar, o
- Agregar agua en la cubeta que contenga el tubo de menor peso.



Si solo se va a centrifugar un tubo que contenga líquido, equilibrarlo con un tubo idéntico lleno de agua.

2. Encender el motor y aumentar gradualmente la velocidad girando con lentitud la perilla hasta lograr la velocidad deseada.

3. Detener la centrífuga gradualmente, algunos modelos tienen frenos.
4. Retirar los tubos lentamente y con cuidado.

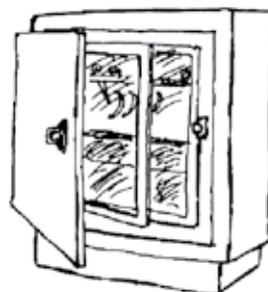


¡ATENCIÓN!

- ◆ No abrir la centrífuga hasta que se haya detenido completamente.
- ◆ No reducir la velocidad de la centrífuga con la mano
- ◆ Consevar la centrífuga limpia.
- ◆ Enjuagar las cubetas después de su uso.
- ◆ Limpiar todos los residuos del material centrifugado, etc.

INCUBADORA

- ◆ Está provista de un calentador que nos permite obtener temperaturas entre 25 a 100 °C. Es controlada mediante un termómetro.
- ◆ Para incubar bacterias y otros organismos, se usa una temperatura constante.
- ◆ Para su buen uso se debe seguir las recomendaciones del fabricante.

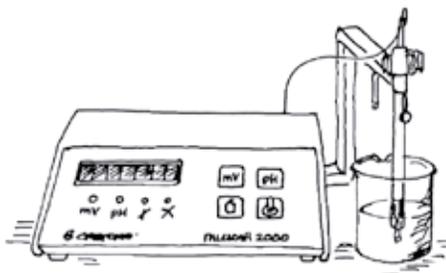


¡ATENCIÓN!

- ◆ Es importante medir todos los días la temperatura de la incubadora y anotarla en una hoja adecuada para este fin, donde se consigne: la fecha, hora y firma del usuario. Esta medida nos asegura un control diario del buen funcionamiento del sistema.

POTENCIÓMETRO

- ◆ Es un equipo que se usa para medir la diferencia de potencial entre dos puntos. Se utiliza en el laboratorio para medir el pH de las soluciones.
- ◆ Consta de un conductor de sección uniforme por el cual circula una corriente continua, la diferencia de potencial entre dos puntos cualesquiera es proporcional a la distancia entre ellos.



ESPECTROFOTÓMETRO



- ◆ **La espectrofotometría**, se basa en la propiedad de ciertas sustancias que tienen color propio, o pueden dar lugar a productos finales coloreados con ciertas reacciones químicas. De esta manera, la intensidad del color puede utilizarse para medir la concentración de dicha sustancia.
- ◆ El espectrofotómetro consta de las siguientes partes:

FUENTE DE LUZ

Cuando se trabaja con luz visible y ultravioleta, se emplea un foco con filamento de tungsteno. Habitualmente se trata de una lámpara de bajo voltaje constante o de una batería.



DISPOSITIVO DE MONOCROMIA

Suelen emplearse filtros de luz de vidrio coloreado o de gelatina coloreada con sustancias adecuadas, entre dos placas de vidrio. Los filtros de vidrio o gelatina coloreada transmiten la luz entre límites bastantes amplios de longitudes de onda. Este hecho hace que no pueda utilizarse cuando se requiere trabajar con longitudes de onda más precisas.

PORTAMUESTRAS

Pueden ser tubos de ensayo redondos o cubetas de paredes planas. Se emplea generalmente tubos redondos, por su menor costo.

CONTROL DE SENSIBILIDAD

Se utiliza una hendidura variable o un diafragma iris para modificar la cantidad de luz que llega al elemento fotosensible.

DETECTORES FOTOSENSIBLES

Son fotoceldas de capa interpuesta, formadas por una placa metálica sobre la cual se deposita un semiconductor. El voltaje que produce la fotocelda de capa interpuesta es proporcional a la cantidad de luz que llega y se mide directamente.

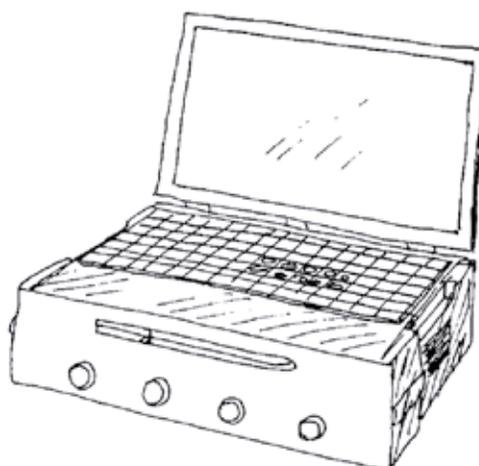
UN APARATO DE LECTURA O REGISTRO, GALVANÓMETRO CALIBRADO EN UNIDADES DE ABSORBANCIA O GRAFICADOR

Para los análisis químicos habituales, suelen preferirse los instrumentos basados en fotoceldas con capa interpuesta, pues su mantenimiento no es costoso.

Para manejar adecuadamente la instalación, contribuir al mantenimiento del sistema, se requiere seguir las instrucciones del fabricante. Es preciso, asimismo, conocimientos de química.

AGLUTINOSCOPIO

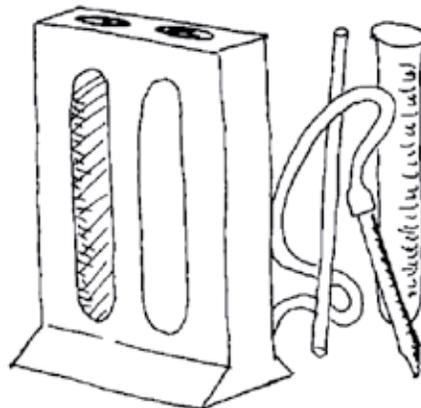
- ◆ Se utiliza en la prueba serológica para el diagnóstico de brucelosis.
- ◆ Está compuesto de un estuche de madera de 48 x 33 x 12 cm. Lleva en su parte anterior un tubo fluorescente de 15 vatios o un foco de 25 vatios, que permite iluminar oblicuamente la mezcla de suero antígeno.
- ◆ Tanto el interior como el exterior está pintado de color negro mate. Está provisto de una tapa de vidrio para evitar una evaporación demasiado rápida de la mezcla de suero.



HEMOGLOBINÓMETRO DE SAHLI

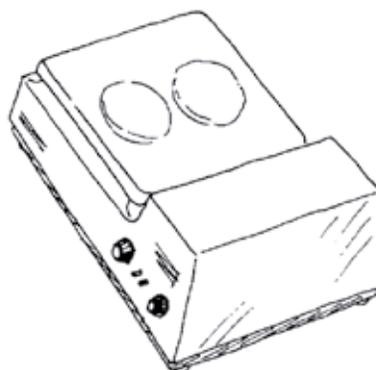


- ◆ Es un equipo que mide la hemoglobina por comparación visual, el principio que la sustenta es que la sangre se diluye en una solución ácida y la hemoglobina se transforma en hematina ácida. El color de la solución de ensayo se compara con el de un cristal de referencia.
- ◆ Consta de un tubo especialmente calibrado que contiene solución ácida. La mezcla de la sangre y el ácido producirá un color castaño pardusco. Este tubo calibrado se coloca en el hemoglobinómetro y se compara con el color del tubo patrón de referencia.
- ◆ Es un instrumento de fácil manejo pero no es útil para calcular con precisión la hemoglobina, porque no todas las formas de la hemoglobina circulante se transforman en hematina ácida y la comparación de colores a simple vista no es exacta.



ROTADOR

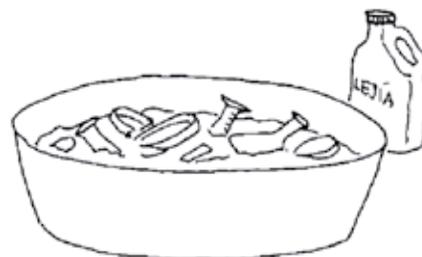
- ◆ Es un agitador rotatorio de 180 ciclos por minuto, que describe un círculo de 2 cm de diámetro en un plano horizontal. Se utiliza en la prueba de VDRL.
- ◆ Sobre la plataforma rotatoria se encuentran dos placas de vidrio con anillos de cerámica que limitan superficies de 14 mm de diámetro.
- ◆ A la izquierda de la plataforma se ve un contador que registra el número



MATERIAL DE VIDRIO

PROCEDIMIENTOS PARA LIMPIAR MATERIAL DE VIDRIO SUCIO

1. Colocar en un recipiente que contenga lejía al 10%, los materiales sucios y dejar en reposo por 2 - 3 horas.
2. Eliminar la lejía lavando el material a chorro de agua, enseguida dejar en solución saturada de detergente durante 30 minutos.
3. Lavar con cepillo (cepillar 4 veces), enjuagar con agua de caño y luego con agua destilada.
4. Escurra los materiales (vasos, matraces, probetas), con las bocas hacia abajo en una canastilla de alambre y cubrir con tela delgada.



5. El material limpio y seco se deberá guardar en una alacena para protegerlo del polvo. Es mejor taponar los utensilios de vidrio con algodón no absorbente, o cubrir la boca con pequeñas tapas hechas de papel *Kraft*.



PROCEDIMIENTOS PARA LIMPIAR MATERIAL DE VIDRIO NUEVO

- ◆ Los materiales de vidrio nuevo que nunca se utilizaron son ligeramente alcalinos. Para neutralizarlos debe hacerse lo siguiente:
 1. Poner en un recipiente adecuado 3 litros de agua con 60 mL de ácido clorhídrico (solución al 2%).
 2. Sumergir los materiales de vidrio sin usar en esta solución por 24 horas.
 3. Enjuagar dos veces con agua corriente y una vez con agua desmineralizada. Por último, secarlos.

PROCEDIMIENTOS PARA LIMPIAR LÁMINAS PORTAOBJETOS NUEVAS

1. En un recipiente adecuado preparar agua con detergente, colocar las láminas una a una y dejarlas en remojo toda la noche.
2. Enjuagar cada lámina con agua de caño.
3. Limpiar una a una, con un trapo suave, que no desprenda pelusa. Colocarlas separadas, sobre una hoja de filtro de papel, una a una. Dejarlas secar. Luego, juntarlas en grupos de 10 o 20 y envolverlas con hojas de papel.



PROCEDIMIENTOS PARA LIMPIAR LÁMINAS PORTAOBJETOS SUCIAS

1. Si presentan residuos de aceite de inmersión frotarlas con papel periódico.
2. Preparar un recipiente con agua fría o tibia y detergente. Si las láminas se han usado con muestras infectadas (orina, heces, etc.) se deben colocar en solución desinfectante. Dejarlas en remojo durante 24 horas.
3. Enjuagarlas por separado bajo el chorro de agua y a continuación ponerlas en remojo durante 30 minutos en un recipiente lleno de agua.
4. Para la limpieza, secado y envoltura, seguir las mismas instrucciones que se han dado para los portaobjetos nuevos.



PROCEDIMIENTOS PARA LIMPIAR PIPETAS

1. Tan pronto como se haya usado una pipeta colocarla en un recipiente que contenga lejía al 10% o fenol al 5% por 2 - 3 horas.
2. Enjuagar con agua de caño y lavar con solución saturada de detergente.
3. Enjuagar cada una detenidamente con el chorro de agua del caño. Secar las pipetas de vidrio Pyrex en el horno de aire seco a 60 °C y las de vidrio ordinario en la incubadora a 37 °C o al aire.



PROCEDIMIENTOS PARA LIMPIAR CUBREOBJETOS



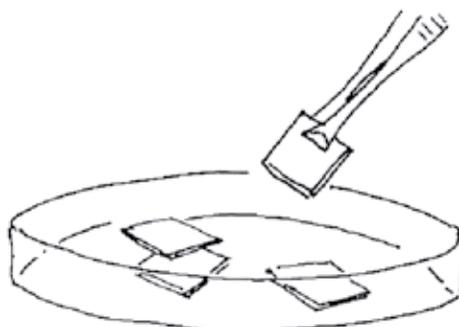
- ◆ Después de usar los cubreobjetos se pueden recuperar, limpiar y usar nuevamente.

- ◆ Para limpiarlos:

1. Remojarlos en una solución de detergente más un desinfectante:
3 mL de detergente de uso doméstico en 200 mL de agua y 15 mL de lejía. Dejarlos en remojo durante 2 - 3 horas, moviéndolos suavemente de vez en cuando.



2. Enjuagar cuatro veces el recipiente donde están los cubreobjetos con agua de caño, agitándolo suavemente.
3. Lavar por último con agua desmineralizada.
4. Escurrir los cubreobjetos, colocándolos cuidadosamente de punta sobre una pieza de gasa doblada.
5. Secarlos en el horno de aire caliente a 60 °C.
6. Conservarlos en una placa Petri pequeña. Utilizar una pinza para sacarlos.

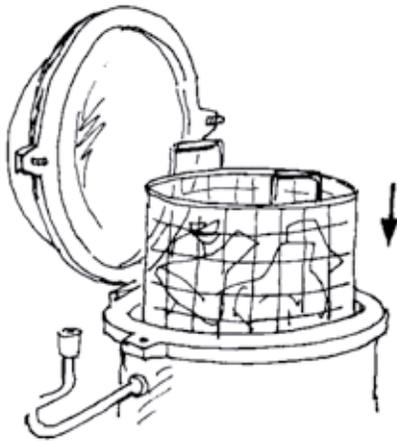
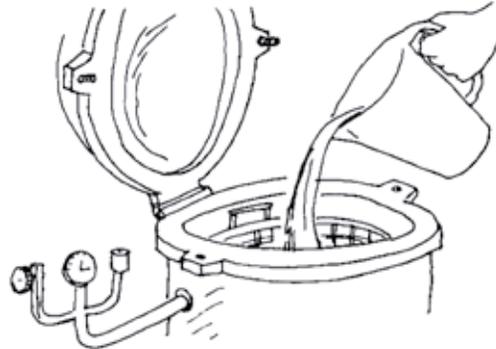




PROCEDIMIENTOS PARA LA ESTERILIZACIÓN.....	79	Materiales.....	125
RECIPIENTES PARA TOMA DE MUESTRAS	80	Método.....	126
Principios generales.....	80	Método de recuento.....	128
FRASCOS Y TUBOS PARA RECOLECTAR		RECuento DEL NÚMERO DE ERITROCITOS	
MUESTRAS DE SANGRE	82	O GLÓBULOS ROJOS.....	129
Para obtener sangre sin anticoagulante.....	82	Principios generales.....	129
Para obtener sangre con anticoagulante.....	82	Materiales.....	130
OBTENCIÓN DE SANGRE VENOSA	83	Método.....	130
Principios generales.....	83	Procedimiento de recuento.....	132
Sangre coagulada.....	84	HEMATOCRITO	134
Sangre anticoagulada.....	84	Principios generales.....	134
Materiales.....	85	Método de microescala.....	134
Método de obtención.....	85	HEMOGLOBINA: CÁLCULO DE	
OBTENCIÓN DE GOTA GRUESA.....	90	LA CIANOMETAHEMOGLOBINA.....	139
Materiales.....	90	MÉTODO FOTOMÉTRICO	139
Método de obtención.....	90	Principios generales.....	139
OBTENCIÓN DE SANGRE CAPILAR.....	93	Materiales.....	139
Método de obtención.....	93	Calibración del colorímetro.....	140
PREPARACIÓN DE EXTENSIONES DE SANGRE.....	94	Método fotométrico de la cianometahemoglobina.....	142
Principios generales.....	94	TIEMPO DE SANGRÍA	145
Materiales.....	94	MÉTODO DE DUKE	145
Método de obtención.....	94	Principios generales.....	145
Preparación de la extensión.....	95	Materiales.....	145
TINCIÓN DE EXTENSIONES DE SANGRE.....	99	Método.....	145
Principios generales.....	99	Resultados.....	147
Tinción de Leishman.....	99	TIEMPO DE COAGULACIÓN DE LA SANGRE	
Tinción de Giemsa.....	101	COMPLETA.....	148
Tinción de Wright.....	103	MÉTODO DE LEE Y WHITE	148
Resultados.....	104	Principios generales.....	148
LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS	105	Materiales.....	148
Tipos de células sanguíneas.....	105	Método.....	148
ESTUDIO DE LAS CÉLULAS		Resultados.....	150
SANGUÍNEAS.....	106	TIPIFICACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS y RH... 151	
HEMOGRAMA COMPLETO.....	106	Principios generales.....	151
Principios generales.....	106	CLASIFICACIÓN DE LOS GRUPOS A, B, y O	
Materiales.....	107	POR MEDIO DE ANTISUEROS.....	152
Método.....	107	Principios generales.....	152
Resultados anormales.....	110	Método del portaobjetos.....	153
Examen de los leucocitos.....	112	Método del tubo de ensayo.....	157
Descripción de los tipos de leucocitos.....	114	CLASIFICACIÓN DEL GRUPO RHESUS (Rh).....	161
Células anormales.....	117	Principios generales.....	161
GLÓBULOS ROJOS O ERITROCITOS		Método del portaobjetos.....	161
ANORMALES.....	120	Método del tubo de ensayo.....	165
Principios generales.....	120	COMPATIBILIDAD SANGUÍNEA	167
Alteraciones estructurales en el tamaño.....	121	Principios generales.....	167
Alteraciones estructurales en la forma.....	122	Materiales.....	167
Alteraciones cromáticas.....	123	Método.....	167
Inclusiones anormales.....	124	Resultados.....	169
RECuento DEL NÚMERO DE LEUCOCITOS		VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN LOS	
O GLÓBULOS BLANCOS.....	125	ERITROCITOS.....	170
Principios generales.....	125	Principios generales.....	170
		Métodos.....	171
		Método de Westergren.....	171
		Método de Wintrobe.....	173

PROCEDIMIENTOS PARA LA ESTERILIZACIÓN

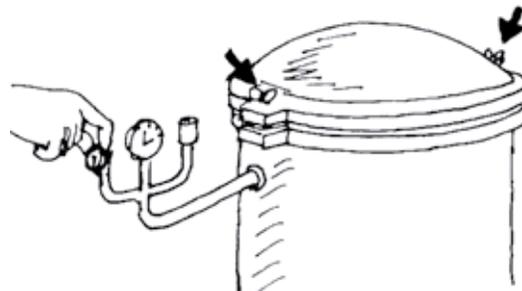
1. Llenar con agua el fondo de la autoclave, hasta el soporte de la canasta



2. Introducir en el autoclave la canasta con los materiales que se van a esterilizar.

El material y los objetos que se han de esterilizar deben agruparse sin apretarlos de modo que el vapor pueda circular sin dificultad y que pueda salir fácilmente. Las bolsas de plástico estarán abiertas para que el vapor penetre en su contenido.

3. Cerrar la tapa del autoclave, cerciorándose que la arandela de goma se encuentre en su surco. Entornillar a niveles iguales los sujetadores de la tapa.

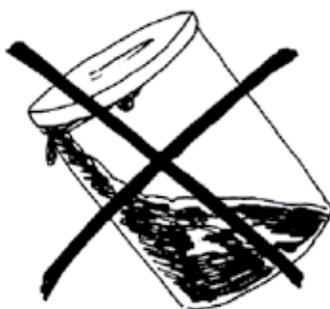


4. Abrir la válvula de salida del aire.
5. Iniciar el calentamiento del autoclave.

RECIPIENTES PARA TOMA DE MUESTRAS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Los recipientes para las muestras pueden ser de vidrio o de plástico.



- ◆ Los recipientes **deben ser fuertes** y **no permitir fugas** cuando la tapa o el tapón están correctamente aplicados.

- ◆ En el exterior del recipiente no debe quedar ningún material de la muestra.



- ◆ Deben estar **correctamente rotulados** para facilitar la identificación en el laboratorio. Rotular el frasco o el tubo con el nombre o código que identifique al paciente, así como la fecha de la toma de muestra. No debe rotularse la tapa.

- ◆ Los formularios de petición de examen de la muestra no se envolverán alrededor de los recipientes sino que se colocarán por separado, de preferencia en sobres plásticos.



- ◆ En las muestras que se sospeche la presencia de **microorganismos infectantes**, por ejemplo, el **virus de hepatitis B** o el **virus de inmunodeficiencia humana (VIH)** deben estar identificados en el recipiente y en el formulario de examen con una etiqueta especial "**Peligro de infección**" o "Sustancia infecciosa".

- ◆ Para evitar fugas o derramamientos accidentales se debe usar recipientes secundarios como bandejas, o cajas, equipados con gradillas de modo que estén en posición vertical los recipientes que contienen las muestras.



- ◆ Los recipientes secundarios pueden ser de metal o de plástico. Se deben descontaminar con regularidad, por autoclave o con desinfectantes químicos.

FRASCOS Y TUBOS PARA RECOLECTAR MUESTRAS DE SANGRE

PARA OBTENER SANGRE SIN ANTICOAGULANTE

- ◆ Usar tubos limpios y secos con capacidad para 5 - 20 mL.
- ◆ El mejor tipo de tubo es aquel que se puede centrifugar, evitando así la manipulación excesiva de las muestras.

PARA OBTENER SANGRE CON ANTICOAGULANTE

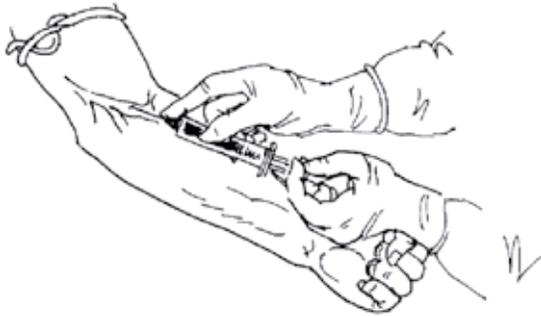
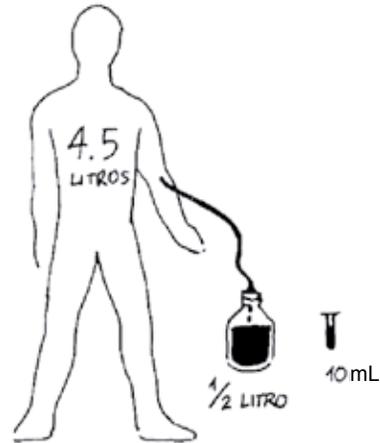
- ◆ Usar frascos o tubos graduados limpios, secos antes de añadir el anticoagulante.
- ◆ Colocar etiquetas en los tubos de modo que el borde superior de éstas quede al nivel de la sangre que se requiere (2mL, 5mL, etc.) y guardarlos en un lugar seco.



OBTENCIÓN DE SANGRE VENOSA

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Un adulto que pesa 60 kilos tiene aproximadamente 4,5 litros de sangre. Por lo tanto, **no existe peligro** si se llenan dos o más tubos de ensayo de 10 mL para el estudio de su sangre. Se debe explicar esto a los pacientes que muestren temor al extraer sangre venosa.



- ◆ **La sangre venosa** se extrae de una vena del brazo por medio de una aguja y una jeringa.

- ◆ **Es importante considerar toda muestra como sospechosa** de VIH u otra enfermedad que puede ser transmitida por la sangre.

- ◆ **Usar guantes** durante la obtención y procesamiento de la muestra.



SANGRE COAGULADA

- ◆ Cuando la sangre se coloca en un tubo de vidrio se solidifica en 5 - 10 minutos formando un coágulo. Se separa en dos componentes:

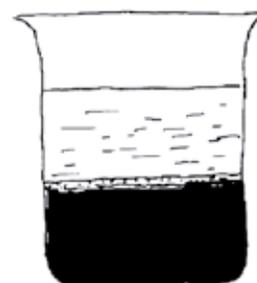
- El suero, un líquido amarillo.
- El coágulo, una masa sólida de color rojo.



SANGRE ANTICOAGULADA

- ◆ Si se añade a la sangre un anticoagulante especial tan pronto como se extraiga, se evitará que se coagule y seguirá siendo líquida. La sangre tratada con un anticoagulante se separa en dos componentes:

- El plasma, un líquido amarillo.
- Las células sanguíneas, que se sedimentan y forman: una capa delgada de leucocitos y un precipitado de eritrocitos.



MATERIALES

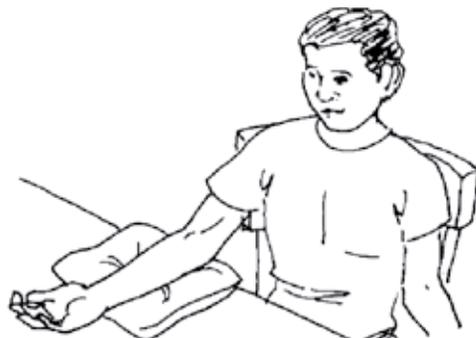
- Etanol al 70% para desinfectar la piel.
- Algodón.
- Una ligadura hecha con un tubo de goma de 2 - 5 mm de calibre.
- Agujas estériles con calibre de 20, 19, 18. En niños menores de cinco años se usan agujas de calibre 23 o 25.
- Jeringas estériles con capacidad para 2,5, 10 o 20 mL de acuerdo con el examen solicitado. Verificar que la desembocadura de cada jeringa se ajuste adecuadamente a la entrada de las agujas.
- También se pueden utilizar jeringas descartables con sus respectivas agujas, provenientes de sus envases originales.
- Frascos y tubos para recolectar muestras de sangre.
- Rótulos para los frascos o tubos. Preparar y rotular el frasco o el tubo adecuado, que usará para el examen correspondiente.
- Un depósito de metal que contenga lejía u otro desinfectante para colocar el material utilizado.

MÉTODO DE OBTENCIÓN

- ◆ Leer con cuidado la orden de examen del paciente y decidir la cantidad de sangre que se necesitará.

POSICIÓN DEL PACIENTE

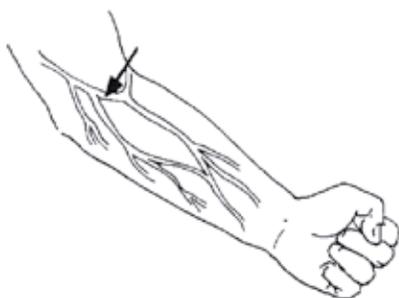
1. Si el paciente se encuentra en el laboratorio, hacer que se siente. Poner el brazo del paciente sobre la mesa de trabajo apoyándolo en un pequeño cojín bajo el codo, con la palma de la mano hacia arriba.



2. Si el paciente se encuentra en cama, extender el brazo del paciente en una posición descansada.



PUNTO PARA LA EXTRACCIÓN DE SANGRE



3. El sitio más adecuado es la vena que se encuentra en el pliegue anterior del codo, en el punto donde es más gruesa y visible.

USO DE LA JERINGA

4. Colocar la aguja en la jeringa, tocando sólo la base de la aguja. Asegurarse que la aguja y la jeringa no estén obstruidas.



APLICAR LA LIGADURA

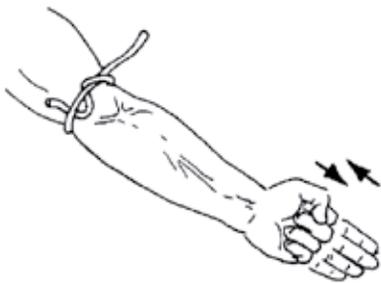


5. Aplicar la ligadura por encima del punto ubicado para la extracción de la sangre.
6. Con la mano derecha colocar, firmemente, la ligadura alrededor del brazo del paciente, y sujetar los extremos.

7. Con la mano izquierda tirar de un extremo cruzándolo y a continuación introducir este extremo por debajo de la parte principal de la ligadura.

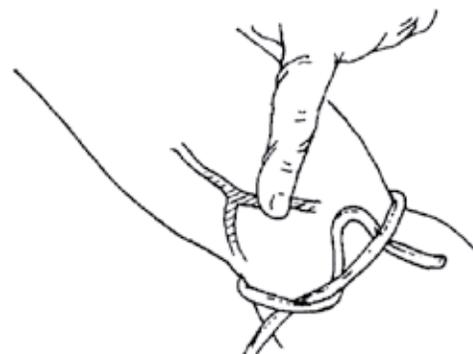


Se deberá ajustar, sólo lo suficiente para aminorar la corriente sanguínea y dilatar la vena, sin apretarla tanto que reduzca el paso de sangre por las arterias.



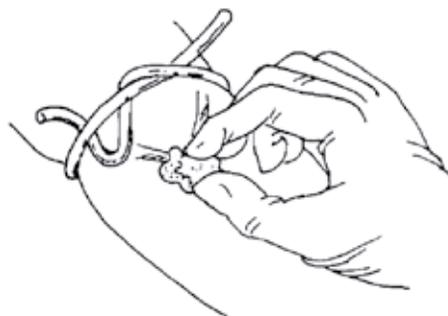
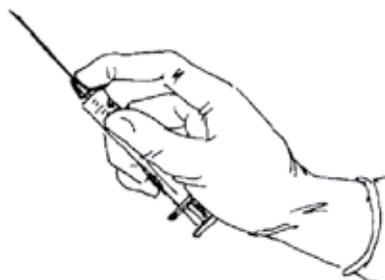
8. Pedir al paciente que abra y cierre la mano varias veces, para favorecer la dilatación de las venas.

9. Con el dedo índice de la mano izquierda palpar la vena en que se introducirá la aguja.





- 10.** Desinfectar la piel con una pieza de algodón embebido en etanol al 70%.



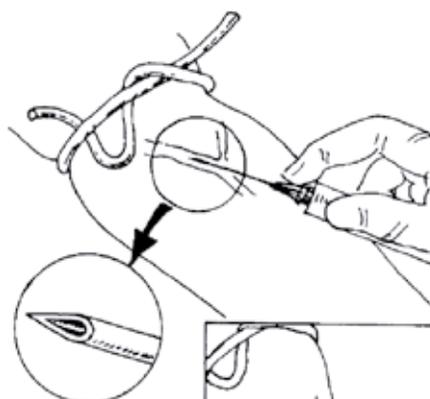
- 11.** Tomar la jeringa con la mano derecha, colocando la yema del dedo índice sobre la base de la aguja.

- 12.** Colocar la aguja sobre la vena, con el bisel hacia arriba.

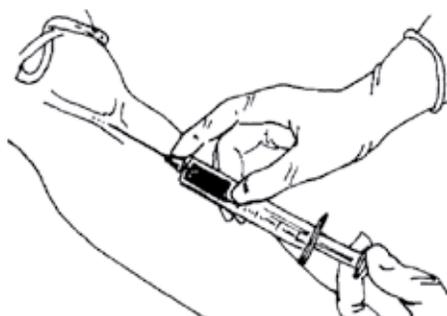
Introducir la aguja en el **centro de la vena**, sin dudar.

Nunca intentar punzar una vena por un lado.

Se **sentirá que la aguja atraviesa la piel.**

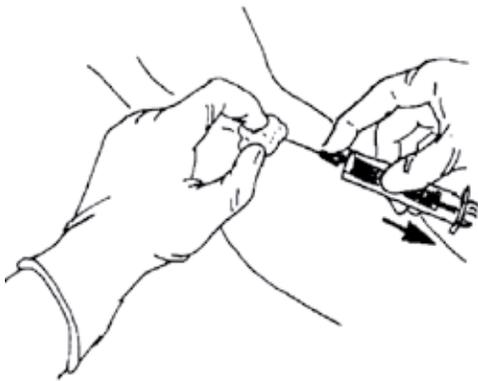
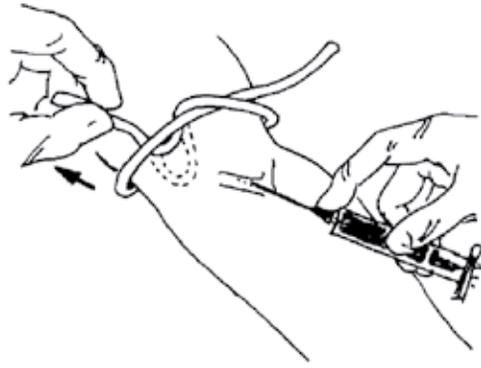


- 13.** Introducir la aguja 1 - 1,5 cm a lo largo de la vena.



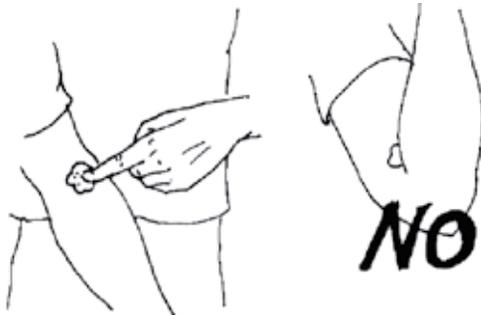
- 14.** Con la mano izquierda tirar hacia atrás el émbolo de la jeringa muy lentamente. Deberá entrar sangre en la jeringa. Llenar la jeringa con la cantidad de sangre que necesite.

15. Retirar la ligadura tirando del extremo doblado.



16. Aplicar un pedazo de algodón seco sobre la parte donde se encuentra oculta la punta de la aguja. Sacar la aguja con un movimiento rápido.

17. Pedir al paciente que presione firmemente el algodón durante 3 minutos, con el brazo extendido. No se recomienda que se flexione el brazo a causa del riesgo que se forme un hematoma.



18. Luego de extraída la sangre venosa, retirar la aguja de la jeringa con el máximo cuidado y depositar la aguja en el recipiente de metal con desinfectante.

19. Llenar los frascos o tubos rotulados con la muestra de sangre. Si estos recipientes contienen anticoagulante, mover varias veces con suavidad y uniformidad el recipiente. No agitar el contenido.

OBTENCIÓN DE GOTA GRUESA

- ◆ El propósito es la detección de parásitos en la sangre.



MATERIALES

- Etanol al 70% para desinfectar la piel.
- Algodón.
- Láminas portaobjetos limpios.
- Una lanceta estéril.



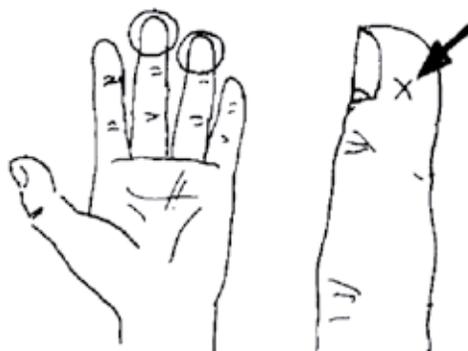
MÉTODO DE OBTENCIÓN

a. Punción del dedo

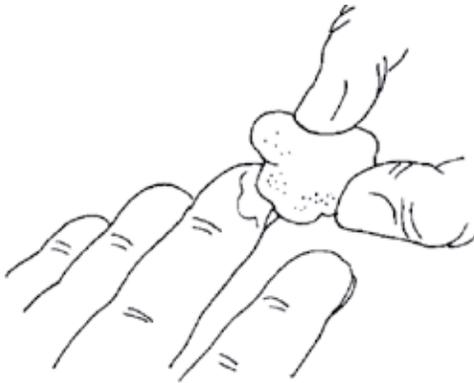
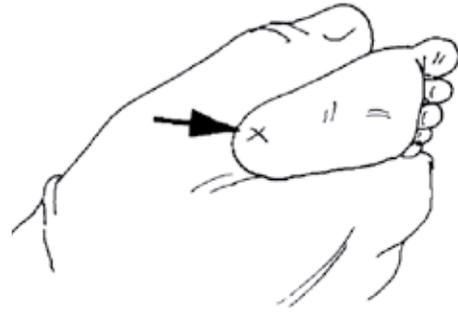
1. Ubicar el dedo anular de la mano izquierda. En el lado externo del dedo, donde la sensibilidad es menor que en la punta.

No extraer sangre de:

- El dedo índice o el pulgar.
- Un dedo infectado.

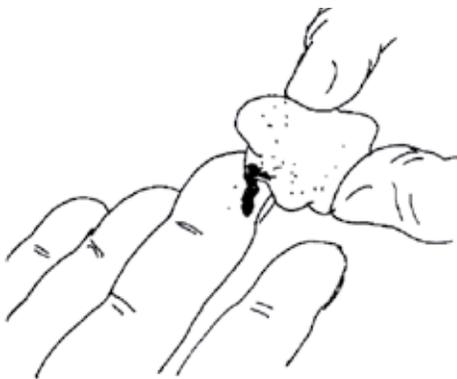
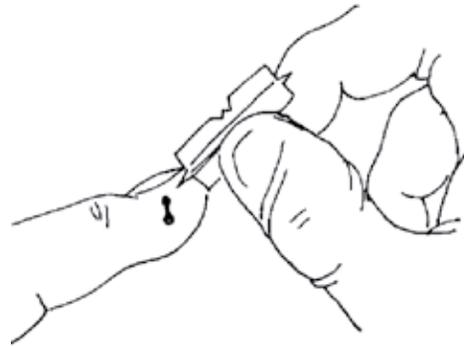


2. En los niños menores de 6 meses, ubicar el talón o el dedo gordo del pie.



3. Limpiar el sitio escogido: usar un pedazo de algodón humedecido en etanol, después pasar un pedazo de algodón seco para retirar los residuos de etanol.

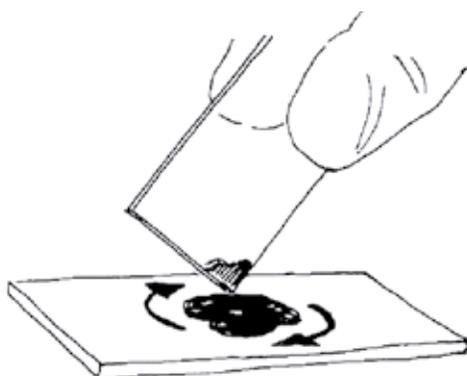
4. Punzar el dedo con la lanceta estéril con firmeza y rapidez.



5. Limpiar la primera gota de sangre con un pedazo de algodón seco.



6. Con la mano derecha tomar un portaobjetos sosteniéndolo por los bordes. Con la mano izquierda oprimir el dedo para extraer una gota de sangre, que debe caer en el centro del portaobjeto sostenido con la mano derecha.



7. Extender la sangre hasta lograr un círculo de aproximadamente 1cm de diámetro y haga que el espesor de la capa sea uniforme, para eso, usar la esquina de un portaobjeto limpio.

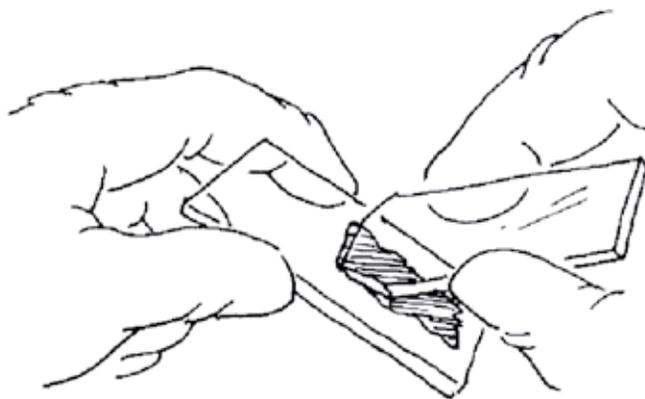
8. Las gotas de sangre demasiado gruesas o demasiado delgadas no toman bien la tinción.

OBTENCIÓN DE SANGRE CAPILAR

- ◆ Se usa para realizar los siguientes exámenes de laboratorio:
 - **Concentraciones del número de eritrocitos.**
 - **Fracciones de volumen de eritrocitos.**
 - **Cálculo de la cantidad de hemoglobina.**
 - **Detección de parásitos.**

MÉTODO DE OBTENCIÓN

- ◆ En relación con la obtención de sangre capilar ver: "**Obtención de gota gruesa de sangre**" hasta el paso 6. Luego proceder a preparar la extensión de sangre.



PREPARACIÓN DE EXTENSIONES DE SANGRE

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La extensión se prepara repartiendo uniformemente una **gota pequeña de sangre** sobre un portaobjeto de manera que solo se deposite una capa de células.
- ◆ Después de teñir, las extensiones se usan para:
 - Determinar los porcentajes de las distintas clases de leucocitos.
 - Detectar glóbulos rojos o blancos anormales.
 - Identificar ciertos parásitos.

MATERIALES

- Alcohol.
- Algodón.
- Una lanceta estéril.
- Portaobjetos de vidrios limpios y desgrasados.



MÉTODO DE OBTENCIÓN

- ◆ Obtener sangre capilar o venosa.
- ◆ Dejar que la sangre salga libremente. **Recoger primero las muestras en que se determinarán las concentraciones de número de las células sanguíneas, si se han solicitado.**

PREPARACIÓN DE LA EXTENSIÓN

a. Lámina extensora

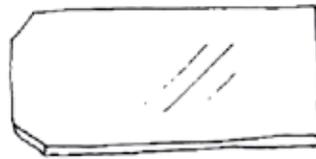
1. Lavar minuciosamente y limpiar con una pieza de tela suave embebida en una mezcla de etanol y éter.

2. Elegir un portaobjeto cuyos bordes estén completamente lisos.



3. Con una sierra pequeña marcar diagonalmente hasta cierta profundidad dos esquinas de uno de los extremos del portaobjeto.

4. Cortar estas dos esquinas.



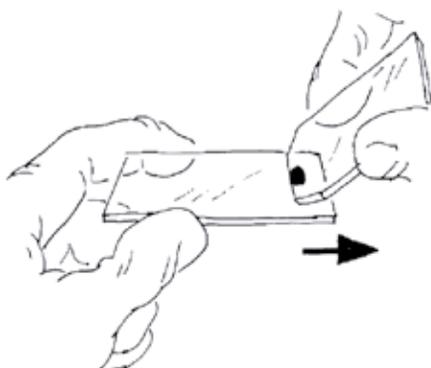
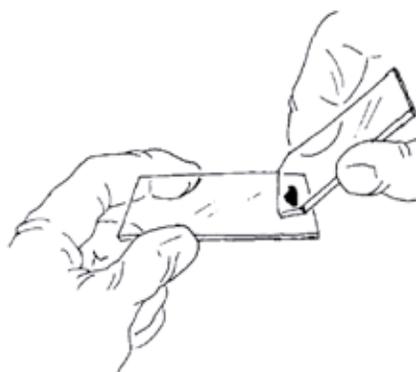
b. La extensión

1. Recoger una gota de sangre tocándola ligeramente con una cara del portaobjeto cerca del extremo de este.





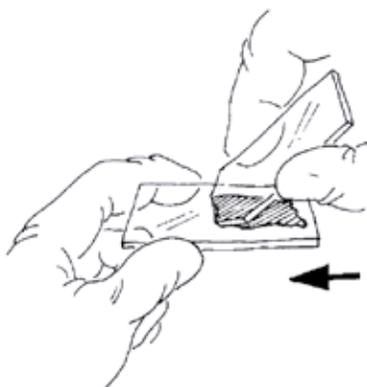
2. Sostener el portaobjeto con una mano. Con la otra mano colocar el borde del portaobjeto que se ha recortado exactamente frente a la gota de la sangre.



3. Desplazar el portaobjeto recortado hacia atrás, hasta que toque la gota de sangre.



4. Dejar que la gota de sangre se extienda por el borde del portaobjeto recortado.



5. Deslizar el portaobjeto recortado hacia el extremo opuesto del portaobjeto que contiene la gota de sangre con un movimiento suave (extender toda la gota de sangre antes de llegar al extremo del portaobjeto).

C. Una buena extensión

- ◆ Lograr **una buena extensión es sumamente importante.**

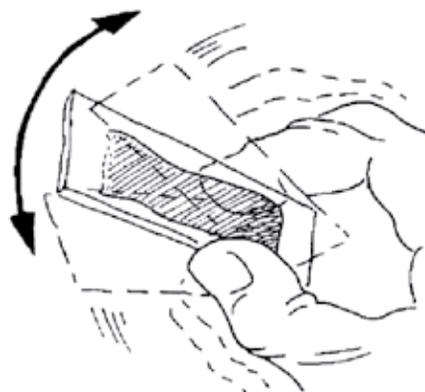
1. Una extensión mal preparada producirá errores en la proporción o en el porcentaje de los tipos de leucocitos y hará imposible que se reconozca la morfología de los glóbulos rojos: **no** deberá haber líneas a lo ancho ni a lo largo de la extensión (la extensión debe tener tres partes: cabeza, cuerpo y cola).



2. **El extremo de la extensión** deberá terminar suave y gradualmente, sin interrupciones.
3. La extensión **no deberá ser demasiado larga ni gruesa.**
4. La extensión **no deberá tener espacios vacíos, esto se produce cuando se usa portaobjeto con grasa.**
5. **Marcar la extensión ya seca** con el nombre o código del paciente. Escribir éstos con un lápiz de grafito en un extremo del portaobjetos cerca a la porción gruesa de la extensión sanguínea.

d. Secado de la extensión

- l. Secar la extensión con rápidos movimientos en vaivén.



- ◆ Es importante que la extensión **se seque de manera adecuada** para conservar su calidad, en especial en climas húmedos.

e. Fijación de la extensión

- ◆ **Fijar las extensiones con metanol para su conservación.** Envuélvase por separado una vez que estén secas, con hojas de papel blanco.

¡ATENCIÓN!

- ◆ **No extraer sangre de:**
 - El dedo índice o el pulgar.
 - Un dedo infectado.
 - La oreja (contiene demasiados monocitos)
- ◆ En caso de usar sangre venosa con anticoagulantes, utilizar solo EDTA(Etilendiamina tetraacético); otros anticoagulantes alteran la morfología de los leucocitos.
- ◆ No dejar la sangre con anticoagulante en reposo antes de preparar la extensión.
- ◆ En caso de obtener sangre venosa, colocar una gota mediana de sangre, directamente de la aguja de extracción, y luego seguir los pasos mencionados para la extensión de sangre.

TINCIÓN DE EXTENSIONES DE SANGRE

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Las extensiones de sangre se colorean con las tinciones de Romanowski, que contienen azul de metileno y eosina.
- ◆ Entre las tinciones más usadas tenemos la:
 - Tinción de Wright.
 - Tinción de Giemsa.
 - Tinción de Leishman.

TINCIÓN DE LEISHMAN

- ◆ Es una coloración especial policromática utilizada para demostrar la presencia y morfología de microorganismos en sangre y tejidos, tales como: *bartonella*, *leptospira*, etc.

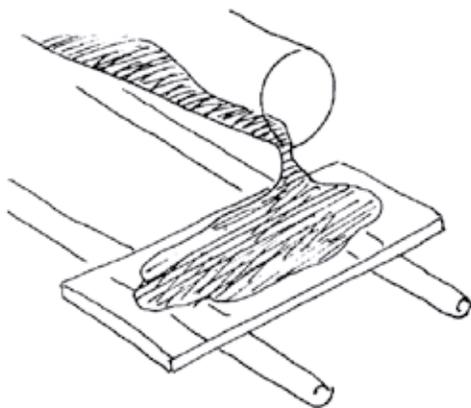
MATERIALES

- Dos varillas de vidrio colocadas a través del fregadero o sobre una cubeta para tinción.
- Solución amortiguada tamponada (ver Anexos).
- Colorante de Leishman (ver Anexos).
- Una gradilla para secar los portaobjetos.
- Un cronómetro.

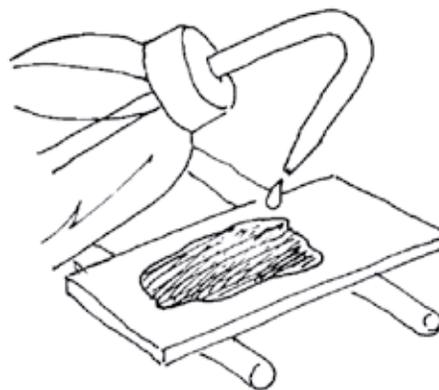


PROCEDIMIENTO

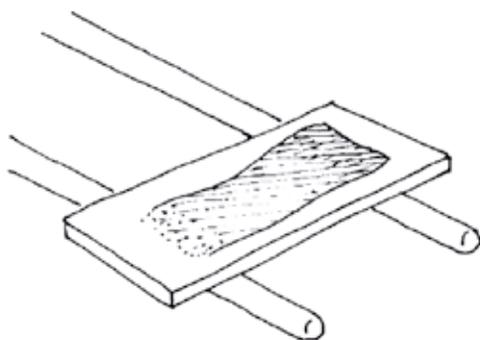
1. Fijar la extensión de sangre con metanol durante 2 - 3 minutos.



2. Cubrir la extensión de sangre con el colorante Leishman por 1 - 2 minutos.

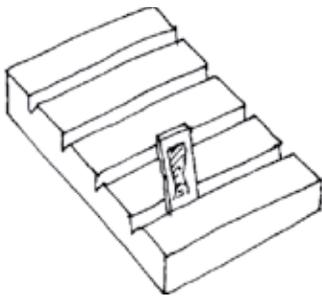


3. Sin eliminar el colorante, añadir solución amortiguada tamponada y mezclar.



4. Dejar actuar en reposo por 8 - 10 minutos.

5. Lavar con agua corriente. Dejar caer el chorro de agua en forma suave, empezando por el borde de la lámina inclinada.



6. Secar a temperatura ambiente.

7. Observar en el microscopio con objetivo de menor aumento y luego con objetivo de inmersión.

TINCIÓN DE GIEMSA

MATERIALES

- Metanol absoluto.
- Colorante Giemsa (ver Anexos).

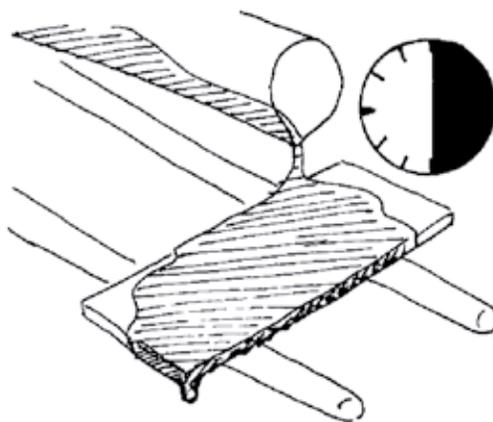
PROCEDIMIENTO

1. Fijar la extensión de sangre con metanol duran





2. Cubrir la extensión de sangre con colorante Giemsa diluido:
 - 1 mL de solución *stock* de Giemsa en 9 mL de agua destilada o *buffer* fosfato (PBS) (ver Anexos).

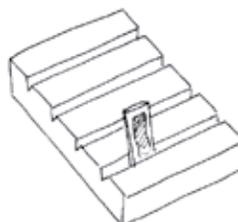


3. Dejar actuar en reposo por 30 minutos.



4. Lavar con agua corriente. Dejar caer el chorro de agua en forma suave, empezando por el borde de la lámina inclinada.

5. Dejar secar a temperatura ambiente.



6. Observar en el microscopio con objetivo de menor aumento (40x) y luego con objetivo de inmersión (100x).

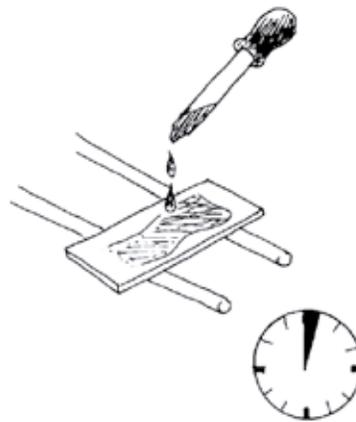
TINCIÓN DE WRIGHT

MATERIALES

- Colorante de Wright (ver Anexos) en un frasco gotero o un cuentagotas.
- Solución amortiguada tamponada (ver Anexos).

PROCEDIMIENTO

1. Cubrir la extensión de sangre con unas gotas de colorante Wright. Contar las gotas.

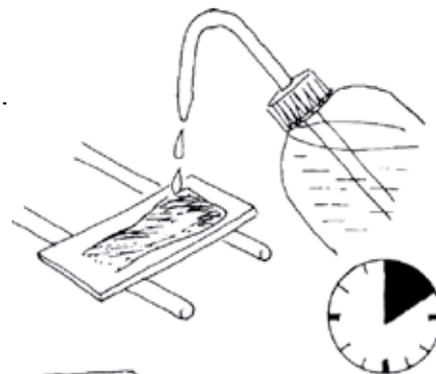


2. Dejar actuar en reposo durante 1 – 2 minutos.

3. Agregar sobre el colorante el mismo número de gotas de solución amortiguada tamponada y mezclar rápidamente, que puede ser hecho soplando suavemente (debe formarse una capa plateada).

4. Dejar reposar la mezcla por 10 minutos.

5. Lavar con agua corriente. Dejar caer el chorro de agua en forma suave, empezando por el borde de la lámina inclinada.



6. Dejar secar a temperatura ambiente.



7. Observar en el microscopio con objetivo de menor aumento (40x) y luego con objetivo de inmersión (100x).

RESULTADOS

- ◆ Cuando el método ha sido aplicado correctamente, se obtienen resultados similares:
 - Los eritrocitos se observan de color: **naranja.**
 - Los núcleos se observan de color: **púrpura.**
 - Los gránulos basófilos de color: **púrpura azulado.**
 - Los gránulos neutrófilos de color: **rojo lila.**
 - Los gránulos eosinófilos de color: **rojo naranja.**

¡ATENCIÓN!

- ◆ Evitar la formación de depósitos de colorante. Tienen aspecto de manchas negras y pequeñas en las extensiones de sangre.
- ◆ Evitar las tinciones defectuosas, que dan por resultados extensiones demasiado azules, oscuras o rojizas.
- ◆ Evitar portaobjetos alcalinos o solución amortiguadora alcalina. Producen que el frotis sea demasiado azul.
- ◆ La solución amortiguadora tamponada que se use debe prepararse al momento de su uso, ya que se acidifica al exponerse al aire.
- ◆ No usar portaobjetos sucios con grasa.

LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

- ♦ **La hematología** es el estudio de la sangre, que comprende las células sanguíneas y el líquido que las rodea.
- ♦ Las células sanguíneas se pueden examinar con el microscopio.

TIPOS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

a. **Glóbulos rojos o eritrocitos**

- Aspecto:** Células redondas, asemejan discos bicóncavos llenos de hemoglobina. No poseen núcleo.
- Tamaño:** 7,5 μm .
- Concentración en número:** Aproximadamente 5×10^{12} por litro de sangre (5 000 000 por mm^3 de sangre).
- Función:** Los eritrocitos transportan la hemoglobina, esta a su vez se combina con el oxígeno y lo lleva desde los pulmones hasta los tejidos. Llevan el bióxido carbónico de los tejidos a los pulmones.

b. **Glóbulos blancos o leucocitos**

- Aspecto:** Redondos, contienen un núcleo y algunos gránulos.
- Tamaño:** 9 - 20 μm .
- Concentración en número:** Aproximadamente 8×10^9 por litro de sangre (8 000 por mm^3 de sangre).
- Función:** Defensa del organismo contra las infecciones.

c. **Plaquetas**

- Aspecto:** Fragmentos de células de formas variadas (triangulares, estrelladas, ovals), con gránulos.
- Tamaño:** 2 - 5 μm .
- Concentración en número:** Aproximadamente 300×10^9 por litro de sangre (300 000 por mm^3 de sangre).
- Función:** Son importantes para la coagulación de la sangre.

ESTUDIO DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

HEMOGRAMA COMPLETO



PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ No todos los leucocitos (glóbulos blancos) que circulan en la sangre son idénticos.
- ◆ Hay cinco tipos principales que se diferencian por el tamaño, la forma del núcleo y el color de los gránulos del citoplasma.
- ◆ La proporción o porcentaje de cada tipo de leucocitos es importante para el diagnóstico. Esta proporción o porcentaje se denomina: **Fórmula leucocitaria**.
- ◆ Para trabajar esta fórmula se cuentan 100 leucocitos y se anota el número que se ha encontrado de cada tipo de ellos.
- ◆ **Los valores normales** de los distintos leucocitos en su proporción relativa (**Fórmula leucocitaria porcentual**) y en cifras absolutas por mm^3 , son:

Fórmula leucocitaria	Proporción relativa (%)	Valores absolutos (mm^3)
Neutrófilos	55 - 65	4000 - 7000
Linfocitos	25 - 35	1500 - 3000
Eosinófilos	0,5 - 4	50 - 400
Monocitos	3 - 8	200 - 800
Basofilos	0,5 - 1	50 - 100

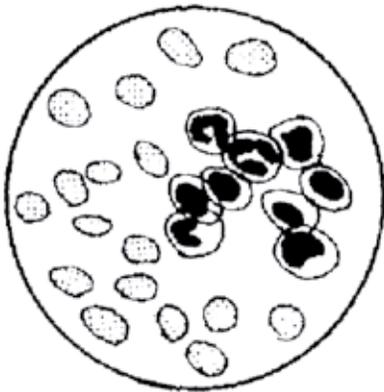
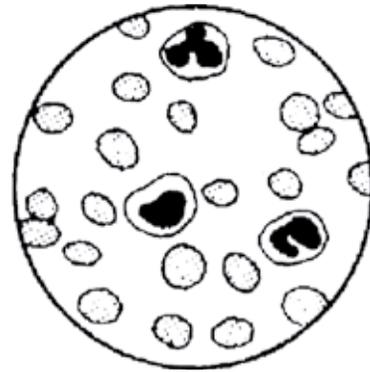
MATERIALES

- Un microscopio con objetivo 40x y un objetivo de 100x.
- Aceite de inmersión.
- Una extensión de sangre, coloreada con Giemsa.
- Un contador especial provisto de teclas, o uno que se haga por medio de frijoles o granos de maíz.

MÉTODO

a. Examen de la extensión

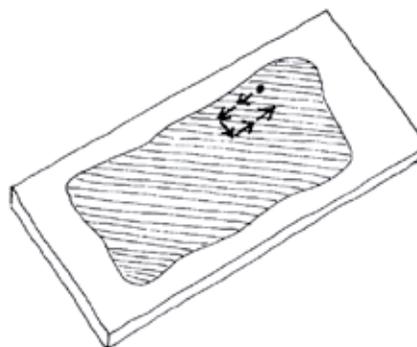
1. Examinar la extensión de sangre coloreada con el objetivo de 40x para comprobar si los elementos celulares están bien distribuidos y la tinción es adecuada.



2. Verificar que los glóbulos blancos se encuentran uniformemente distribuidos en la extensión: si está mal distribuida es posible que los neutrófilos se hallen agrupados.
3. Verificar que la extensión no sea demasiado gruesa.
4. Si la lámina coloreada, está en buenas condiciones, colocar una gota de aceite de inmersión en la lámina y observar con el objetivo de 100x e iniciar el recuento de leucocitos.

b. Recuento de leucocitos

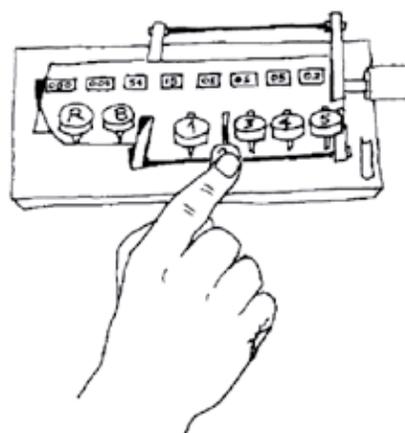
1. Iniciar el recuento en la última porción de la extensión, es decir, donde se observe que los eritrocitos comienzan a agruparse y sobreponerse.
2. Examinar una porción rectangular de la extensión mediante un movimiento ordenado, de un campo a otro, como se indica en la figura.
3. Tomar nota del tipo de leucocito que se observe en cada campo.
4. Contar un total de 100 leucocitos.



c. Procedimientos de recuento

MÁQUINA CON TECLADO

- ◆ Es una máquina contadora, con teclado.
- ◆ Cada tecla corresponde a un tipo de leucocitos. El número de cada tipo de leucocito se registra automáticamente.
- ◆ Es de costo elevado.



CON LÁPIZ Y PAPEL

- ◆ Trazar un cuadro con:
 - **Cinco columnas verticales.**
 - N = Neutrófilos
 - E = Eosinófilos.
 - B = Basófilos.
 - L = Linfocitos.
 - M = Monocitos.
 - **Diez líneas horizontales.**

	N	E	B	L	M
1					1
2		1			
3					
4		1	1		1
5					
6			1		
7					
8			1		
9		1	1		
10		1			
TOTAL	58	8	1	28	5
FRAC.	0.58	0.08	0.01	0.28	0.05

- ◆ A continuación, marcar un palote en el cuadro correspondiente según el tipo de leucocito.
- ◆ Los totales de las columnas corresponderán al porcentaje de cada tipo de leucocitos.

Ejemplo: 58 será 58%
5 será 5%, etc.

Estas cifras constituyen los resultados que se deben comunicar.



RESULTADOS ANORMALES

NEUTROFILIA

- ◆ Es el **aumento de la proporción de neutrófilos (más de 7 000) en sus formas inmaduras** (abastoados, mielocitos, metamielocitos).

LEUCOCITOSIS

- ◆ Es el **aumento de la cifra total de los leucocitos con cifras superiores a 10 000 o 12 000**. Se presenta en infecciones agudas graves.

DESVIACIÓN A LA IZQUIERDA

- ◆ Es el aumento de la proporción de neutrófilos en sus formas inmaduras (abastoados, mielocitos, metamielocitos). Se presenta en infecciones agudas graves.

EOSINOFILIA

- ◆ Es el **aumento de la proporción de eosinófilos (más de 400)**. Ocorre en casos de parasitosis, asma o alergias.

LINFOCITOSIS

- ◆ Es el **aumento de la proporción de linfocitos (más de 3 000)**. Ocorre en casos de infecciones virales (sarampión, etc.) y en ciertas infecciones crónicas (tuberculosis, etc.).



MONOCITOSIS

- ◆ Es el aumento de la proporción de monocitos (más de 800). Se puede observar en casos de infecciones bacterianas.

NEUTROPENIA

- ◆ Es la disminución del número de neutrófilos. Puede ocurrir en enfermedades infecciosas graves.

VALORES NORMALES DE LEUCOCITOS POR GRUPO DE EDAD

	Recién nacido	1-4años	10 años	Adultos
Neutrófilos	5 500 - 6 500	3 600 - 4 800	4 500 -5 500	4 000 - 7 000
Linfocitos	200 - 400	200 - 500	200 -500	50 - 400
Eosinófilos	0 - 100	0 - 100	0 - 100	50 - 100
Monocitos	3 000 - 3 500	4 400 - 5 400	4 400 - 4 500	1 500 - 3 000
Basofilos	300 - 600	300 - 600	300 - 600	200 - 800

PREDOMINIO DE LINFOCITOS

- ◆ En lactantes y niños menores de 10 años.

PREDOMINIO DE NEUTRÓFILOS

- ◆ En adultos, niños mayores de 10 años y recién nacidos.

EXAMEN DE LOS LEUCOCITOS

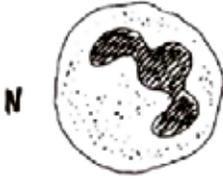
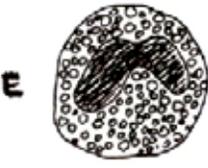
a. Se debe diferenciar y tomar nota

- ◆ Forma y tamaño de los leucocitos en comparación con los glóbulos rojos (R).
- ◆ Forma y tamaño del núcleo en relación con el área total de la célula de los diferentes leucocitos:



Característica	Núcleo	Esquema
Forma y tamaño	- Redondo(r) - Lobulado(l) - Dentado(d)	
Cromatina	Intensamente o débilmente teñida	
Posición	Central o excéntrica	

♦ **Del citoplasma** de los diferentes leucocitos:

Característica	Citoplasma	Esquema
Color	Incolor, rosáceo, azul pálido u oscuro	
Gránulos Los granulocitos son: neutrófilos, eosinófilos y basófilos	- Gránulos neutrófilos (N) , pequeños, color malva.	
	- Gránulos eosinófilos (E) , grandes, color anaranjado	
	- Gránulos basófilos (B) , Voluminosos, color morado oscuro	

♦ Las **vacuolas** y **nucléolos** constituyen áreas ovales o redondas, que no se tiñen o lo hacen débilmente.

- **Las vacuolas (V)** se encuentran en el citoplasma.
- **Los nucléolos (N)** se encuentran en el núcleo.

EJEMPLO

- ♦ **Los neutrófilos polimorfonucleares (P)** tienen un núcleo con varios lóbulos y gránulos en el citoplasma (de allí que también se les llama granulocitos).
- ♦ **Los linfocitos (L) y los monocitos (M)** tienen un núcleo compacto y citoplasma con gránulos o sin ellos.



DESCRIPCIÓN DE LOS TIPOS DE LEUCOCITOS

a. *Neutrófilos polimorfonucleares o granulocitos*

- Tamaño:** 12 - 15 μm .
- Forma:** Redonda, bien definida.
- Citoplasma:** Abundante, rosáceo.
- Gránulos:** De color malva, muy pequeños, numerosos pero separados.
- Núcleo:** Varios lóbulos (de 2 a 5), unidos por puentes de cromatina, que tiene el aspecto de una masa uniforme de color morado oscuro. A medida que envejece el leucocito aumenta el número de lóbulos del núcleo.

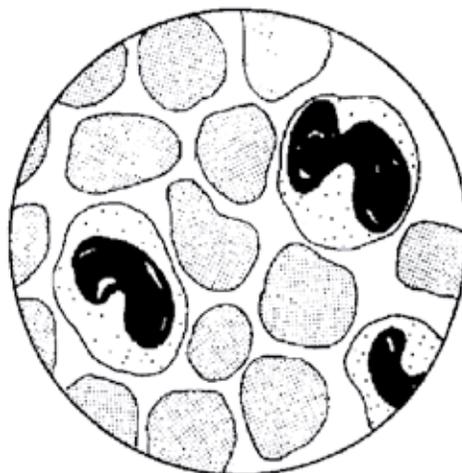


b. *Abastoados o neutrófilos polimorfonucleares inmaduros*

Llamados también "**en banda**" o "**en cayado**".

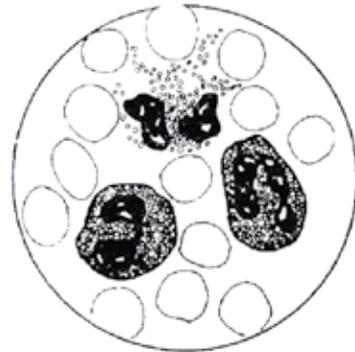
A diferencia de las anteriores es que el núcleo tiene forma de "**S**".

Si se observa este tipo de leucocitos notifiqúese su porcentaje del mismo modo que las de otros tipos de leucocitos.



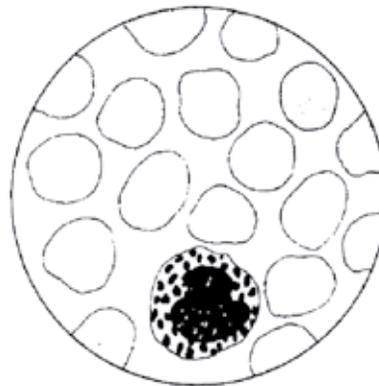
c. *Eosinófilos polimorfonucleares*

- Tamaño:** 12 - 15 μm .
- Gránulos:** Voluminosos, redondos, de color rojo anaranjado, abundantes y agrupados estrechamente.
- Núcleo:** Generalmente consta de dos lóbulos. Algunas veces se observa que estos leucocitos se han dañado y los gránulos se hallan diseminados en el exterior.



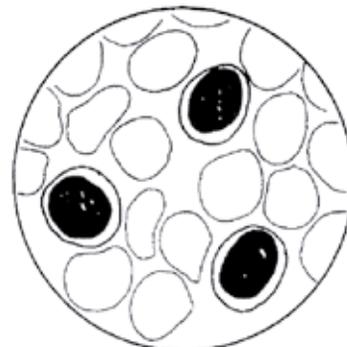
d. *Basófilos polimorfonucleares*

- Tamaño:** 11 - 13 μm .
- Forma:** Redonda.
- Gránulos:** Muy voluminosos, redondos, de color morado oscuro, abundantes pero menos estrechamente agrupados que los gránulos de los eosinófilos.
- Núcleo:** Difícil de observar, pues se halla cubierto por los gránulos.
- Vacuolas:** En el citoplasma se encuentran escasas vacuolas incoloras y pequeñas.



e. *Linfocitos pequeños*

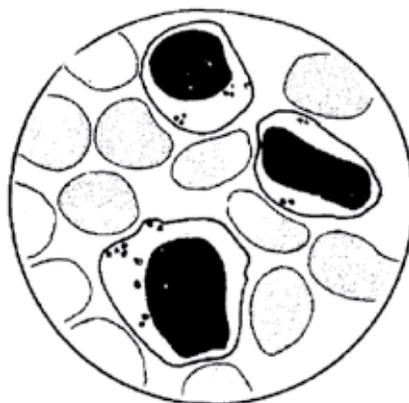
- Tamaño:** 7 - 10 μm .
- Forma:** Redonda.
- Forma:** Redonda.



- Núcleo:** Voluminoso, ocupa la mayor parte de la célula; la cromatina es de color morado oscuro, y densa.
- Citoplasma:** La cantidad visible es reducida, de color azul y sin gránulos.

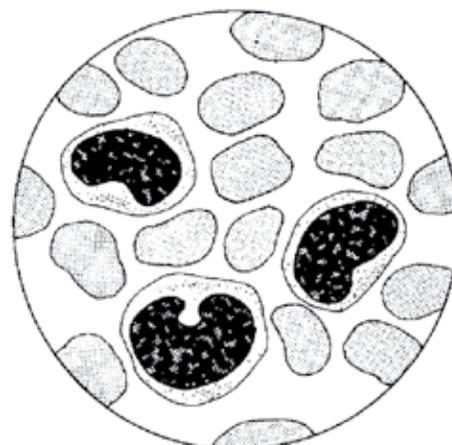
f. Linfocitos grandes

- Tamaño:** 10 - 15 μm .
- Forma:** Redonda o irregular.
- Gránulos:** Escasos, voluminosos y de color rojo oscuro.
- Núcleo:** Oval o redondo puede ocupar un lado de la célula.
- Citoplasma:** Abundante, de color pálido.



g. Monocitos

- Tamaño:** 15 - 25 μm ; son los leucocitos más grandes.
- Forma:** Irregular.
- Gránulos:** Sumamente pequeños; parecen partículas de polvo; generalmente rojizos.
- Núcleo:** Variable, en forma de riñón; la cromatina se dispone en cordones irregulares de color malva pálido.
- Vacuolas:** Casi siempre hay vacuolas en el citoplasma.



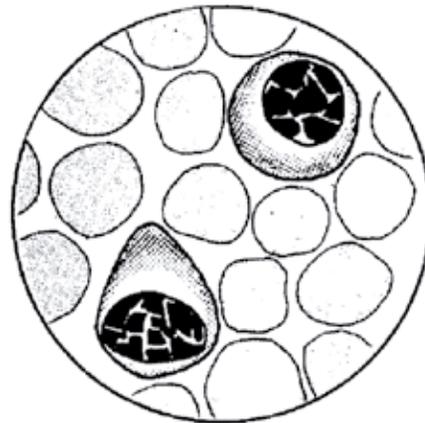
CÉLULAS ANORMALES

a. Células plasmáticas

Producen anticuerpos.

Se observa en casos de sarampión, tuberculosis, otras virosis, infecciones bacterianas y mieloma múltiple.

- Tamaño:** 12 - 15 μm .
- Forma:** Redonda.
- Núcleo:** Redondo, excéntrico, con la cromatina aglutinada semejante a una rueda.
- Citoplasma:** De color azul oscuro, con una tinción débil alrededor del núcleo (halo perinuclear característico).
- Vacuolas:** Numerosas, pequeñas visibles con dificultad.

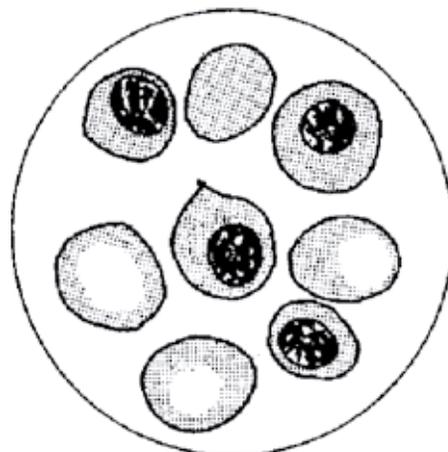


b. Glóbulos rojos nucleados (normoblastos)

Los normoblastos son glóbulos rojos inmaduros y nucleados que normalmente se hallan en la médula ósea.

Se observa en casos de anemia.

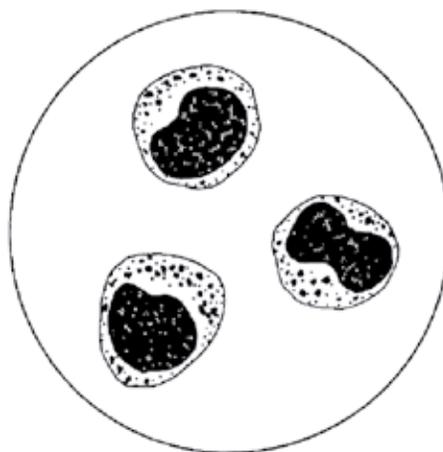
- Tamaño:** 8 - 10 μm .
- Forma:** Redonda.
- Núcleo:** Redondo, a menudo excéntrico, con cromatina aglutinada y densa, se tiñe de color oscuro.
- Citoplasma:** De color azul grisáceo o rosa, sin gránulos.



c. Granulocitos inmaduros (mielocitos y metamielocitos)

Durante las enfermedades bacterianas graves los granulocitos polimorfonucleares inmaduros salen de la médula ósea a la sangre.

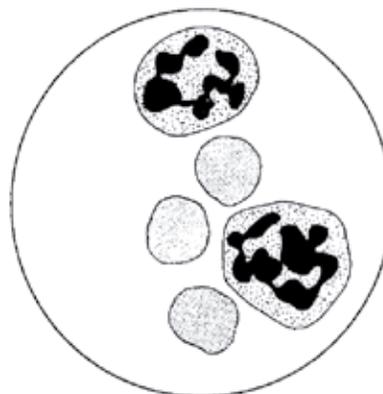
- Tamaño:** 12 - 18 μm .
- Núcleo:** Un solo núcleo sin lóbulos, con cromatina que varía entre el rojo oscuro y el morado.
- Citoplasma:** De color azul pálido o rosáceo.
- Gránulos:** Abundantes, voluminosos, de color malva o rojo oscuro. A veces se observa granulaciones tóxicas con gránulos voluminosos que se tiñen de color oscuro.



d. Neutrófilos polimorfonucleares hipersegmentados

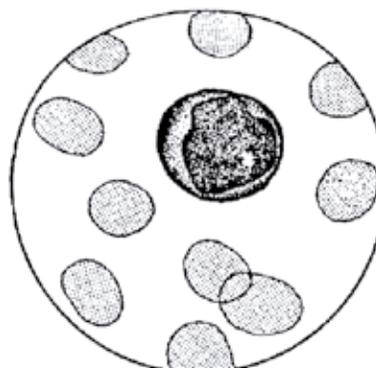
Son neutrófilos polimorfonucleares "viejos", cuyos núcleos presentan de 5 - 10 lóbulos y con frecuencia son voluminosos.

Se presentan en pacientes que sufren anemia macrocítica causada por deficiencias de ácido fólico o vitamina B-12.



e. Linfocitos atípicos

Se encuentran en infecciones por virus, por ejemplo sarampión, tos ferina. También en casos de tuberculosis y paludismo grave.



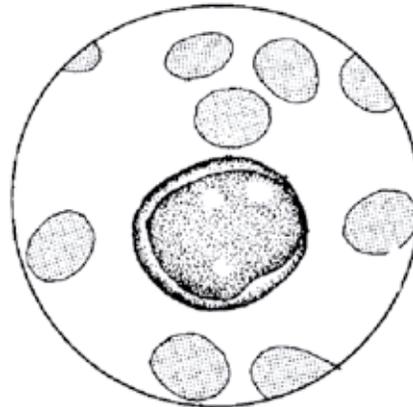
- Tamaño:** 12 – 18 μm .
- Forma:** Irregular.
- Núcleo:** Redondo, excéntrico, con nucléolos visibles.
- Citoplasma:** De color más oscuro que el de los linfocitos grandes; se oscurece a medida que se acerca a la pared de la célula.

f. Mieloblastos

Es el tipo más joven e inmaduro de todas las células de la serie granulocítica.

Se observan en pacientes con leucemia.

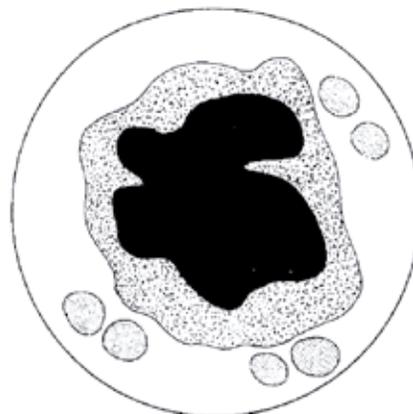
- Tamaño:** 15 - 25 μm
- Núcleo:** Grande, redondo, de color malva, cromatina laxa finamente distribuida, pálido, presenta de 1 - 5 nucléolos.
- Citoplasma:** De color azul oscuro, con un área clara que no se tiñe, situada alrededor del núcleo.



g. Megacariocitos

Son los precursores de las plaquetas de la médula ósea.

- Tamaño:** 60 - 100 μm .
- Núcleo:** Irregular, denso y con abundantes lóbulos.
- Citoplasma:** Lleno de gránulos pequeños y de plaquetas. La pared celular no está bien definida.



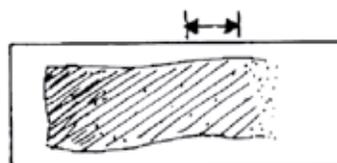
GLÓBULOS ROJOS O ERITROCITOS ANORMALES

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ En algunas enfermedades, principalmente anemias, los glóbulos rojos o eritrocitos pueden sufrir anomalías:
 - **Alteraciones estructurales:**
En la **forma (poiquilocitos)** en el **tamaño (anisocitosis)**.
 - **Alteraciones cromáticas:**
En la **concentración de hemoglobina:** (hipercromía, hipocromía, etc.).
 - **Inclusiones anormales.**

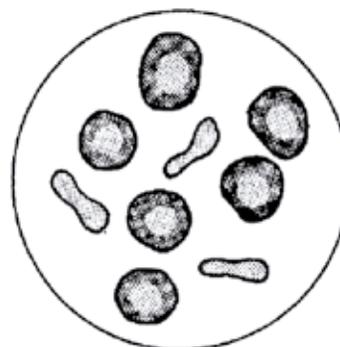
- ◆ **Examen de la extensión**

Los eritrocitos se deben observar **antes del extremo donde termina la extensión de sangre** (en la parte final del cuerpo y comienzos de la cola), en esta porción se hallan separados unos de otros y si se tocan no se sobreponen.



- ◆ **Glóbulos rojos o eritrocitos normales**

- Tamaño:** 7 - 8 μm .
- Forma:** Redonda o ligeramente irregular
- Color:** La periferia se tiñe de color rosa intenso; el centro lo hace de color rosa pálido, o bien es casi incoloro.

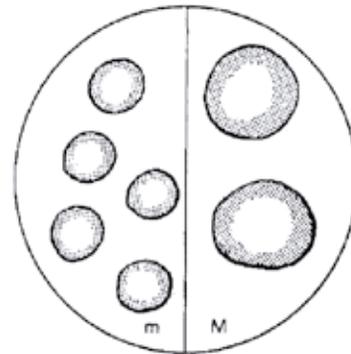


ALTERACIONES ESTRUCTURALES EN EL TAMAÑO

a. *Microcitos (m)*

Se observan en la anemia ferropénica.

Tamaño: Son eritrocitos pequeños, de aproximadamente 5 μm .



b. *Macroцитos (M)*

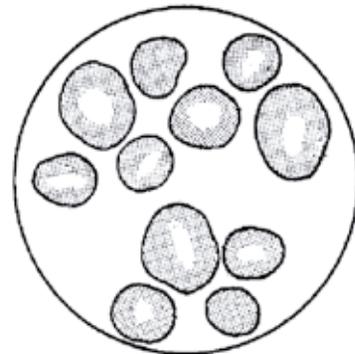
Se observan en anemia macrocítica debido a deficiencia de ácido fólico o vitamina B 12 Y en ciertos padecimientos hepáticos.

Tamaño: Son eritrocitos grandes, de aproximadamente 9 - 10 μm .

c. *Anisocitosis*

Se observan en anemias de diferentes causas.

Tamaño: Son eritrocitos de diferentes tamaños que se encuentran en la misma sangre; hay eritrocitos de 9 μm mezclados con eritrocitos de 6 μm .



ALTERACIONES ESTRUCTURALES EN LA FORMA

a. *Poiquilocitos*

Se observan en anemias de diferentes causas

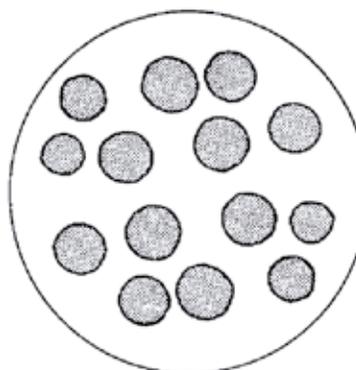
Formas: Son eritrocitos de diferentes formas que se encuentran en la misma sangre; hay eritrocitos de células redondas, ovales, triangulares, piriformes y dentadas.



b. *Esferocitos*

Se observan en anemia hemolítica.

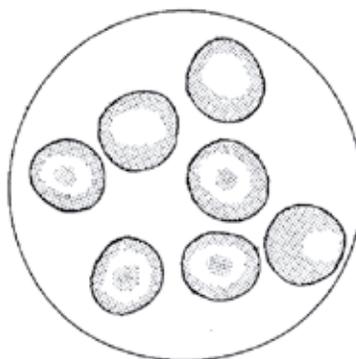
Tamaño: Pequeño (6 μm).
Forma: Completamente redonda.
Color: Uniforme. Todo el eritrocito se tiñe intensamente.



c. *Eritrocitos anillados*

Se observan en anemia drepanocítica, talasemia y otras anemias debido a hemoglobina anómala.

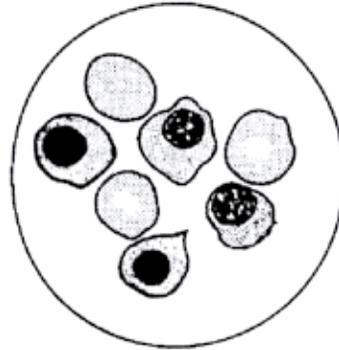
Tamaño: 6 - 8 μm .
Forma: Redonda o ligeramente irregular.
Color: El centro y la orilla se tiñen intensamente, pero entre ambos se observa un anillo incoloro.



d. Eritrocitos nucleados (normoblastos)

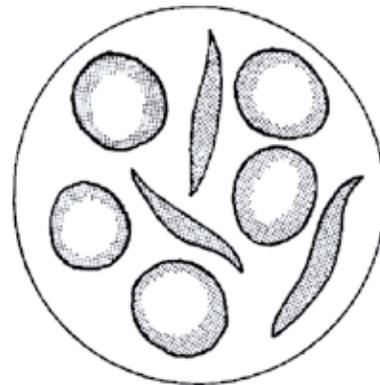
Se observan en las anemias graves y en las leucemias.

- Tamaño:** 8 - 10 μm
- Forma:** Redonda o irregular.
- Núcleo:** Pequeño, de color morado oscuro, excéntrico con cromatinas densas.
- Citoplasma:** De color rosa o azul grisáceo.

**e. Eritrocitos falciformes**

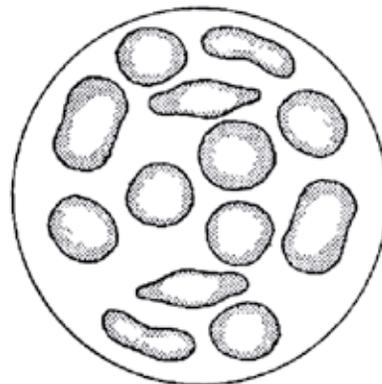
Se observan en las anemias falciformes o drepanocítica y la talasemia falciforme.

- Forma:** Alargada y estrecha con uno o ambos extremos curvos.

**ALTERACIONES CROMÁTICAS****a. Eritrocitos hipocrómicos**

Se observan en anemia ferropénica.

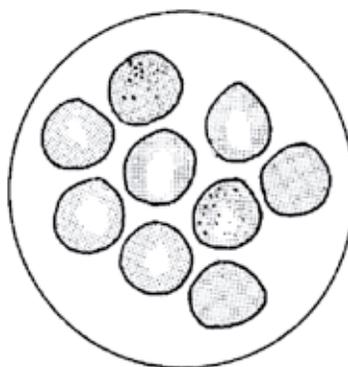
- Tamaño:** Normal o un poco menor que el normal.
- Color:** Sólo se tiñe la periferia a causa de la falta de hierro en el eritrocito.



INCLUSIONES ANORMALES

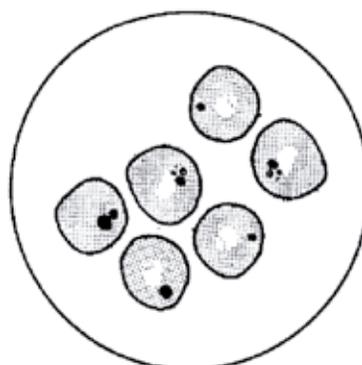
a. *Eritrocitos que contienen gránulos basófilos*

Gránulos: En estos eritrocitos hay un número de gránulos pequeños de color azul violáceo. No confundir con depósitos de los colorantes.



b. *Eritrocitos que contienen cuerpos de Howell y Jolly*

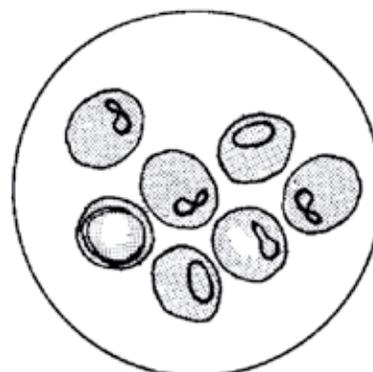
Gránulos: En estos eritrocitos hay cierto número de gránulos voluminosos de color morado (restos de núcleo). No confundir con las plaquetas que se suelen adherir a la superficie de los eritrocitos.



c. *Eritrocitos que contienen cuerpos anulares de Cabot*

En estos eritrocitos se observa líneas delgadas que adoptan la forma de "8".

Siempre que se encuentre con eritrocitos anormales y difíciles de identificar envíe el frotis al laboratorio de referencia.



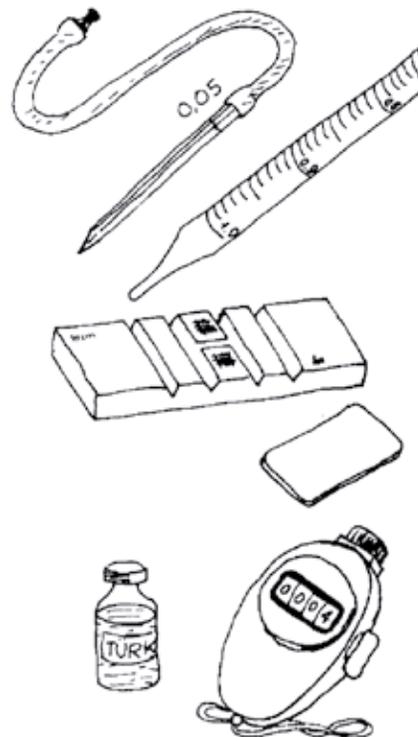
RECUENTO DEL NÚMERO DE LEUCOCITOS O GLÓBULOS BLANCOS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ El recuento del número de leucocitos o glóbulos blancos se expresa por mm^3 (milímetro cúbico).
- ◆ La sangre se deposita en un líquido para diluir leucocitos, dejándolos intactos. En cambio los eritrocitos son destruidos por este líquido.
- ◆ Luego, se cuentan los leucocitos en una cámara de recuento, por medio del microscopio, y se calcula el número que existe por milímetro cúbico de sangre.
- ◆ Es importante conocer el número de leucocitos, pues éste se altera en casos de enfermedades infecciosas.

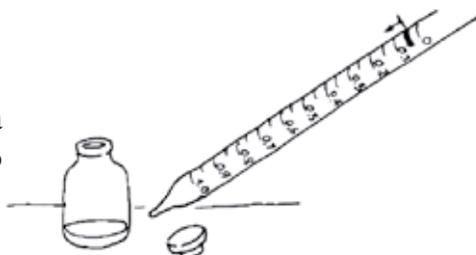
MATERIALES

- Una pipeta para sangre, graduada hasta $50 \mu\text{L}$ ($0,05 \text{ mL}$ o 50 mm^3) con tubo de goma.
- Una pipeta de 1 mL , graduada.
- Una cámara de recuento de Neubauer, de preferencia con "línea brillante". Tapar la cámara con la laminilla de vidrio especial que la acompaña.
- Líquido para dilución: solución de Turk
- Un contador manual, para recuento.

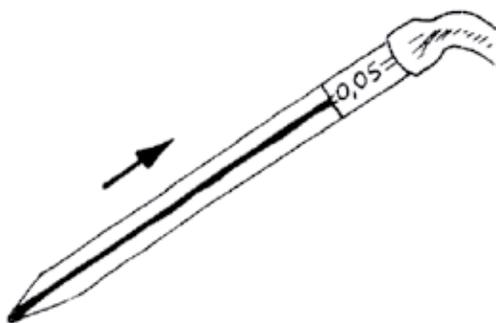


MÉTODO

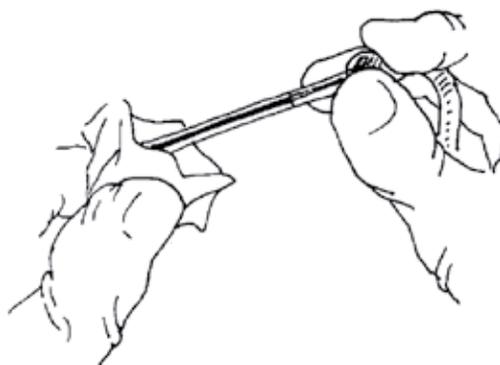
1. Trasladar 0,95 mL del líquido para dilución de leucocitos en un frasco pequeño con la pipeta de 1 mL.



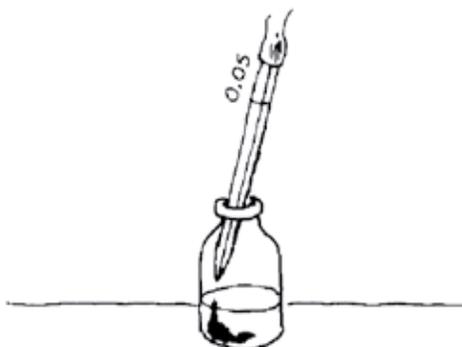
2. Con la pipeta para sangre aspirar sangre venosa o capilar hasta la marca de 0,05 mL. Si la sangre es venosa asegurarse que se mezcle completamente invirtiendo el frasco que contiene la sangre y el anticoagulante varias veces durante un minuto, luego aspirar con la pipeta.



3. Limpiar el exterior de la pipeta que contiene la sangre, con papel absorbente. Asegurarse que la sangre continúe en el mismo nivel.

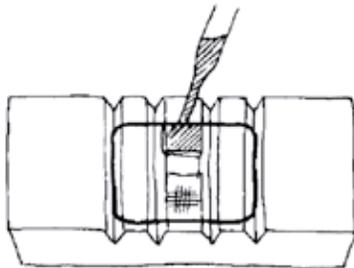
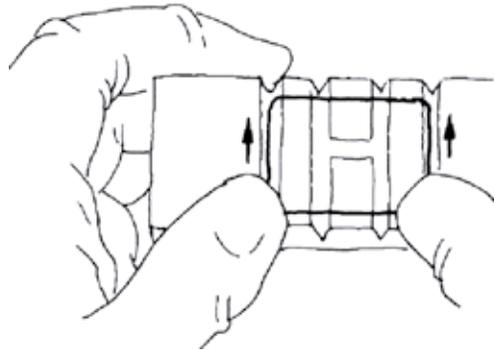


4. Depositar la sangre en el frasco que contiene el líquido para dilución. La dilución de esta sangre será de 1 x 20.



5. Enjuagar la pipeta aspirando y expulsando este líquido 3 veces en el mismo frasco.
6. Rotular el frasco con el nombre o código del paciente.

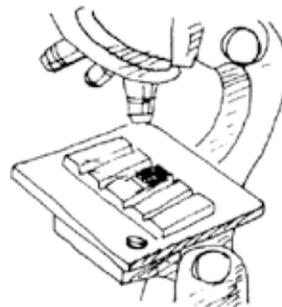
7. Montar la laminilla de vidrio en la cámara para recuento, presionándola cuidadosamente para colocarla en su sitio. Si se ha montado adecuadamente, entre las dos superficies de vidrio se observan unas bandas de color, llamadas "anillos de Newton".



8. Con una pipeta pasteur llenar la cámara de recuento, sólo el área cuadrículada.

9. Si el líquido se derrama en el canal que se encuentra entre las dos cámaras, la operación se debe repetir: retirar y limpiar la laminilla de vidrio; limpiar también la cámara para recuento y llenarla con otra gota.
10. Dejar reposar la cámara por 3 minutos, para que las células se asienten.

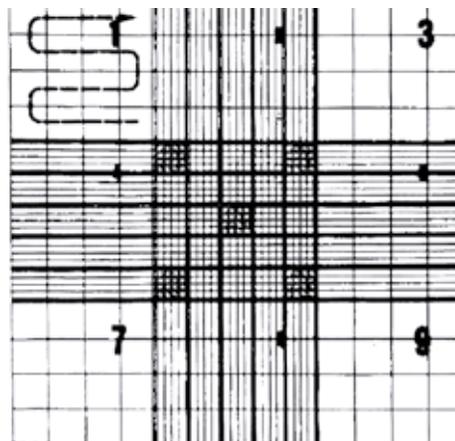
11. Colocar la cámara en la platina del microscopio. Con el objetivo de 10x enfocar el área cuadrículada de la cámara y con el objetivo de 40x contar los leucocitos.



MÉTODO DE RECUENTO

a. Uso de la cámara de Neubauer

- Área de la cámara: 9 mm².
- Profundidad de la cámara: 0,1 mm.



Contar los leucocitos en un área de 4 mm² utilizando los cuadros numerados 1, 3, 7 y 9, se debe incluir en el recuento los leucocitos que se observan sobre las líneas de cada cuadro revisado.

b. Cálculo del número de leucocitos en un mm³ de sangre

1. Usar la siguiente fórmula:

$$\text{Leucocitos} / \text{mm}^3 = \frac{\text{leucocitos contados} \times 10 \times 20}{4}$$

$$\text{Leucocitos} / \text{mm}^3 = \text{leucocitos contados} \times 50$$

2. Notificar el resultado como el número de leucocitos que hay en 1 mm³ de sangre sin diluir.

Ejemplo:

En los cuatro cuadros se cuentan 188 células.

$$\text{Leucocitos por mm}^3 = 188 \times 50$$

Resultado que se notifica: 9 400 leucocitos/mm³ de sangre.

VALORES NORMALES DE LEUCOCITOS POR GRUPO DE EDAD

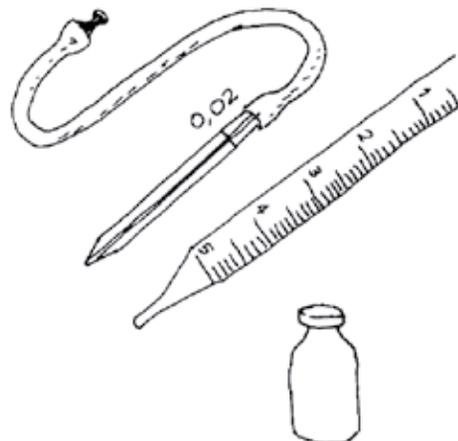
Grupos de edad	Leucocitos/mm ³
Hombres y mujeres	4 000 - 10 000
Niños de 10 años	4 000 - 10 000
Niños de 3 años	4 000 - 11 000
Niños 3 - 9 meses	4 000 - 11 000
Recién nacidos	10 000 - 12 000

**RECuento DEL NÚMERO DE ERITROCITOS O GLÓBULOS ROJOS****PRINCIPIOS GENERALES**

- ◆ **El recuento del número de eritrocitos o glóbulos rojos se expresa por mm³ (milímetro cúbico).**
- ◆ La sangre se deposita en un líquido para diluir eritrocitos.
- ◆ Luego, se cuentan los eritrocitos en una cámara de recuento, por medio del microscopio, y se calcula el número que existe por mm³ de sangre.
- ◆ Es importante conocer el número de eritrocitos o glóbulos rojos. Se halla **concentraciones bajas:** en pacientes con anemia causada por pérdida de eritrocitos o hemólisis. Y **concentraciones elevadas:** en pacientes con deshidratación o con policitemia, etc.

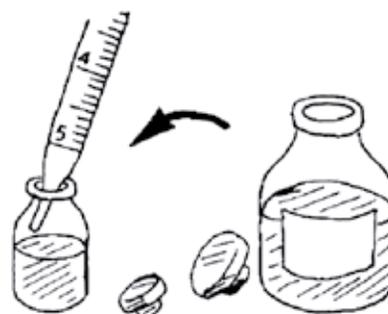
MATERIALES

- Una pipeta para sangre, hasta 0,02 mL (20 mm^3 o $20 \mu\text{m}$) con tubo de goma y boquilla.
- Una pipeta de 5 mL, graduada.
- Una cámara de recuento de Neubauer.
- Líquido para dilución: solución de citrato y formaldehído (ver Anexos).
- Un contador manual, para recuento.

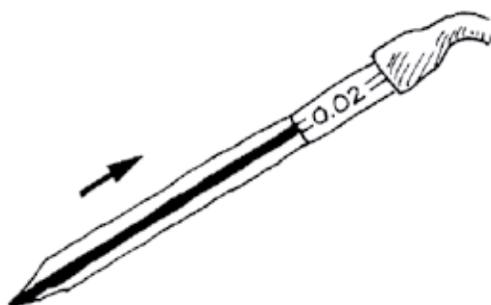


MÉTODO

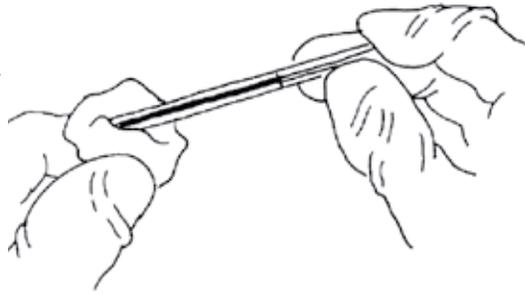
1. Trasladar 4,0 mL del líquido para dilución de eritrocitos en un frasco pequeño con la pipeta de 5 mL.



2. Con la pipeta para sangre aspirar sangre venosa o capilar hasta la marca de 0,02 mL. Si la sangre es venosa asegurarse que se mezcle completamente invirtiendo el frasco que contiene la sangre y el anticoagulante varias veces durante un minuto, luego aspirar con la pipeta.



3. Limpiar el exterior de la pipeta que contiene la sangre, con papel absorbente. Asegurarse que la sangre continúe en el mismo nivel.

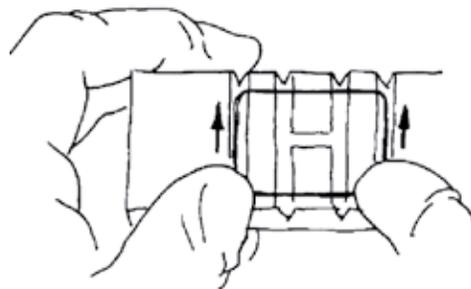


4. Depositar la sangre en el frasco que contiene el líquido para dilución. La dilución de esta sangre será de 1 x 200.

5. Enjuagar la pipeta aspirando y expulsando este líquido tres veces en el mismo frasco.

6. Rotular el frasco con el nombre o código del paciente.

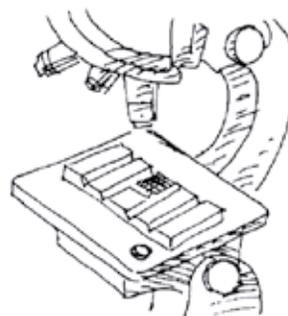
7. Montar la laminilla de vidrio en la cámara para recuento, presionándola cuidadosamente para colocarla en su sitio. Si se ha montado adecuadamente, entre las dos superficies de vidrio se observan unas bandas de color, llamadas anillos de Newton.





8. Con una pipeta Pasteur llenar solo el área cuadrículada de la cámara de recuento.
9. Si el líquido se derrama en el canal que se encuentra entre las dos cámaras, la operación se debe repetir: retirar y limpiar la laminilla de vidrio; limpiar también la cámara para recuento y llenarla con otra gota.
10. Dejar reposar la cámara por 3 minutos, para que las células se asienten.

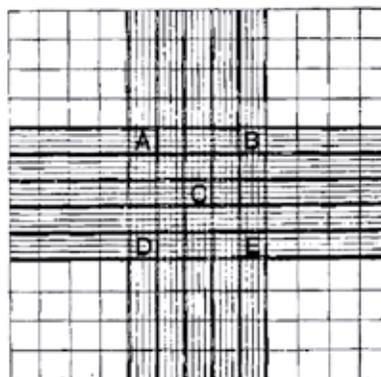
11. Colocar la cámara en la platina del microscopio. Con el objetivo de 10x enfocar el área cuadrículada de la cámara y enseguida cambiar al objetivo 40x para contar los eritrocitos.



PROCEDIMIENTO DE RECUENTO

a. *Uso de la cámara de Neubauer*

- Área de la cámara: 9mm^2 .
 - Profundidad de la cámara: $0,1\text{ mm}$.
- i. Contar los eritrocitos en un área de $0,2\text{ mm}^2$ utilizando los cuadros A, B, C, D y E, se debe incluir en el recuento las células que se observan sobre las líneas de cada cuadro revisado.



b. Cálculo del número de eritrocitos

1. Cálculo de eritrocitos por mm^3 :

$$\text{Eritrocitos} / \text{mm}^3 = \text{células contadas} \times 200 \times 50$$

$$\text{Eritrocitos} / \text{mm}^3 = \text{células contadas} \times 10\,000$$

2. Notificar el resultado como el número de eritrocitos que hay por milímetro cúbico de sangre sin diluir.

Ejemplo:

En los primeros cinco cuadros se cuentan 390 células.

Células por milímetro cúbico: **390 x 10 000.**

Resultado que se notifica: **3,9 millones de eritrocitos/ mm^3 .**

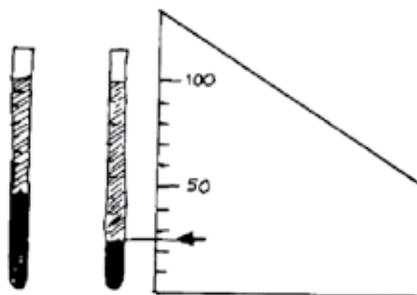
VALORES NORMALES DE ERITROCITOS POR GRUPO DE EDAD HEMATOCRITO

Grupos de edad	Millones de eritrocitos/ mm^3
Mujeres	4,0- 5,0
Hombres	4,5 - 5,5
Niños de 4 años	4,2- 5,2
Niños de 1 a 6 meses	3,8 - 5,2
Recién nacidos	5,0 - 6,0

HEMATOCRITO

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Se llama **hematocrito** (Hcto) al volumen total que ocupan los eritrocitos, dividido entre el volumen de sangre.
- ◆ **Ejemplo:** si el volumen de los eritrocitos en litro (1 000 mL) de sangre es de 450 mL, el hematocrito será: $450 \text{ mL} / 1\ 000 \text{ mL}$. Este resultado se notifica como un porcentaje de 45%.
- ◆ Se tiene el método de **microescala**, la sangre se deposita en un tubo capilar largo y se centrifuga empleando un "cabezal para microhematocrito". Luego se mide el nivel de la columna de eritrocitos por medio de una escala especial. **Es el método más rápido y se emplea sangre extraída de un dedo.**



MÉTODO DE MICROESCALA

MATERIALES

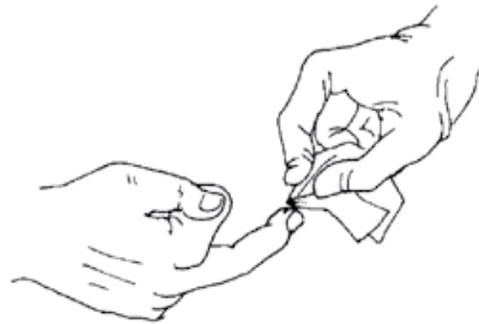
- Una centrífuga para "microhematocrito".
- Una escala para medir los resultados.



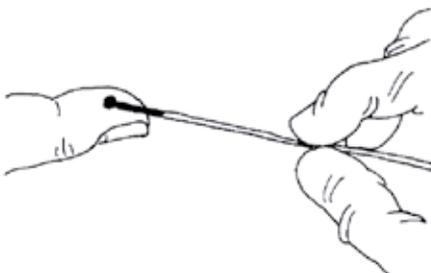
- Tubos capilares con heparina (heparina seca como anticoagulante) de 75 mm de longitud y 1,5 mm de diámetro interior. Si la sangre venosa está mezclada con bipotásica de EDTA no será necesario que los tubos contengan heparina.
- Cera blanda o arcilla.
- Lanceta para extracción de sangre capilar.

PROCEDIMIENTO

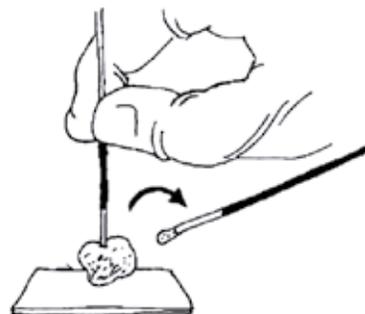
1. Obtener sangre capilar. La sangre deberá salir libremente o después de exprimir muy suavemente el área.



2. Recoger la primera gota de sangre con un filtro de papel.

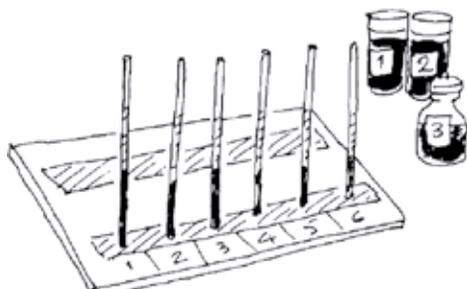


3. Aplicar el extremo delgado (marcado con un círculo rojo) del tubo capilar con heparina sobre la gota de sangre. La sangre ingresará en el tubo por capilaridad. Llenar los 3/4 del tubo.



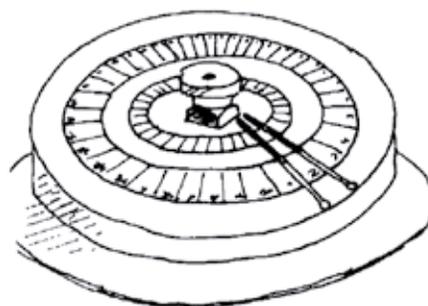
4. Taponar el extremo contrario del tubo, que no ha estado en contacto con la sangre, con la cera blanda o arcilla. Asegurarse que el taponamiento sea hermético y que la cera llegue a unos 2 mm de profundidad dentro del tubo.

Si no tiene cera o arcilla, cerrar el extremo del tubo calentándolo cuidadosamente sobre la llama de una lámpara de alcohol. Dejar enfriar en posición horizontal.



5. Disponer de una gradilla numerada en que haya colocado arcilla. Así el tubo de cada paciente se puede fijar en posición vertical junto al número que le corresponde.

6. Colocar los tubos en las ranuras del cabezal de la centrifuga, el extremo del tubo que se ha taponado con cera deberá apuntar hacia fuera, lejos del centro. Verificar que el número de la ranura corresponda al número de la muestra.

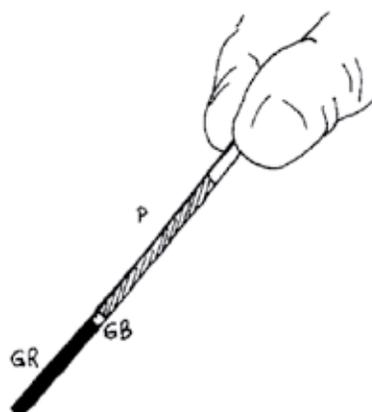


7. Centrifugar a alta velocidad.

8. Al finalizar la centrifugación cada uno de los tubos tendrá en su interior tres capas:

- **En la parte superior**, una columna de plasma (P).
- **A la mitad**, una capa delgada de glóbulos blancos (GB).
- **En la parte inferior y hasta el fondo**, una columna de glóbulos rojos (GR).

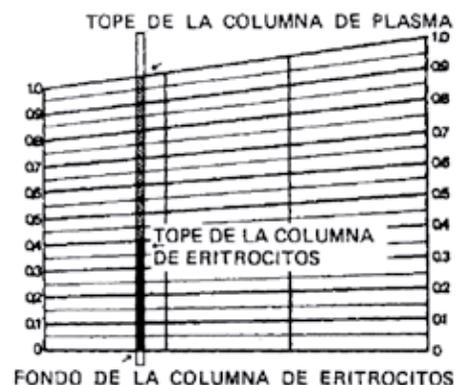
Se deberá trabajar al nivel del tope de la columna de glóbulos rojos.



a. Uso de la escala

1. Sostener el tubo frente a la escala de manera que el fondo de la columna de los glóbulos rojos quede exactamente al mismo nivel que la línea horizontal correspondiente al 0.
2. Desplazar el tubo a través de la escala hasta que la línea marcada con el número 1,0 quede al nivel del tope de la columna de plasma. Vigilar que el fondo de la columna de los glóbulos rojos continúe sobre la línea 0; también asegurarse que el tubo se encuentre en posición completamente vertical.
3. Leer la línea que pase al nivel del tope de la columna de glóbulos rojos, que indicará el hematocrito de éstos: En la figura es 0,4 que se notifica como porcentaje igual a 40% (ver figura).

Las líneas finas no remarcadas de la escala corresponden a intervalos de 0,05.



b. Cálculo del hematocrito sin usar escala

1. Medir en mm la longitud de toda la columna, desde el tope del plasma hasta la base de la columna.
2. Medir en mm la longitud de la columna de eritrocitos.
3. Usar la siguiente fórmula:

$$Hcto = \frac{\text{Longitud de la columna de eritrocitos}}{\text{Longitud de toda la columna}}$$

4. Multiplicar el resultado por 100 para expresarlo en porcentaje.

VALORES NORMALES DE HEMATOCRITO POR GRUPOS DE EDAD

Grupos de edad	Hematocrito
Hombres	40 - 50%
Mujeres	37 - 42%
Niños de 5 años	38 - 44%
Lactantes 3 meses	35 - 40%
Recién nacidos	50 - 58%



HEMOGLOBINA: CÁLCULO DE LA CIANOMETAHEMOGLOBINA

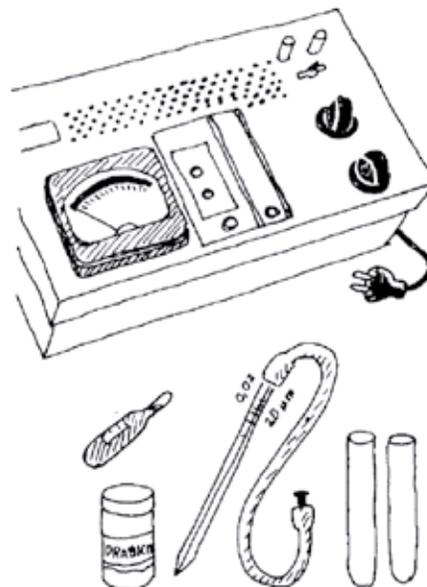
MÉTODO FOTOMÉTRICO

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ **La hemoglobina (Hb)** es el pigmento rojo que se encuentra en los eritrocitos. Se compone de hierro. Transporta oxígeno a las células de los tejidos del organismo.
- ◆ **Su valor se expresa en gramos/100 mL.**
- ◆ La sangre se diluye en líquido de Drabkin, que destruye los eritrocitos y convierte la hemoglobina en cianometahemoglobina. Este resultado se examina por medio de un espectrofotómetro o un colorímetro. Su grado de absorbancia es proporcional a la cantidad de hemoglobina que contenga la sangre.
- ◆ **El método fotométrico de la cianometahemoglobina permite hacer cálculos más precisos** de la cantidad de hemoglobina existente.

MATERIALES

- Un espectrofotómetro o colorímetro fotoeléctrico calibrado.
- Una pipeta para sangre (pipeta de Sahli) de 0,02 mL (20 mm 3 o 20 μ m) con tubo de goma y boquilla.
- Una pipeta graduada de 5 mL.
- Tubos de ensayo.
- Líquido de Drabkin para dilución (Ver Anexos).
- Solución estandarizada para cianometahemoglobina.



CALIBRACIÓN DEL COLORÍMETRO

1. Elaborar una curva de calibración, antes de usar el colorímetro.
2. Ajustar la concentración de la solución de referencia a la dilución utilizada en este método (250 es el factor de dilución cuando, 0,02 mL de sangre se diluyen con 5 mL del líquido de Drabkin). Por lo que se aplicará la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de la solución de referencia ajustada mg/100 mL} \times 2,5 = \text{Concentración g / 1 000 mL}$$

Ejemplo

Concentración de la solución de referencia = 60 mg / 100 mL
 Entonces el valor de la **concentración ajustada en g / 1 000 mL, será:**
 $60 \times 2,5 = 150 \text{ g / 1000 mL}$
 Convertido en gramos / 100 mL = 15,0g / 100 mL

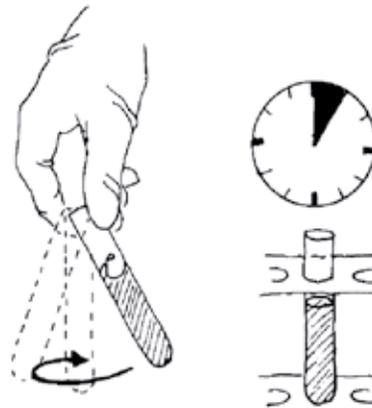
3. Preparar diluciones sucesivas de la solución estandarizada en cuatro tubos, numerarlos del 1 al 4.



En cada tubo depositar lo siguiente:

	Tubo			
	1	2	3	4
Solución estandarizada	4,0 mL	2,0mL	1,3mL	1,0 mL
Líquido de Drahkin	-	2,0mL	2,7mL	3,0 mL
Dilución de la solución estandarizada	Sin diluir	1x2	1x3	1x4

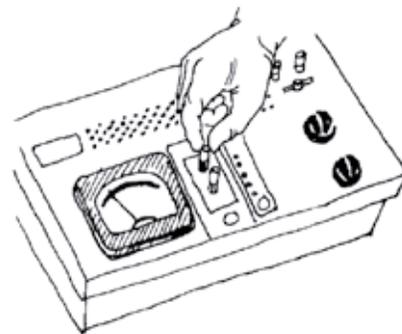
4. Mezclar cada tubo y dejar reposar 5 minutos.



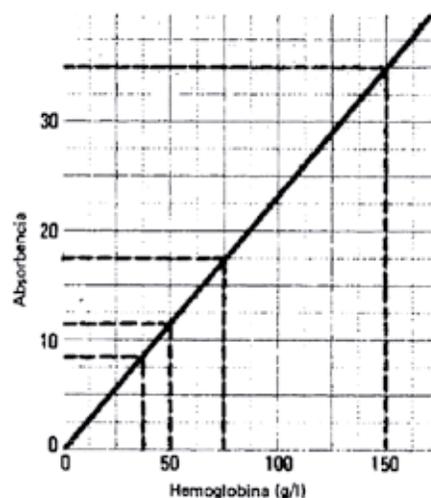
5. Leer las diluciones en el colorímetro:

- Colocar en el colorímetro un filtro verde o poner la longitud de onda en 540 nanómetros (nm).
- Llenar un tubo de ensayo al mismo nivel con líquido de Drabkin y colocarlo en el aparato.
- Poner la aguja del colorímetro en cero.

- Leer en el tablero el contenido de los tubos 1, 2, 3 y 4 usando un tubo de ensayo.



6. Preparar un gráfico trazando las líneas de las soluciones estandarizadas diluidas perpendicularmente a la de sus concentraciones. Se dio como ejemplo la concentración de la solución de referencia calculada en 15 g/100 mL, se tiene entonces:



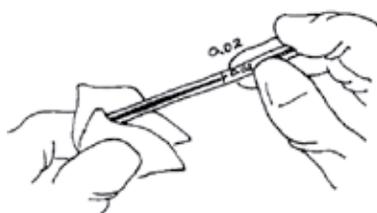
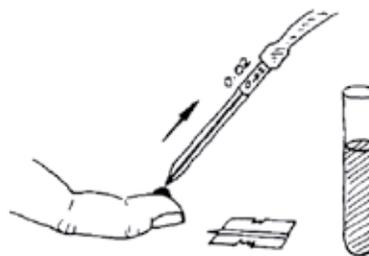
Solución estandarizada	Concentración de hemoglobina(g/100 mL)	Absorbancia
Sin diluir	15	35,0
1x2	$15/2=7,5$	17,5
1x3	$15/3=5$	11,5
1x4	$15/4=3,75$	8,5



MÉTODO FOTOMÉTRICO DE LA CIANOMETAHEMOGLOBINA

1. Depositar 5 mL de líquido de Drabkin con una pipeta para dilución en un tubo de ensayo.

2. Aspirar sangre venosa o capilar hasta la marca de 0,02 mL de una pipeta de sangre. Si se usa sangre venosa asegurarse que se mezcle adecuadamente con el anticoagulante.

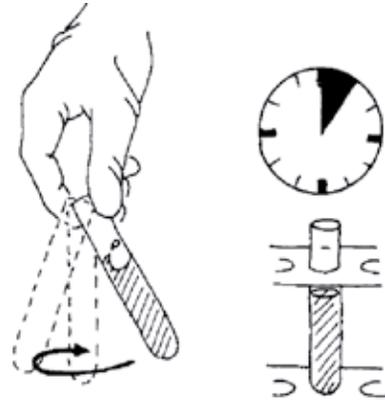


3. Limpiar el exterior de la pipeta y verificar que la sangre continúe en el mismo nivel.

4. Depositar la sangre en el líquido de Drabkin y enjuagar la pipeta varias veces aspirando y expulsando varias veces el líquido en el mismo tubo.



- Mezclar el contenido del tubo y dejarlo reposar por 5 a 10 minutos para que se produzca la hemólisis.



- Poner el colorímetro en cero con líquido de Drabkin. Leer en el tablero del colorímetro la absorbancia de la sangre diluida del paciente usando el tubo de ensayo.

- Anotar la cantidad de gramos/100 mL de hemoglobina en el cuadro preparado con la curva de calibración.
- Si se forma turbidez en la sangre diluida, centrifugar el líquido antes de hacer la lectura en el tablero del colorímetro.

VALORES NORMALES DE HEMOGLOBINA

Grupos de edad	Hemoglobina (gramos/100 mL)
Niños al nacer	13,6 - 19,6
Niños de 1 de nacer	11,3 - 13,0
Niños de 10 - 12 años	11,5 - 14,8
Mujeres no embarazadas	11,5 - 14,5
Hombres adultos	13,0 - 16,0

- ◆ **En poblaciones de altura, la hemoglobina se incrementa** debido a la hipoxia, por tal razón **debe corregirse**.
- ◆ De acuerdo con la altitud, sumar el factor de corrección que se muestra en la tabla siguiente.



$$Hb_0 + \text{Factor de corrección}$$

Ejemplo:

Hbo = 11 g/100 mL
 Altitud = 2000 metros sobre el nivel del mar.

De acuerdo con la tabla.

$$11 + 0,8 = 11,8 \text{ g/100 mL}$$

**INCREMENTO DE HEMOGLOBINA Y HEMATOCRITO
 SEGÚN ALTITUD**

Altitud	Factor de corrección hemoglobina (g/100 mL)	Factor de corrección hematocrito(%)
Menor a 1 000	0	0
1 000	0,2	0,5
1 500	0,5	1,5
2 000	0,8	2,5
2 500	1,3	4,0
3 000	1,9	6,0
3 500	2,7	8,5
4 000	3,5	11,0
4 500	4,5	14,0

TIEMPO DE SANGRÍA

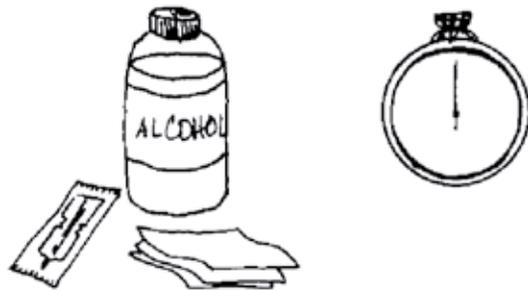
MÉTODO DE DUKE

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Con una lanceta hacer un corte pequeño en el lóbulo de la oreja. La sangre sale por este corte y se mide el tiempo que transcurre hasta que se detiene el sangrado. El corte no debe ser hecho sobre venas visibles, ni en lesiones de piel.
- ◆ Este examen se usa para los siguientes casos:
 - Para diagnosticar enfermedades hemorrágicas.
 - Antes de realizar operaciones quirúrgicas.
 - Antes de realizar una punción en el hígado o el bazo.

MATERIALES

- Una lanceta estéril.
- Alcohol al 70%.
- Filtro de papel o papel secante.
- Un reloj con segundero o un cronómetro.



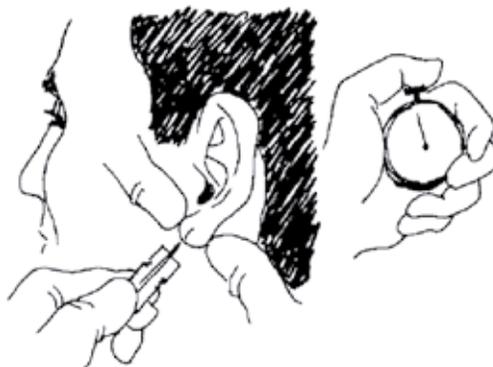
MÉTODO

- I. Limpiar con suavidad el lóbulo de la oreja utilizando una pieza de algodón con alcohol al 70%. No frotar. Dejar secar.

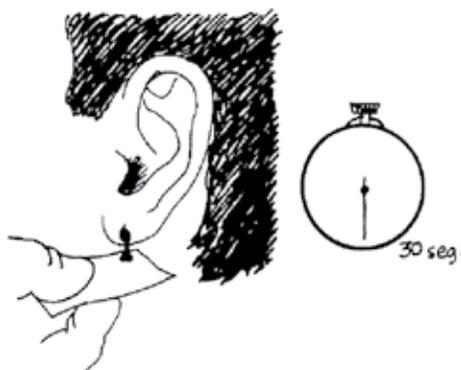




2. Hacer un pequeño corte de 3 mm de profundidad con la lanceta, en el borde inferior del lóbulo de la oreja. **A la vez, poner a funcionar su reloj con segundero o cronómetro.**

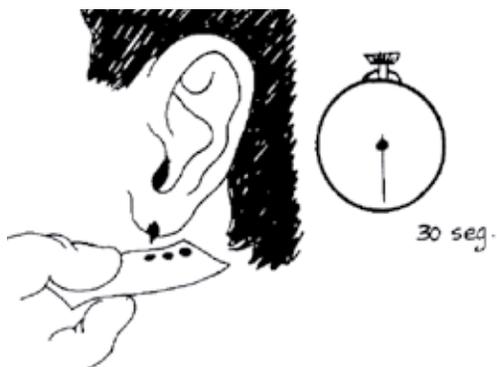
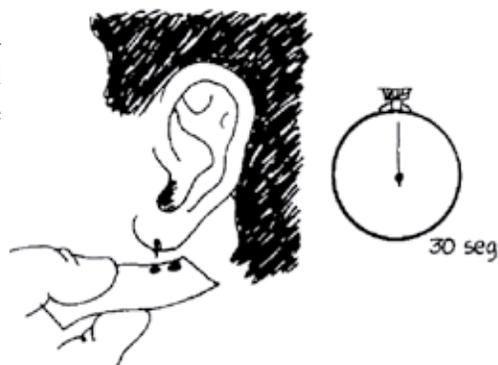


3. Dejar que la sangre salga libremente. No exprimir el lóbulo de la oreja.



4. **Recoger la primera gota** en una esquina del papel del filtro o papel secante. No tocar la piel con el papel.

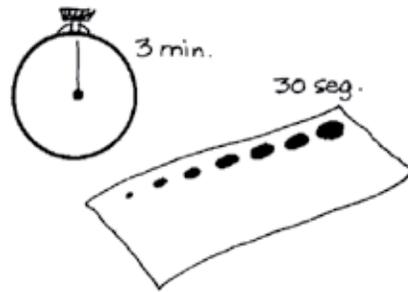
5. Esperar 30 segundos y recoger la segunda gota de sangre en el papel secante, pero un poco más adelante de la primera gota.



6. Recoger las siguientes gotas de sangre una cada 30 segundos. Las gotas serán cada vez más pequeñas. **Cuando las gotas dejen de salir y el papel secante ya no absorba sangre, detener el funcionamiento del reloj o del cronómetro.**

7. Anotar el tiempo transcurrido, según el reloj o el cronómetro.

Otro método consiste en contar el número de gotas recogidas en el papel secante y multiplicarla por 30 segundos.



Ejemplo:

Si se han recogido siete gotas. El tiempo de sangrado es 7×30 segundos = 210 segundos, convertidos en minutos es $3 \frac{1}{2}$ minutos.

RESULTADOS

- ◆ El tiempo de sangría normal aplicando el método de Duke es de 1 - 5 minutos.
- ◆ Comunicar el resultado indicando el valor normal que corresponde al método usado (método de Duke).
- ◆ Si el tiempo se prolonga el paciente requiere un estudio de plaquetas.

TIEMPO DE COAGULACIÓN DE LA SANGRE COMPLETA

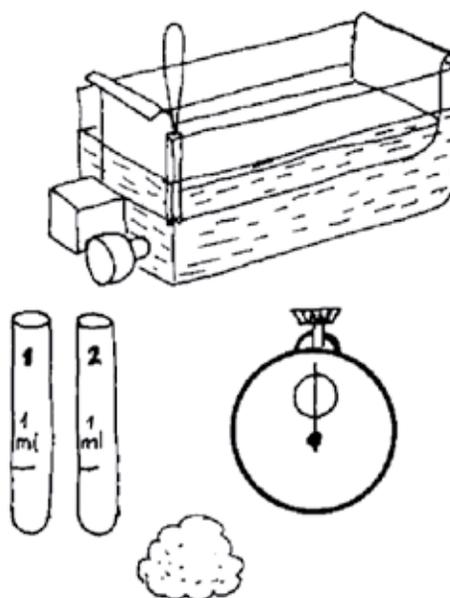
MÉTODO DE LEE Y WHITE

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Este examen es útil para evaluar la eficacia del mecanismo de coagulación.
- ◆ Su utilidad es limitada, pues **detecta deficiencias** graves de la coagulación y no detecta las deficiencias leves de la coagulación.
- ◆ Se requiere de sangre venosa en un tubo de ensayo. Se toma nota del tiempo que requiere la sangre para coagularse. El coágulo formado es una masa sólida de color sangre.

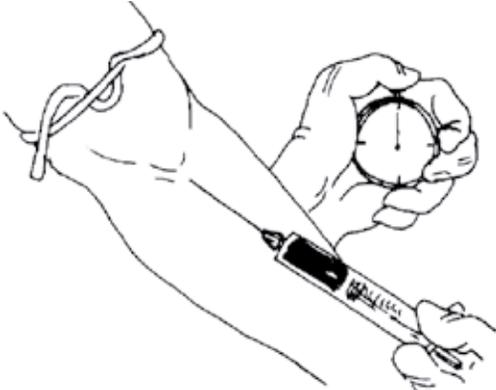
MATERIALES

- Dos tubos de ensayo de 75 x 10 mm marcados para el nivel de 1 ml.
- Un cronómetro.
- Un baño maría a 37 °C.
- Material para la obtención de sangre venosa.
- Algodón no absorbente.

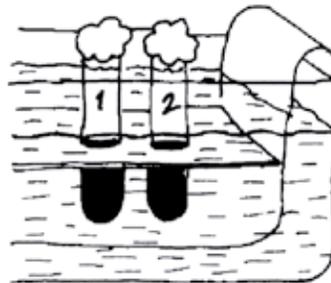


MÉTODO

1. Obtener sangre venosa por punción.

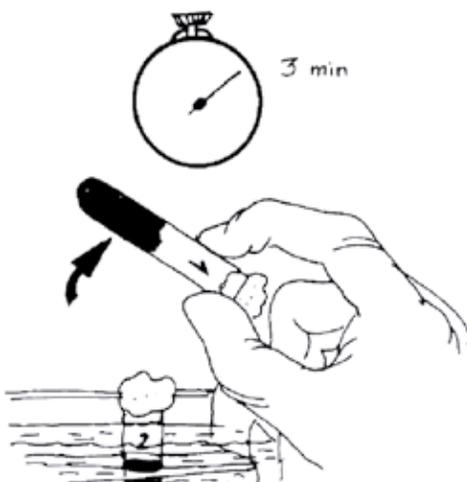


2. Poner a funcionar el cronómetro tan pronto como la sangre empiece a entrar en la jeringa. Extraer 2,5 ml.



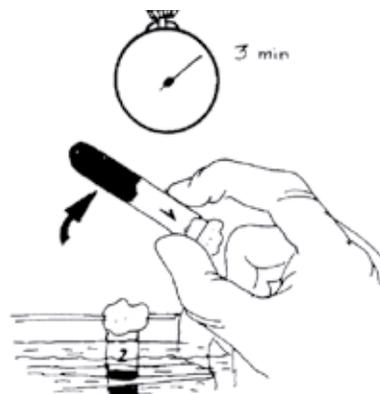
3. Llenar con esta sangre cada uno de los dos tubos de ensayo hasta la marca de 1 mL. Taponar ambos tubos con algodón no absorbente.

4. Colocar los tubos en baño maría a 37°C.



5. Después de 3 minutos sacar el primer tubo del baño maría. Inclinar el tubo hasta un plano de 45° para observar si la sangre se ha coagulado. Repetir el paso 5 para el segundo tubo.

6. Si la sangre no ha coagulado, colocar los tubos otra vez en el baño maría y **examinarlos cada 30 segundos** hasta que se observe la formación del coágulo. **La formación del coágulo** corresponde al momento en que resulta posible invertir cada tubo sin que se derrame su contenido.



¡ATENCIÓN!

- ◆ Al observar la formación del coágulo, detener el cronómetro y anotar separadamente el tiempo de coagulación requerido por cada tubo.

RESULTADOS

- ◆ El resultado definitivo del tiempo de coagulación es el promedio de los dos resultados.
- ◆ **Ejemplo**
 - El primer tubo necesitó 5 minutos, el segundo tubo necesitó 7 minutos.
 - El resultado final es el promedio de ambos resultados:
$$(5 + 7) / 2 = 6 \text{ minutos}$$
- ◆ Las cifras normales para el método de Lee y White son de 5 - 12 minutos.

TIPIFICACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS Y RH

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Los grupos sanguíneos se heredan según las leyes genéticas. Son cuatro tipos y reciben el nombre de sistema de grupos sanguíneos ABO.
- ◆ En toda transfusión sanguínea se deberá determinar con mucho cuidado los grupos sanguíneos de cada donador y cada receptor. El paciente solo recibirá sangre de su propio grupo.
- ◆ La tipificación de los grupos sanguíneos se realiza:
 - **Probando los glóbulos rojos** (para reconocer sus antígenos) con sueros clasificadores conocidos, anti A, anti B, y anti AB.
 - **Probando el suero** (para identificar sus anticuerpos) con glóbulos rojos de ensayo conocido, perteneciente a los grupos A, B y O.
- ◆ En los hospitales pequeños y en caso de urgencia, puede ser que el paciente deba recibir sangre de un grupo distinto al suyo, según las siguientes reglas:

El paciente que tenga:

- **Grupo sanguíneo A:** Deberá recibir sangre del grupo A; si no se dispone de ella, usar sangre del grupo O.
- **Grupo sanguíneo B:** Deberá recibir sangre del grupo B; si no se dispone de ella, usar sangre del grupo O.

- **Grupo sanguíneo AB:** Deberá recibir sangre del grupo AB; si no se dispone de ella, usar sangre del grupo A, del grupo B o del grupo O (**en este orden**).
- **Grupo sanguíneo O:** Sólo podrá recibir del grupo O.



Grupo	Antígeno del glóbulo rojo	Anticuerpo del suero
O	O	Anti A, anti B
A	A	Anti B
B	B	Anti A
AB	AB	Ninguno

CLASIFICACIÓN DE LOS GRUPOS A. B. Y O POR MEDIO DE ANTISUEROS

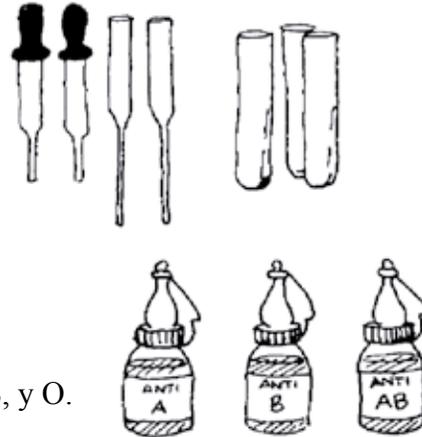
PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Los eritrocitos del paciente se enfrentan con tres antisueros: anti A, anti B y anti AB.
- ◆ Los antisueros se conservarán según las instrucciones del fabricante.
- ◆ No es conveniente usar un antisuero si se nota turbio, es probable que se encuentre contaminado por bacterias, no se deberá usar.
- ◆ El estudio se puede efectuar en un **portaobjetos**, o bien en un **tubo de ensayo** (especialmente en los casos dudosos).

MÉTODO DEL PORTAOBJETOS

MATERIALES

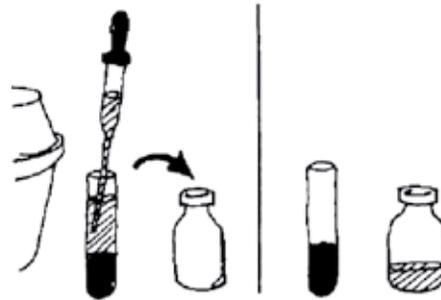
- Una pipeta gotera, calibrada para suministrar 20 gotas por mL.
- Pipetas Pasteur con perillas de goma (chupón).
- Una centrífuga.
- Solución de cloruro de sodio (ver Anexos).
- Tubos de ensayo de 50 x 11 mm, para el lavado de los eritrocitos.
- Eritrocitos testigos de los grupos A, B, y O.
- Antisueros: anti A, anti B y anti AB.
- Sangre capilar o venosa anticoagulada o coagulada.



PROCESAMIENTO DE LA SANGRE OBTENIDA

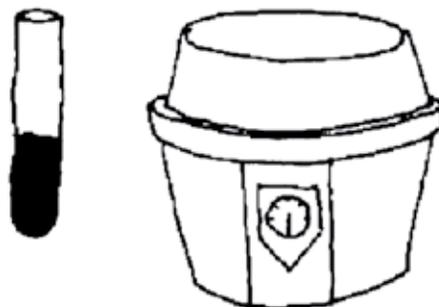
SANGRE VENOSA ANTICOAGULADA CON EDTA (ver Anexos)

1. Centrifugar la sangre por 5 minutos a 2500 RPM.
2. Aspirar el plasma con una pipeta Pasteur. Conservar este plasma para clasificar grupos sanguíneos por medio de eritrocitos estandarizados.

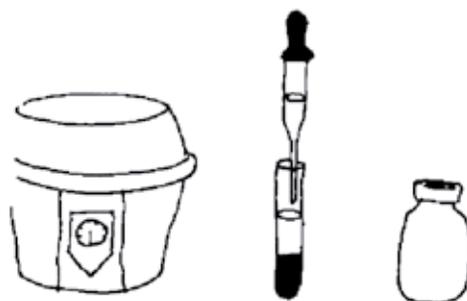


SANGRE VENOSA COAGULADA

1. Obtener 5 - 10 mL de sangre en un tubo de ensayo.
2. Dejar coagular y centrifugarla durante 5 minutos a 2 500 RPM.



3. Aspirar el suero con una pipeta Pasteur. Conservar el suero para hacer clasificaciones de grupos sanguíneos por medio de eritrocitos estandarizados.



SANGRE CAPILAR

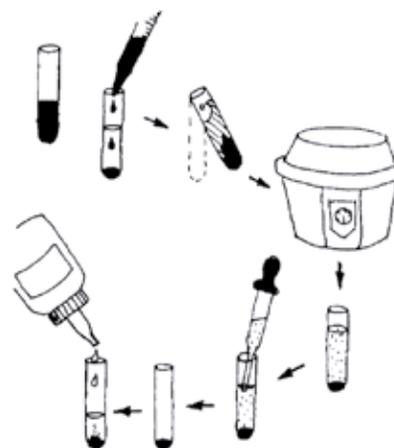
- ◆ Este método es útil en niños.

1. Depositar tres gotas de solución de citrato trisódico en concentración de 38 g/L (ver Anexos).
2. Colocar en el mismo tubo, inmediatamente diez gotas de sangre. Esta sangre no se coagulará.



LAVADO DEL SEDIMENTO DE ERITROCITOS: SUSPENSIÓN DE GLÓBULOS ROJOS AL 10%

1. Mezclar cinco gotas del sedimento de eritrocitos y 2 mL de solución de cloruro de sodio.
2. Centrifugar. Aspirar y eliminar el líquido sobrenadante.
3. Añadir nuevamente 2 mL de solución de cloruro de sodio.

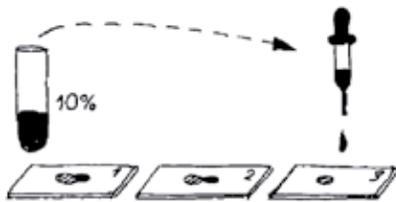
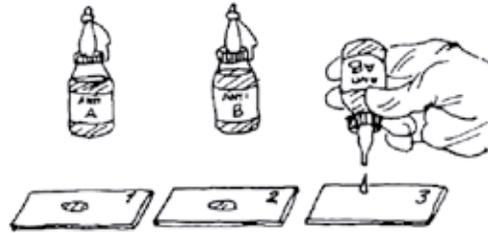


4. Agitar el tubo suavemente. De este modo se ha obtenido una suspensión de glóbulos rojos al 10%.

PROCEDIMIENTO

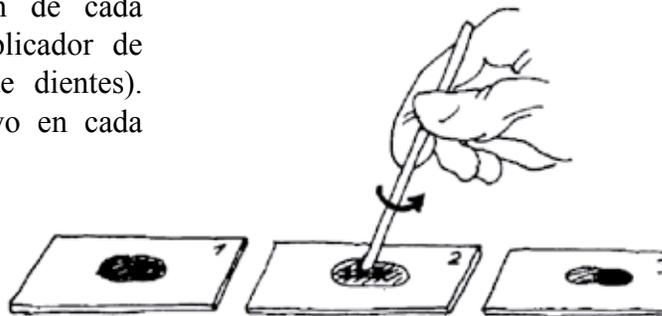
1. Preparar y numerar tres portaobjetos:

- Portaobjetos 1: Agregar una gota de anti A.
- Portaobjetos 2: Agregar una gota de anti B.
- Portaobjetos 3: Agregar una gota de anti AB.

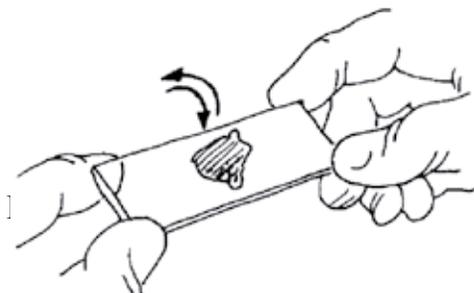


- ### 2. Agregar a cada portaobjetos una gota de la suspensión preparada de glóbulos rojos al 10%.

- ### 3. Mezclar la preparación de cada portaobjetos con un aplicador de madera (o un palito de dientes). Usar un aplicador nuevo en cada portaobjetos.



- ### 4. Hacer oscilar el portaobjetos hacia delante y hacia atrás para terminar de hacer la mezcla.

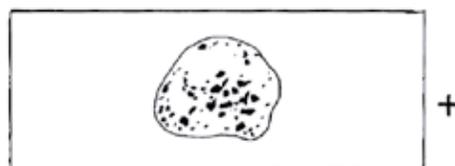


LECTURA

- ◆ La lectura se debe realizar antes de que transcurran 2 minutos, para evitar una falsa aglutinación.

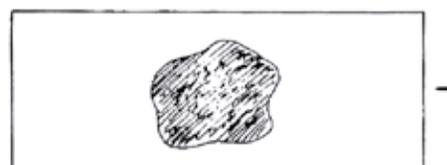
- **Aglutinación positiva (+)**

Se forman pequeños conglomerados de glóbulos rojos que flotan en un líquido claro. Esta aglutinación deberá ocurrir en menos de 2 minutos.



- **Reacción negativa (-)**

Los glóbulos rojos no se aglutinan.



RESULTADOS

- ◆ El resultado final se identifica haciendo la lectura de los tres portaobjetos.

Portaobjetos Anti A	Portaobjetos Anti B	Portaobjetos 3 Anti AB	Grupo sanguíneo del paciente
+	-	+	Grupo A
-	+	+	Grupo B
+	+	+	Grupo AB
-	-	-	Grupo O

MÉTODO DEL TUBO DE ENSAYO

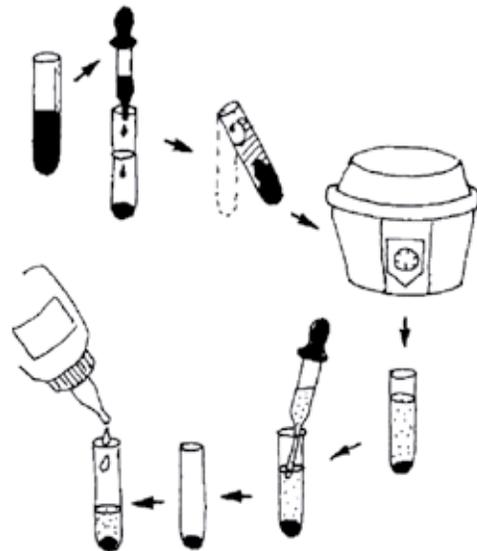
- ♦ Se emplea el método del tubo de ensayo en todos los casos dudosos de identificación del grupo sanguíneo, cuando se ha usado el método del portaobjetos.

MATERIALES

- Una pipeta gotera, calibrada para suministrar 20 gotas por mL.
- Pipetas Pasteur con perillas de goma (chupón).
- Una centrífuga.
- Solución de cloruro de sodio (ver Anexos).
- Tubos de ensayo de 50 x 11 mm, para el lavado de los eritrocitos.
- Eritrocitos testigos de los grupos A, B, y O.
- Antisueros: anti A, anti B y anti AB.
- Tubos de ensayo pequeños, con una gradilla.

LAVADO DEL SEDIMENTO DE ERITROCITOS: SUSPENSIÓN DE GLÓBULOS ROJOS AL 2%

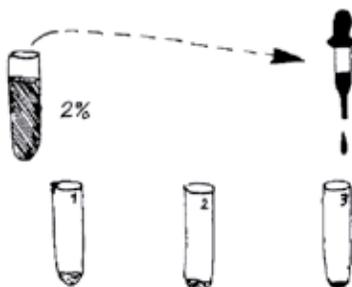
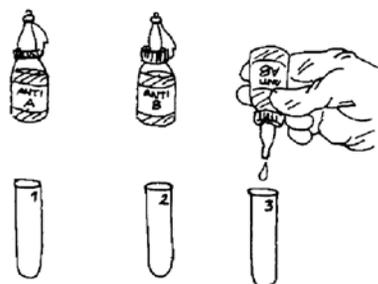
1. Mezclar dos gotas del sedimento de eritrocitos más 4 mL de la solución de cloruro de sodio.
2. Centrifugar. Aspirar y eliminar el líquido sobrenadante.
3. Agregar 4 mL de solución de cloruro de sodio.
4. Agitar el tubo suavemente. El resultado es una suspensión de eritrocitos al 2%.



PROCEDIMIENTO

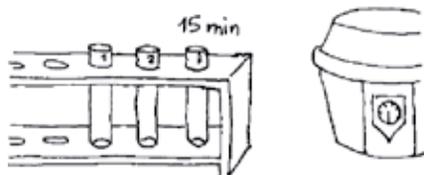
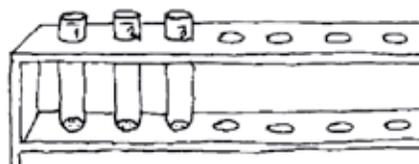
1. Preparar y numerar tres tubos de ensayo:

- Tubo 1: Agregar una gota de anti A.
- Tubo 2: Agregar una gota de anti B.
- Tubo 3: Agregar una gota de anti AB.



2. Agregar a cada tubo una gota de la suspensión de eritrocitos al 2% ya preparada.

3. Si no cuenta con una centrifuga, dejar reposar los tubos durante una hora a temperatura ambiente



4. Si se cuenta con una centrifuga, dejar reposar los tubos por 15 minutos a temperatura ambiente.

Luego centrifugar, por un minuto a baja velocidad.

LECTURA

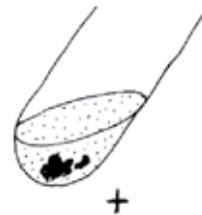
1. Sacudir ligeramente el fondo del tubo de ensayo y luego examinar el sedimento de glóbulos rojos.

2. Usar para la observación de los resultados el espejo cóncavo del microscopio



- **Aglutinación positiva (+)**

Los glóbulos rojos forman uno o más conglomerados y se observa un líquido sobrenadante claro.



- **Reacción negativa (-)**

Los glóbulos rojos vuelven a formar una suspensión fácilmente, sin aglutinación visible.



3. Se puede usar también, para la observación de los resultados, el microscopio

Si ocurre una **aglutinación débil** colocar una gota de suero de los eritrocitos y examinar con el microscopio, usando el objetivo 10x.



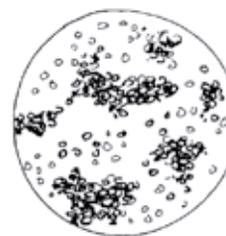
- **Aglutinación evidente**

Se observa grandes conglomerados de glóbulos rojos sobre un fondo claro.



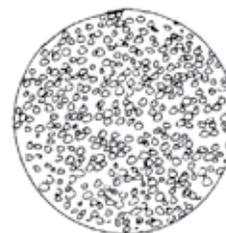
- **Aglutinación débil**

Se observan conglomerados pequeños de glóbulos rojos y algunos glóbulos rojos sueltos en el campo microscópico.

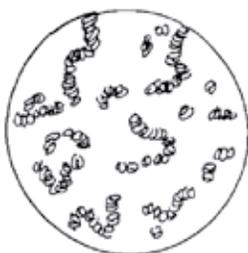


- **No ocurre aglutinación**

Todos los glóbulos rojos se encuentran sueltos.



4. Si los glóbulos rojos no aglutinan y forman "**columnas de moneda**", añadir dos gotas de solución de cloruro de sodio a la gota de la mezcla de glóbulos rojos que se encuentra en el portaobjetos. Examinar con el microscopio si existe **aglutinación positiva** los conglomerados de glóbulos blancos conservará su forma y si es negativa, la "columna de monedas" se dispersará.



CLASIFICACIÓN DEL GRUPO RHESUS (Rh)

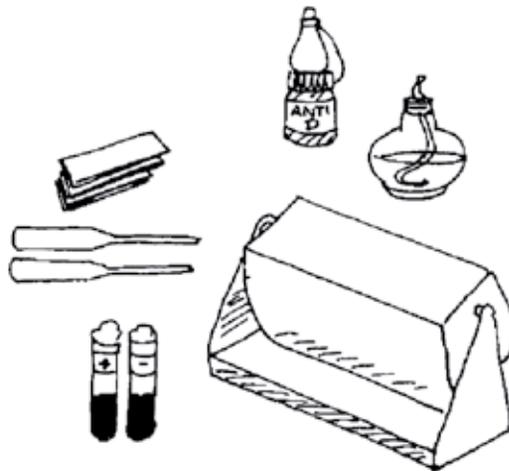
PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Para la determinación del grupo Rhesus (Rh), se hace una prueba que permite detectar el antígeno D, empleando el suero anti D.
- ◆ Se dice que los individuos son **Rh positivos**, cuando son portadores del antígeno D.
- ◆ Son **Rh negativos**, los individuos que carecen del antígeno D.

MÉTODO DEL PORTAOBJETOS

MATERIALES

- Un portaobjetos.
- Una pipeta Pasteur.
- Un calentador eléctrico o mechero de alcohol.
- Suero anti D (si es comercial, seguir las instrucciones que indique el fabricante).
- Muestra de sangre a examinar.
- Muestra testigo de sangre Rh positivo.
- Muestra testigo de sangre Rh negativo.



PROCESAMIENTO DE LA SANGRE OBTENIDA

- ◆ Preparar una suspensión de eritrocitos al 50% en su propio suero o plasma, de la siguiente manera:

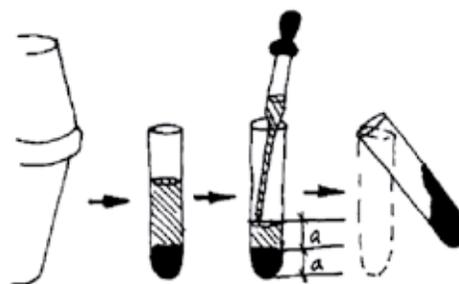


SANGRE CON ANTICOAGULANTE (EDTA)

1. Centrifugar 2,5 mL de sangre durante 5 minutos a alta velocidad.

2. Verificar que el volumen del sedimento de eritrocitos sea igual al volumen del plasma sobrenadante. Si el plasma es mayor aspirar el excedente con la pipeta hasta que ambos volúmenes sean iguales.

3. Mezclar el plasma y los eritrocitos con suavidad.



SANGRE COAGULADA

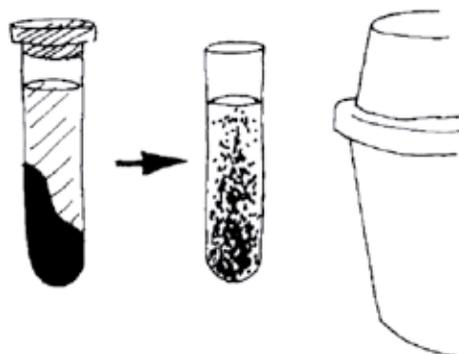
1. Romper el coágulo con una pipeta para dispersar los eritrocitos.

2. Trasladar una porción de eritrocitos sueltos, acompañados de suero, a un tubo de centrifugación.

3. Centrifugar por 5 minutos a alta velocidad.

4. Aspirar con una pipeta el exceso de suero hasta que el volumen de este y el de los eritrocitos sean iguales.

5. Mezclar el suero y los eritrocitos con suavidad.

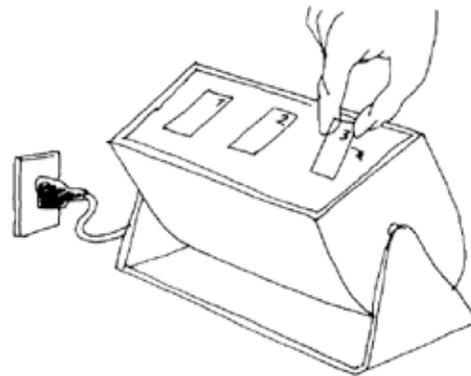


6. Verificar la presencia de eritrocitos sueltos, para lo cual se extiende una gota de la suspensión mezclada en un portaobjetos limpio y se examina con el microscopio a 10x.

Si contiene conglomerados de eritrocitos desechar esta suspensión y preparar otra, fresca.

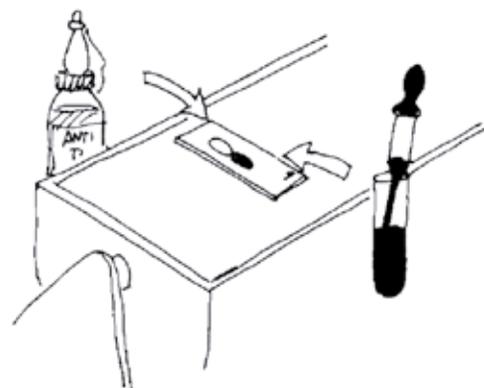
MÉTODO

1. Encender el calentador eléctrico, cuya temperatura deberá ser de 40 °C en la superficie. Colocar los portaobjetos numerados sobre el calentador y dejarlos por 5 minutos.



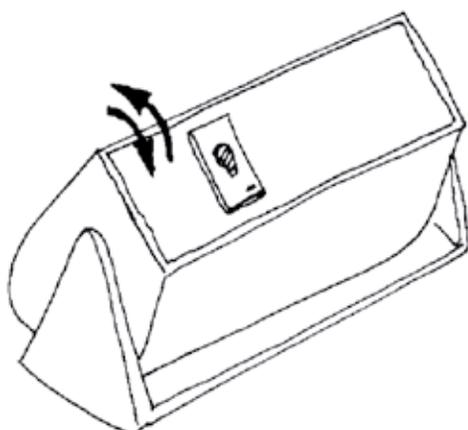
2. Si no se dispone de un calentador eléctrico calentar los portaobjetos sobre la llama de un mechero de alcohol antes de iniciar la prueba. Probar la temperatura sobre el dorso de la mano; el calor deberá ser soportable.

3. Depositar en el portaobjetos una gota de la mezcla de eritrocitos y del suero que se va a examinar más gota de suero anti D.





4. Mezclar empleando un aplicador, un palito de dientes o el extremo redondo de un tubo de ensayo pequeño.

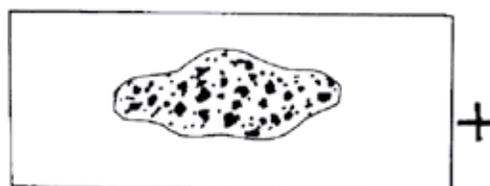


5. Continuar la mezcla haciendo oscilar el calentador hacia delante y hacia atrás.

RESULTADOS

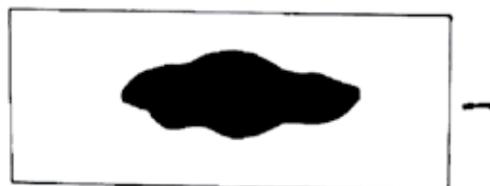
◆ Rh positivo

En el centro y la periferia de la mezcla se observa claramente un gran número de pequeñas **aglutinaciones** de eritrocitos. Estas aglutinaciones **se deberán formar en menos de 3 minutos**.



◆ Rh negativo

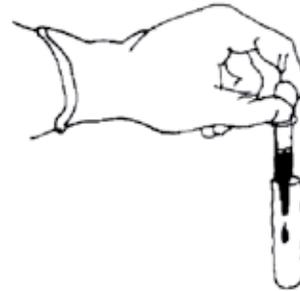
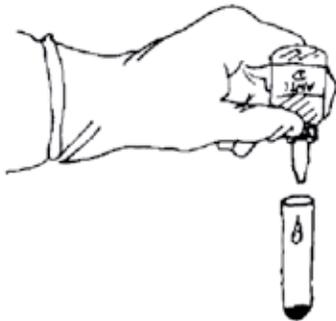
No se observa aglutinaciones



MÉTODO DEL TUBO DE ENSAYO

MÉTODO

1. Preparar una suspensión de eritrocitos al 2% en su propio suero o plasma. Ajustarlo para 2%.



2. Colocar en un tubo de ensayo 1 gota de la suspensión de eritrocitos al 2 % más una gota de suero anti D.

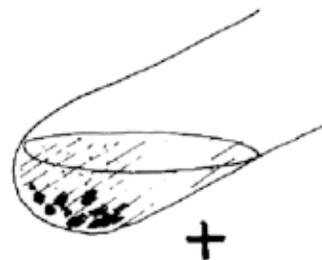
3. Colocar el tubo a 37 °C en un baño maría o una incubadora durante 60 minutos.

RESULTADOS

- ◆ Examinar el líquido que se encuentra en el fondo del tubo de ensayo, colocando el tubo en posición casi horizontal, sobre una superficie iluminada.

- Rh positivo

Se observa pequeñas aglutinaciones de eritrocitos en un líquido claro.



- **Rh negativo**

Los eritrocitos permanecen suspendidos y no se observan aglutinaciones.



 **¡ATENCIÓN!**

- ◆ **En caso de duda**, calentar un portaobjetos, aspirar una gota de sedimento de eritrocitos con una pipeta Pasteur y preparar un frotis. Examinarlo con el microscopio a 10x.
- ◆ Desechar el suero anti D contaminado, si está turbio y blanquecino.
- ◆ Frecuentemente se producen resultados falsos negativos porque los tubos se han tratado con movimientos bruscos
- ◆ Se debe leer las instrucciones que figuran en las etiquetas de los frascos para usar estos antisueros. Algunos sueros anti D se elaboran para usarlos únicamente con el método del tubo de ensayo o el método del portaobjetos.
- ◆ Es difícil identificar el grupo al que pertenece si la sangre ha permanecido más de 2 días en la refrigeradora.
- ◆ La sangre recogida en un recipiente con citrato de sodio solo se podrá determinar por el método del tubo de ensayo.

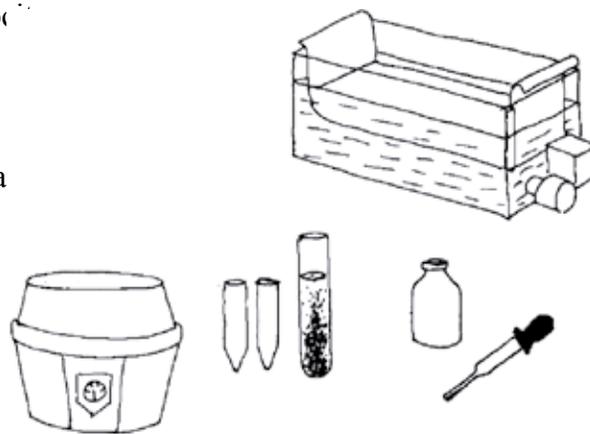
COMPATIBILIDAD SANGUÍNEA

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Esta prueba llamada también "**Prueba cruzada**". Consiste, en determinar si el suero del paciente contiene anticuerpos que aglutinen los eritrocitos del donador.

MATERIALES

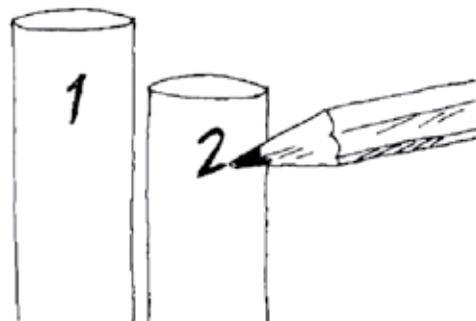
- Suero del paciente.
- Suspensión al 5% de eritrocitos.
- Lavados del donador.
- Albúmina bovina al 20%.
- Baño María o incubadora a 37 °C.
- Una centrífuga.
- Pipetas Pasteur.



MÉTODO

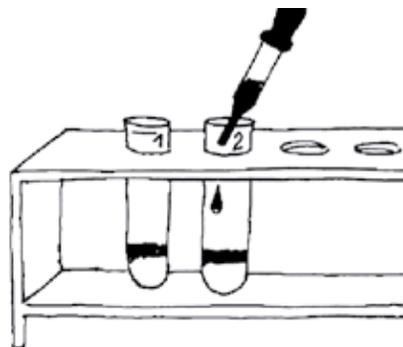
1. Preparar una suspensión al 5% de eritrocitos lavados del donador.

2. Numerar dos tubos de ensayo: tubo 1 y tubo 2.





3. Colocar en cada tubo numerado dos gotas de suero fresco del receptor y 2 gotas de la suspensión al 5% de eritrocitos lavados del donador.

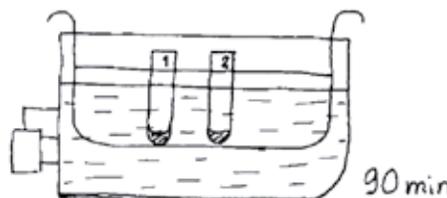


4. Mezclar los eritrocitos y el suero con suavidad, golpeando el fondo de cada tubo.



5. Colocar los tubos en un baño María o una incubadora a 37 °C durante 90 minutos.

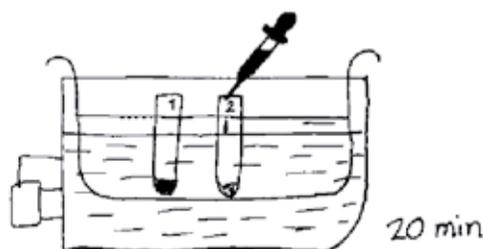
En caso de urgencia es probable que no se pueda incubar los tubos durante el tiempo necesario. **Si se cuenta con menos de 45 minutos, examinar el tubo 1:**



- Centrifugar el tubo 1 a baja velocidad.
- Examinar con el microscopio empleando el objetivo de 10x el sedimento de los eritrocitos.

Si no existe aglutinación se puede aceptar la sangre para el paciente, pero se debe escribir la siguiente nota en la etiqueta de la bolsa de sangre "**Sangre compatible según estudio urgente**".

6. Añadir dos gotas de albúmina bovina al 2% al tubo 2. No mezclar, incubar durante otros 20 - 30 minutos.



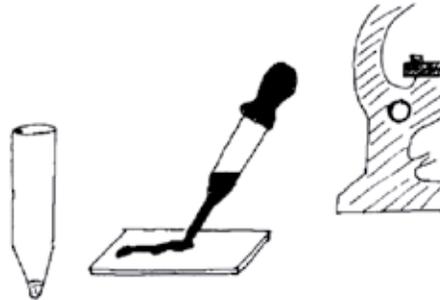
RESULTADOS

- ◆ Observar con el microscopio el sedimento de eritrocitos de cada tubo; para lo cual:

- Aspirar con una pipeta Pasteur el sedimento de eritrocitos. Evitar agitarlo demasiado.

- Extender el sedimento en portaobjetos limpios.

- Examinar con el microscopio empleando el objetivo 10x, para determinar si existe aglutinación.



- ◆ **Si no hay aglutinación:** La sangre es compatible y se puede administrar sin riesgos al paciente.
- ◆ **Si hay aglutinación:** La sangre es incompatible y no se debe administrar.

VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN DE LOS ERITROCITOS

PRINCIPIOS GENERALES



- ◆ La prueba de velocidad de sedimentación de los eritrocitos (VSE) se basa en el principio que en la sangre, a la que se ha añadido un anticoagulante, los eritrocitos (glóbulos rojos) sedimentan hasta formar una columna compacta en la parte inferior del tubo o recipiente que se mantiene en posición vertical.

- ◆ La velocidad de este proceso depende de varios factores, siendo los principales:
 - La concentración del fibrinógeno en el plasma.
 - La concentración de globulina alfa y beta en el plasma.
 - La diferencia entre la densidad del plasma y la masa de glóbulos.

- ◆ Se han descrito un gran número de métodos para su determinación. Estos métodos se diferencian por el anticoagulante empleado, las dimensiones del tubo, el volumen de sangre y el tiempo utilizado.

- ◆ Esta prueba es ampliamente utilizada en el diagnóstico y pronóstico de diversos estados patológicos como:
 - Lupus eritematoso.
 - Artritis reumatoide.
 - Espondilitis anquilosante, etc.

- ◆ La medición de VSE se deberá efectuar en menos de dos horas después de que se haya obtenido la sangre.

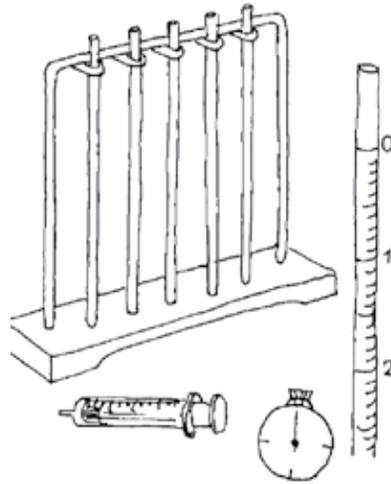
- ◆ La VSE aumenta con la temperatura, a partir de los 23 °C. En climas cálidos se debe vigilar que los tubos empleados para VSE no se coloquen en un lugar caluroso del laboratorio.

MÉTODOS

MÉTODO DE WESTERGREN

MATERIALES

- ◆ Un tubo de Westergren de 300 mm de longitud y 2,5 mm de diámetro interior. Graduado de 0 a 200 mm.
- ◆ Anticoagulante: citrato trisódico en proporción de 38g/L (3,8%).
- ◆ Una jeringa de 5 mL.
- ◆ Un cronómetro o reloj.

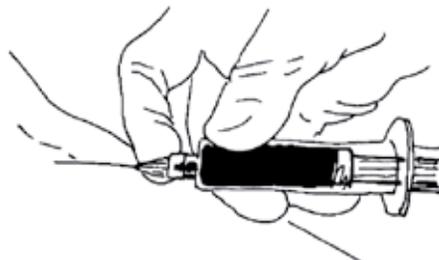


MÉTODO

1. Depositar en un tubo o frasco 0,4 mL de solución de citrato trisódico.

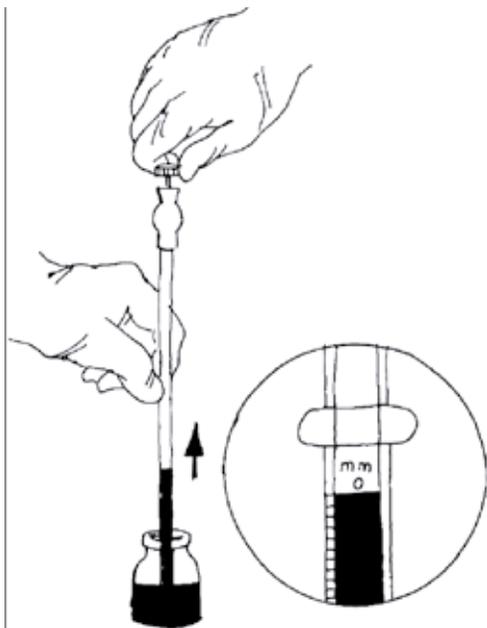


2. Extraer 2 mL de sangre venosa.





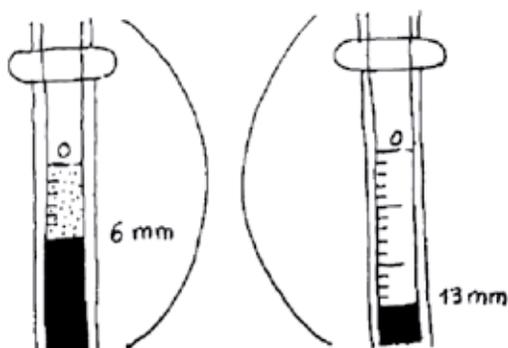
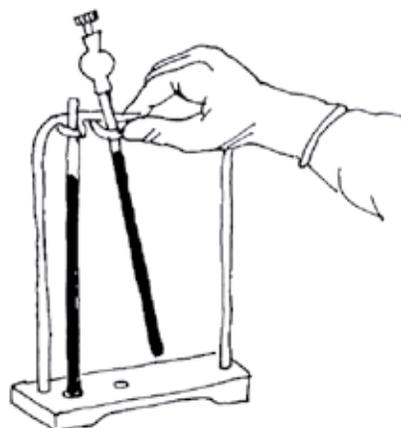
3. Depositar 1,6 mL de la sangre venosa en el frasco que contiene la solución de citrato trisódico.



4. Agitar con suavidad.
5. Aspirar la sangre del frasco, y depositarla en el tubo de Westergren hasta la línea 0.

Evitar la formación de burbujas en el interior del tubo.

6. Colocar el tubo en la gradilla de Westergren, en posición completamente vertical.



7. Esperar durante 1 hora exacta (usar su cronómetro o reloj) y a continuación, medir la altura de la columna del plasma según la graduación en mm (milímetros) del tubo a partir de la línea 0, del extremo superior.

RESULTADOS

- ◆ Se expresa en VSE...mm de altura.
- ◆ Los valores normales de Westergren son:

Sexo	Una hora	Dos horas
Hombre	3 - 5 mm	7 - 15 mm
Mujer	4 - 7 mm	12 - 17 mm

- ◆ **Ventajas del método**
Este método es el más sensible de la VSE para el estudio de enfermedades crónicas.
- ◆ **Desventajas del método**
Requiere mayor cantidad de sangre que otros métodos.

MÉTODO DE WINTROBE

MATERIALES

- Un tubo de hematocrito Wintrobe.
- Anticoagulante para 5 mL de sangre venosa.
- Una jeringa.
- Un cronómetro o reloj.

MÉTODO

1. **Preparar el anticoagulante;** mezclando 6 mg de oxalato de amonio más 4 mg de oxalato de potasio.
2. Colocar 1 mL de sangre venosa en un tubo o frasco conteniendo solo 2 mg del anticoagulante.



3. Mezclar bien por inversión suave.
4. Aspirar la sangre del tubo o frasco y depositarla en el tubo de Wintrobe. Evitar la formación de burbujas en el interior del tubo.
5. Colocar el tubo en la gradilla de Wintrobe, en posición completamente vertical.
6. Esperar durante una hora exacta (usar su cronómetro o reloj). A continuación, medir la altura de la columna del plasma según la graduación en milímetros (mm) del tubo a partir del extremo superior.

RESULTADOS

- ◆ Se expresan en VSE...mm de altura.

- ◆ **Los valores normales de Wintrobe son:**

Sexo	Límite	Promedio
Hombre	0-7 mm	4 mm
Mujer	0-15 mm	10 mm
Niños	1-15 mm	5 mm

- ◆ **Ventajas del método**

Es sencillo, requiere pequeña cantidad de sangre.

Con la misma preparación, una vez que se ha determinado la VSE, puede calcularse el valor del hematocrito y pueden hacerse frotis de la capa de células blancas.

- ◆ **Desventajas del método**

El exceso de mezcla de oxalato en el método de Wintrobe puede hacer que la lectura de VSE aparezca baja, debido a que el oxalato retarda la sedimentación.

ESPUTO

OBTENCIÓN DE ESPUTO	177	CULTIVO DE BK.....	191
Principios generales	177	Principios generales	191
RECIPIENTES PARA RECOLECTAR		Materiales	192
MUESTRAS DE ESPUTO.....	177	Métodos	193
PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN.....	178	Método para muestras obtenidas asépticamente..	193
Expectoración espontánea.....	178	Método para muestras contaminadas	194
Expectoración inducida	179	Lectura.....	198
EXAMEN DIRECTO DEL BACILO DE LA		Informe de resultados del cultivo.....	199
TUBERCULOSIS	180	Preparación de medios de cultivo	199
BACILOSCOPIA.....	180	PRUEBA DE SENSIBILIDAD DE <i>M.tuberculosis</i>	
Principios generales	180	A LOS MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSOS... 204	
Preparación del extendido	180	Principios generales	204
Coloración del extendido:			
Técnica de Ziehl Neelsen.....	184		
Observación microscópica de la muestra			
Coloreada	187		
Método de lectura.....	188		
Informe de resultados de baciloscopia	189		
Registro diario de baciloscopia.....	190		

OBTENCIÓN DE ESPUTO

PRINCIPIOS GENERALES

◆ **Una buena muestra**

Es aquella que proviene del árbol bronquial, y se obtiene después de un esfuerzo de tos. Sin embargo, una muestra con apariencia de saliva puede ser positiva.

◆ **Muestra suficiente**

Es aquella con un volumen aproximado a 5 a 10 mL.

◆ **La hora de obtención puede ser a cualquier hora del día**, de preferencia será el primer esputo de la mañana y siempre antes del desayuno.

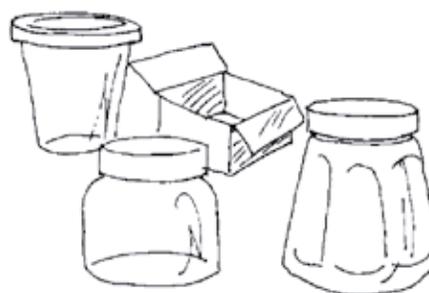
◆ El ambiente donde se obtiene la muestra debe tener **buena ventilación y debe prohibirse la presencia de otras personas**, al momento de la obtención de la muestra.

IV

RECIPIENTES PARA RECOLECTAR MUESTRAS DE ESPUTO

◆ Se puede utilizar:

- Frascos de vidrio con tapa rosca.
- Envases desechables de material plástico con tapa.
- Pequeñas cajas de cartón con tapa.



◆ En general, deberán ser de boca ancha (aproximadamente 5 cm de diámetro) y 5 cm de altura. Así, el paciente puede expectorar con facilidad dentro del recipiente y el laboratorista al momento de efectuar el examen directo puede elegir la mejor parte.

PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN

EXPECTORACIÓN ESPONTÁNEA

1. Indicar al paciente que se ponga de pie.

2. Solicitar que haga un movimiento inspiratorio profundo, llenando de aire los pulmones.



3. Indicar al paciente que vacíe los pulmones con una sola espiración, tosiendo al mismo tiempo tan fuerte y profundamente como pueda.

4. Solicitar que escupa en el interior del recipiente rotulado.

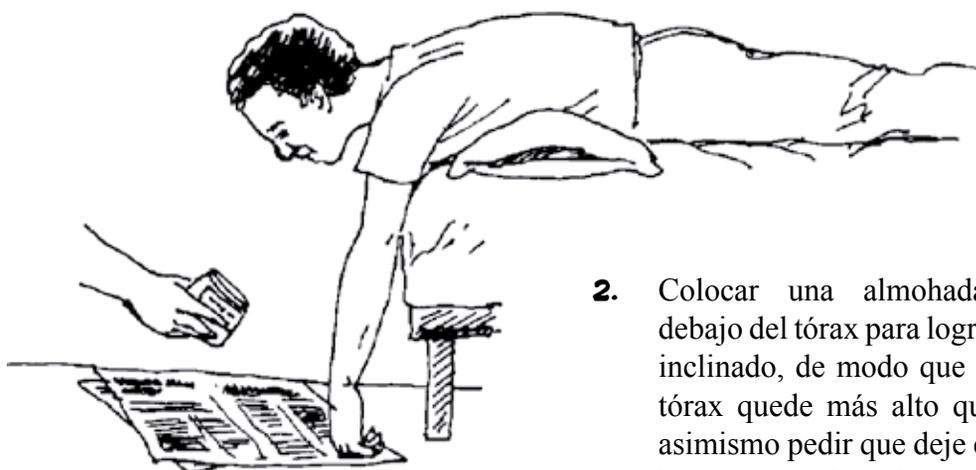


5. Tapar el recipiente y en una bolsa plástica llevarla al laboratorio inmediatamente.

EXPECTORACIÓN INDUCIDA

- ◆ Cuando el paciente no logra expectorar y es necesario el examen de esputo, se puede inducir la obtención de la muestra de la siguiente manera:

1. Acostar al paciente boca abajo sobre una camilla o cama, haciendo que su cabeza rebase el borde.



2. Colocar una almohada doblada debajo del tórax para lograr un plano inclinado, de modo que la base del tórax quede más alto que la boca, asimismo pedir que deje caer ambos brazos y la cabeza hacia el piso.

3. Indicar al paciente que inspire, retenga el aire y luego lo expulse con fuerza hasta obtener la expectoración.



4. Escupirá en el recipiente rotulado que deberá estar sobre un papel periódico en el piso.

EXAMEN DIRECTO DEL BACILO DE LA TUBERCULOSIS

BACILOSCOPIA

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La baciloscofia es la técnica fundamental para el diagnóstico de la tuberculosis.
- ◆ Debe emplearse en toda muestra tanto pulmonar como extrapulmonar y para el control mensual del tratamiento y retratamiento por TBC.
- ◆ Siempre deben aplicarse las normas de bioseguridad para el manejo de muestras infectantes.
- ◆ También es muy recomendable realizar los extendidos y coloraciones en un horario especial, en el momento de menor trabajo en el laboratorio.

PREPARACIÓN DEL EXTENDIDO

¡ATENCIÓN!

- ◆ Procesar las muestras por series, cada serie no debe ser mayor a doce muestras.
- ◆ Preferentemente los portaobjetos deben ser nuevos, desgrasados con alcohol, en lo posible no reutilizar las láminas positivas.

MATERIALES

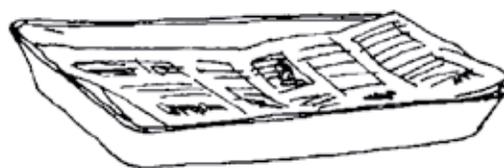
- Materiales para la obtención de muestra.
- Láminas portaobjetos, que no estén rayadas.
- Aplicadores o palitos de madera (bajalenguas).
- Mechero de alcohol.
- Lápiz graso o para marcar vidrio.
- Papel periódico.
- Bandeja de acero inoxidable o fierro enlozado para recepción de muestras (dimensiones recomendadas: 60 x 40 x 10 cm).
- Fenol al 5% (ver Anexos).
- Soporte de madera para láminas portaobjetos.



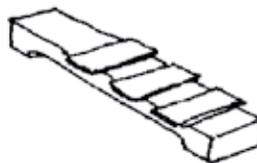
IV

PROCEDIMIENTO

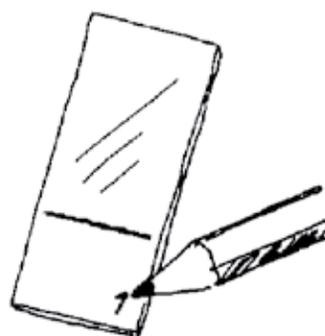
1. Colocar sobre la mesa de trabajo una hoja doble de papel periódico o la bandeja de fierro con papel periódico, humedecido con fenol al 5%.
2. Colocar los envases conteniendo las muestras de esputo previamente rotuladas sobre la mesa de trabajo.



3. Colocar las láminas portaobjetos sobre el soporte de madera.



4. Numerar los envases y las láminas portaobjetos con el lápiz grueso en forma correlativa. Trazar una línea en el tercio inferior de cada lámina portaobjetos en la cara opuesta del extendido empleando el lápiz grueso, la que dividirá la superficie de la lámina en una tercera parte destinada a la numeración y dos terceras partes para hacer el extendido.



5. Destapar cuidadosamente el envase de la muestra, manteniendo la boca del envase cerca del mechero encendido.



6. Dividir el aplicador de madera (bajalengua) en dos o tres partes y agarrarlo entre el pulgar y el índice de la mano, para luego seleccionar y extraer la porción muco-purulenta de color amarillo verdoso del esputo, enrollándola en el aplicador.



7. Colocar la porción elegida sobre el portaobjetos y extenderla, haciendo movimientos en vaivén, hasta lograr que el extendido sea uniforme (ni muy fino ni muy grueso), tratando de dispersarla en el centro de la lámina, dibujando un círculo u óvalo de 2 cm de largo por 1 a 2 cm de ancho, sin llegar a los bordes de la lámina, para evitar que el laboratorista se contamine al manipularla.



8. **Verificar que el extendido tenga grosor homogéneo y adecuado.** Si es demasiado fino, es posible producir un resultado falso negativo. Si es muy grueso, el material puede desprenderse durante la coloración o puede resultar difícil la visualización de bacilos debajo de una capa gruesa de mucus.
9. Colocar el extendido, sobre el soporte de madera para láminas portaobjetos y dejar secar a temperatura ambiente.
10. **El extendido no debe ser calentado a la llama mientras esté húmedo** pues el calor fuerte altera la estructura de los bacilos y su posterior tinción; además **puede generar aerosolos.**



11. Tomar el extendido seco con una pinza manteniendo la cara que contiene la muestra hacia arriba y pasarlo rápidamente sobre la llama del mechero tres o cuatro veces cuidando que no se caliente demasiado.

¡ATENCIÓN!

- ◆ **Nunca debe calentarse la lámina mientras se haga el extendido,** debido a que por el calor se forma precipitado granulos.

12. Los extendidos deben ser coloreados de inmediato, ya que algunos bacilos pueden permanecer vivos después de fijados con calor hasta que incorporan la fucsina.

13. Terminado el extendido, descartar los aplicadores en un recipiente que contenga una solución de hipoclorito de sodio al 1%; este recipiente irá al autoclave o directamente a incineración.



COLORACIÓN DEL EXTENDIDO: TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN

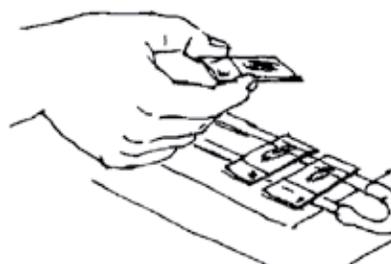
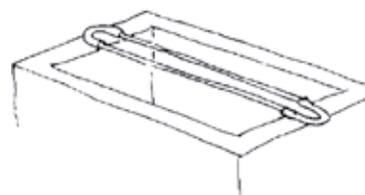
- ◆ El bacilo de la tuberculosis *Mycobacterium tuberculosis*, es resistente a los ácidos, es decir, una vez teñidos de rojo con fucsina básica fenicada, no se pueden decolorar por medio de ácidos o etanol.
- ◆ Antes de su uso, todos los colorantes y soluciones a emplearse deben ser previamente filtrados.

MATERIALES

- Una serie de láminas portaobjetos con extendidos fijados.
- Dos varillas de vidrio unidas por sus extremos, por un tubo de goma.
- Reactivos para coloración: fucsina básica fenicada, azul de metileno, fenol de cristales, ácido clorhídrico, alcohol de 95° y agua destilada (ver Anexos).
- Un microscopio binocular, con objetivo de 100x. Aceite de inmersión.
- Un mechero de alcohol.
- Un soporte de madera para láminas portaobjetos.

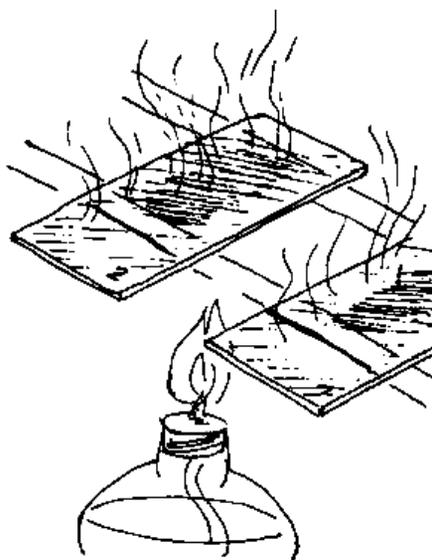
MÉTODO

1. Colocar sobre los bordes del lavadero las dos varillas de vidrio unidas por sus extremos, por un tubo de goma.



2. Colocar sobre este soporte de varilla, la serie de láminas fijadas con el extendido hacia arriba, el número hacia el lado del laboratorista.

3. **Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con el colorante fucsina básica fenicada.** No olvidar filtrar el colorante antes de efectuar la tinción.

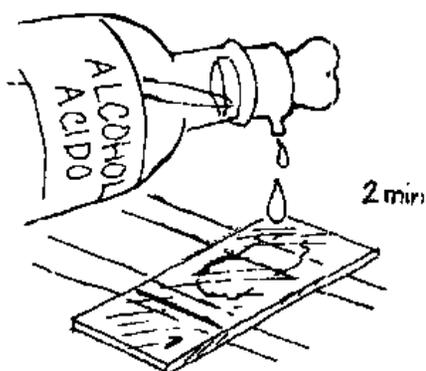
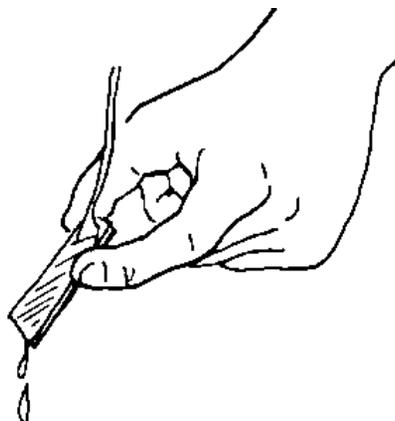


4. Calentar suavemente con la llama del mechero de alcohol o con la llama de un hisopo embebido en alcohol, por debajo de cada lámina portaobjetos, hasta la emisión de vapores, repetir el proceso tres veces.

No debe hervir la preparación. Si el volumen del colorante disminuye por evaporación, agregar más colorante hasta cubrir el extendido y dejar enfriar.

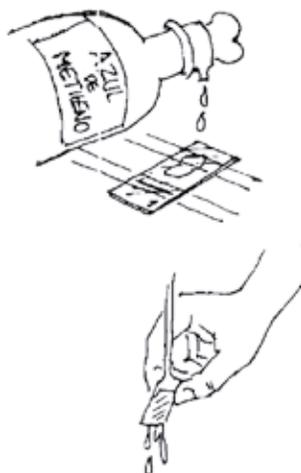
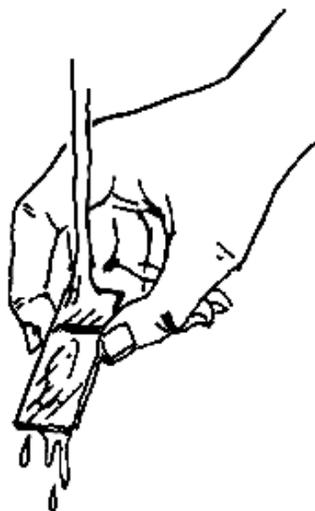
El tiempo mínimo de coloración con fucsina es de 5 minutos.

5. Eliminar la fucsina tomando la lámina por el extremo numerado, entre el dedo pulgar y el índice o con una pinza, inclinándola hacia delante y dejando caer agua corriente a baja presión. Girar el extendido y lavar también la parte posterior.

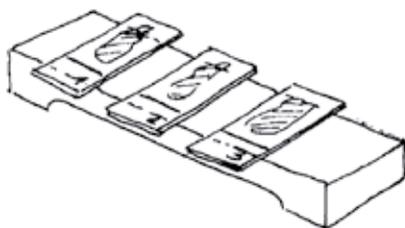


6. Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con la solución de **alcohol ácido**, durante **2 minutos**, hasta obtener una **coloración rosa pálido**. De ser necesario, decolorar nuevamente y dejar reposar 1 minuto.

7. Eliminar el alcohol ácido, lavar nuevamente las láminas con agua corriente a baja presión, cuidando de no desprender la película que formó el extendido.



8. Cubrir la superficie del extendido con el colorante azul de metileno, durante 30 segundos a 1 minuto. Eliminar el azul de metileno y lavar cada lámina con agua a baja presión, por ambas caras de la lámina portaobjetos.



9. Colocar las láminas coloreadas en orden numérico sobre el soporte de madera y dejar secar al medio ambiente.

¡ATENCIÓN!

- ◆ Las muestras después de su obtención deben procesarse de inmediato. En caso de muestras de esputo, si el laboratorio no puede procesarlas el mismo día de su obtención, pueden conservarse en refrigeración a 4 °C por no más de una semana.

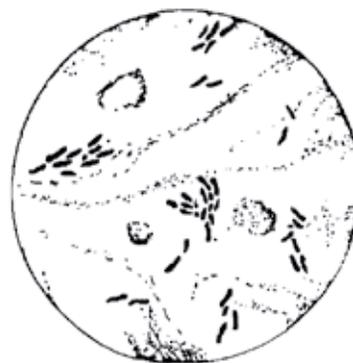
IV

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA MUESTRA COLOREADA

- ◆ La observación microscópica tiene por objetivo:
 - Determinar si en el extendido hay **bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR)**.
 - Establecer el número de estos BAAR.
- ◆ Se usa un microscopio con objetivo de 100x de aumento. Antes de usarlo, se debe colocar una gota de aceite de inmersión sobre el extendido.
- ◆ En la observación microscópica los BAAR presentan las siguientes características:
 - Son de color **rojo fuerte**: destacan sobre un fondo azul.



- Tienen forma recta o como bastoncitos delgados, ligeramente curvos.
- Son muy pequeños (1 - 4 μm).
- Son frecuentemente granulados.
- Se disponen en grupos de 3 - 10 bacilos que asemejan trozos de hilo o parecen formas de letras torcidas (con frecuencia se encuentran cerca de los hilos de fibrina).



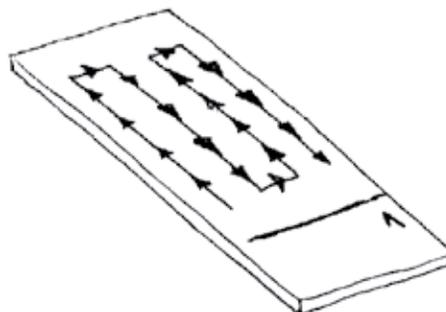
◆ En la observación microscópica los **BAAR** se pueden confundir con:

- **Levaduras**, que se tiñen más o menos de rojo. Al calentarlas se rompen y forman grupos de gránulos voluminosos de color rojo.
- **Manchas de colorante**, cuando el portaobjetos no se ha decolorado adecuadamente.
- No olvidar que otro bacilo patógeno resistente a los ácidos es el **bacilo de la lepra**.

MÉTODO DE LECTURA

- ◆ Es importante tener en cuenta que se considera como campo **microscópico útil**, aquel en el cual se observa elementos celulares de origen bronquial, es decir, leucocitos, fibras mucosas y células ciliadas. Los campos en que no aparezcan dichos elementos no deben considerarse en la lectura. Una vez identificados los campos proceder de la siguiente manera:

1. Observar un mínimo de 100 campos útiles. Hacer un examen completo del primer portaobjetos empleando el objetivo de 100x, avanzando de izquierda a derecha, con iluminación máxima y sin filtro de color.
2. Apuntar el número de bacilos observados y el número de campos microscópicos útiles a observarse, que variará según la cantidad de bacilos que contenga la muestra.



INFORME DE RESULTADOS DE BACILOSCOPIA

- ◆ Se informa con la siguiente escala semicuantitativa:



-	Negativo: No se encuentran BAAR EB 100 campos microscopio observados
+	Menos de 1 BAAR por campo, en 1000 campos microscopios observados.
++	1 a 10 BAAR por campo, en 50 campos microscopio observados.
++++	Más de 10 BAAAR por campo, en 20 campos microscopios observados.

- ◆ **En caso de encontrar de 1 a 9 BAAR en 100 campos microscópicos observados, se procederá a:**
 1. Leer 100 campos más, contabilizando solo campos microscópicos útiles, en busca de positividad.
 2. Si persiste el resultado (1 a 9 BAAR) realizar otro extendido de una porción más representativa de la misma muestra, en búsqueda de positividad y reportar el número de BAAR observado.
 3. Derivar la muestra problema a **cultivo** para su confirmación bacteriológica.
 4. Indicar en el formato de resultados, en "observaciones", que se está derivando la muestra a cultivo y sugerir el envío de nuevas muestras del paciente.

REGISTRO DIARIO DE BACILOSCOPIA

- ◆ Los registros son medios prácticos para obtener información que ayudan en las actividades de vigilancia, supervisión y evaluación del Programa Nacional de Control de Tuberculosis.
- ◆ Ofrece información necesaria para preparar los informes mensuales y trimestrales sobre detección y control de casos de tuberculosis.
- ◆ El personal que realiza las baciloscopías estará obligado, bajo responsabilidad, a llevar el registro diario de las baciloscopías efectuadas y velar por la integridad y puesta al día de la información.
- ◆ Para ello se requiere un libro donde se consigna una numeración correlativa anual. Se empezará anualmente el 2 de enero y terminará el 31 de diciembre del mismo año, desde el número 1 hasta el último correspondiente.

CULTIVO DE BK

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ **El cultivo es el método bacteriológico más sensible y específico** para detectar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* y otras micobacterias. Aporta de 20 a 25% casos más a lo diagnosticado por baciloscopía.
- ◆ **Se indica cultivo** para *Mycobacterium tuberculosis*, en los siguientes casos:

Para diagnóstico

- Paciente sintomático respiratorio con BK (-) y radiografía de pulmones con sospecha de TB (Rx anormal).
- Paciente paucibacilar, es decir, cuando se encuentra de 1 a 9 BAAR en 100 campos microscópicos observados.
- Muestras extrapulmonares: todas las muestras de biopsias, piezas anatómicas, tejidos y fluidos (exudados, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, etc) de casos con sospecha de tuberculosis extrapulmonar, deberán ser sometidas a cultivo.
- Toda muestra de paciente inmunosuprimido, especialmente personas viviendo con VIH (virus de la inmunodeficiencia).
- Toda muestra de personas privadas de su libertad.
- Persona con tuberculosis pulmonar con algún factor de riesgo de TB MDR
- Muestras de pacientes menores de 15 años. De no tener riesgo de TB MDR, se conservará la cepa, para el caso que el niño presente mala evolución durante su tratamiento.

Para control

- Persona con tuberculosis con sospecha de fracaso al esquema I o II de tratamiento, por persistencia de baciloscopía positiva al segundo mes de tratamiento o cuando presenta baciloscopía positiva después de un periodo de negativización.
- Persona con tuberculosis con esquema estandarizado o individualizados para el control del tratamiento.

Otras indicaciones

- Persona con tuberculosis crónica multitratadas (más de dos tratamientos previos).
- En forma excepcional, el laboratorista derivará a cultivo muestras a pedido y bajo responsabilidad del médico, quienes deberán indicar en observaciones de la “Solicitud de Investigación Bacteriológica en Tuberculosis” las condiciones de la persona con tuberculosis que ameriten la prueba, que sean diferentes a las antes mencionadas.

MATERIALES

- Materiales para la obtención de muestras.
- Una centrífuga.
- Estufa o baño María.
- Mortero de porcelana estéril.
- Mascarilla protectora.
- Agua destilada estéril.
- Hidróxido de sodio (NaOH) al 4%.
- Rojo de fenol.
- Ácido sulfúrico.
- Tubos estériles con tapa rosca.
- Mechero de Bunsen o de alcohol.



- Pipeta Pasteur con chupón.
- Bandeja de madera de fondo inclinado.
- Gradilla.
- Tubos con medio de Ogawa acidificada.
- Tubos con medio de Lowenstein Jensen.

MÉTODOS

IV

MÉTODO PARA MUESTRAS OBTENIDAS ASÉPTICAMENTE

- ◆ Las muestras obtenidas asépticamente son recolectadas en un recipiente estéril, y se cultivan sin realizar un proceso de descontaminación previo.
- ◆ Las muestras recolectadas asépticamente son:
 - **Muestras obtenidas por punción:**
Líquido cefalorraquídeo, pleural, peritoneal y articular.
 - **Muestras obtenidas por biopsia (tejido):**
Pulmonar, hígado, ganglio.

MUESTRAS OBTENIDAS POR PUNCIÓN

- Si se obtiene volúmenes suficientes deben ser centrifugados y el sedimento se sembrará en varios tubos de cultivo. Si la cantidad de la muestra es pequeña, se sembrará toda la muestra.

MUESTRAS OBTENIDAS POR BIOPSIA (TEJIDO)

- Primero debe proceder a triturar la muestra obtenida en un mortero de porcelana previamente esterilizado. De ser necesario, agregar agua

destilada estéril, hasta obtener una suspensión que puede ser inoculada directamente en el medio de cultivo.

MÉTODO PARA MUESTRAS CONTAMINADAS

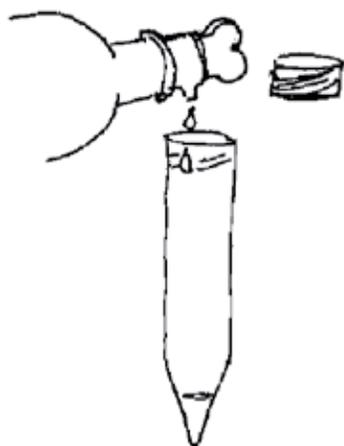
- ◆ Las muestras contaminadas tales como: **esputo, orina, contenido gástrico, etc. deben ser descontaminadas antes del cultivo.**

- ◆ **La descontaminación tiene por objeto:**
 - Eliminar la flora asociada a *M.tuberculosis*, cuyos gérmenes se multiplican más rápido que el bacilo.
 - Homogeneizar (uniformizar) la muestra, especialmente el esputo, a fin de liberar al bacilo *M.tuberculosis* del mucus, material celular y tejidos.

- ◆ Se procede de la siguiente manera:
 1. **Centrifugar las muestras de orina y contenido gástrico** a 3 000 o 3 500 RPM (revoluciones por minuto) durante 20 a 30 minutos.
 2. Eliminar el sobrenadante.
 3. Descontaminar y sembrar el sedimento.

a. Descontaminación con centrifugación (Método de Petroff) y uso del medio de Lowenstein – Jensen

1. Trabajar frente a la llama del mechero. Cada operador debe procesar en series de doce muestras por vez. Es conveniente trabajar utilizando tubos con tapa rosca; si no se cuenta con ellos, usar tubos con tapón de algodón bien ajustado.



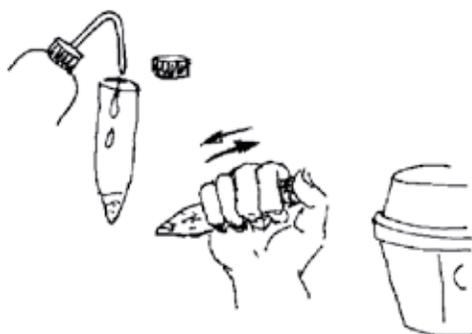
2. En un tubo, mezclar 2 mL de la muestra con 4 mL de solución estéril de hidróxido de sodio al 4%. Ajustar firmemente la tapa del tubo, para impedir que al agitarlo se diseminen aerosoles que son peligrosos para el operador.

3. Agitar vigorosamente. Incubar a 37 °C durante 20 minutos, agitando cada 5 minutos.



4. Centrifugar durante 20 minutos a 2000 - 3 000 RPM y desechar el sobrenadante.

5. Agregar al sedimento 1 - 2 gotas de solución de rojo fenol (indicador de pH) y 1 - 2 gotas de solución de ácido sulfúrico al 10 o 15% para producir el viraje del indicador, desde rojo violáceo al amarillo - anaranjado.

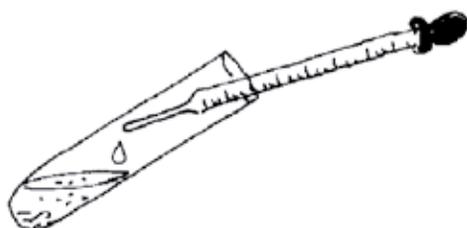


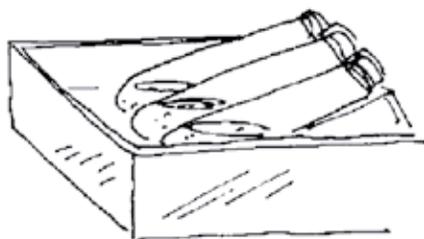
6. Efectuar un lavado para eliminar los restos de ácido sulfúrico: Agregar aproximadamente 3 mL de agua destilada estéril, agitar, centrifugar durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante.

7. Inocular el sedimento al medio de cultivo Lowenstein- Jensen. La cantidad inoculada a cada tubo de medio de cultivo es de 4 - 5 gotas. Durante el sembrado de la muestra descontaminada, los tubos con el medio de cultivo deben mantenerse en posición inclinada cerca de la llama.



8. Tomar con una pipeta Pasteur 1 mL de muestra descontaminada y sembrar 4 - 5 gotas en cada tubo de medio de cultivo, dejando escurrir la muestra sobre la superficie del medio, sin tocarla con la pipeta.

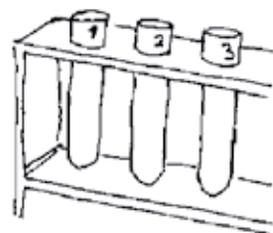




9. Una vez sembrados los tubos con medio de cultivo, colocarlos sobre una bandeja de fondo inclinado, para que el líquido sembrado cubra toda la superficie del medio. Llevarlos a la estufa a una temperatura entre 35 y 37 °C, dejando floja la tapa de cada tubo para que pueda evaporarse la parte líquida de la siembra.
10. Después de 48 horas, revisar los tubos y, si se ha evaporado el líquido, ajustar la tapa rosca. Si se usan tapón de algodón, flamearlo e introducirlo con una pinza y cerrar con un tapón de jebe estéril.

b. Descontaminación sin centrifugación y uso del medio Ogawa acidificado

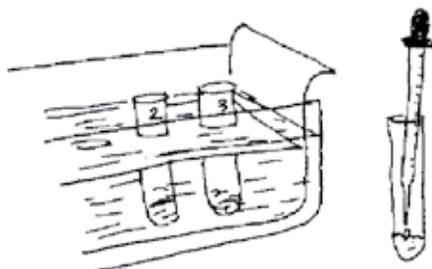
1. Sobre la mesa de trabajo colocar las muestras numeradas y en una gradilla colocar tubos estériles numerados con la misma secuencia de las muestras.



2. Colocar 1 mL de muestra (esputo, sedimento de muestra centrifugada, etc.) en cada tubo estéril de acuerdo con la numeración correspondiente. Agregar 4 mL de solución estéril de hidróxido de sodio (NaOH) al 4%.

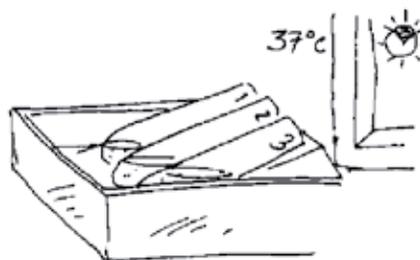


3. Dejar a 37 °C por 20 minutos en estufa o en baño maría.



4. Retirar los tubos de la estufa o baño maría, homogenizar (mezclar) el contenido de cada tubo con una pipeta e inocular 0,1 mL (por tubo) en dos tubos de medio Ogawa, y bañar toda la superficie del medio.

5. Colocar los tubos en una bandeja de madera de fondo inclinado, e incubar en estufa a 37 °C.



LECTURA

- ◆ El desarrollo de *M.tuberculosis* generalmente aparece luego de 2 a 3 semanas.
- ◆ Las observaciones de los cultivos se hacen después de 48 horas de incubación de la muestra, para descartar contaminación:
 - **Alcalinizado:** color blanco amarillo.
 - **Acidificado:** color azul oscuro, por mala descontaminación (neutralización) de la muestra.
 - **El desarrollo de colonias antes de las 48 horas es indicativo de contaminación**, algunas veces el medio se licúa por acción de gérmenes proteolíticos.
- ◆ Las revisiones posteriores se realizarán durante la incubación a los 7, 30 y 60 días.
- ◆ Si no se observan colonias en el tiempo mencionado, se deja los cultivos hasta las 8 semanas antes de proceder a informar el resultado como negativo.
- ◆ Las colonias típicas son de color crema, rugosas, con aspecto de coliflor y de borde irregular. Se desarrollan en la superficie del medio y el sitio en que se implantan no cambia de color.
- ◆ De las colonias que no tienen una morfología típica, se debe hacer un extendido y colorearlo por Ziehl Neelsen para examinarlo. Si son bacilos ácido - alcohol resistente (BAAR), se debe enviar el cultivo al laboratorio de referencia para su identificación.

INFORME DE RESULTADOS DEL CULTIVO

- ◆ Se recomienda usar la escala semicuantitativa.

-	No se observa colonias. Número total de colonias, si hay menos de 20.
+	De 20 a 100 colonias.
++	Colonias separadas de 100 a 200.
+++	Colonias confluentes (agrupadas), se observan en toda la superficie del medio.
C	Cultivo contaminado.

IV

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

MATERIALES

- ◆ Todo el material de vidrio debe esterilizarse en baño maría o en autoclave.
 - Un frasco fraccionador de 2 000 mL, provisto de caño de goma o látex.
 - Pinza de Mohr.
 - Accesorio en forma de campana para verter.
 - Un embudo grande cubierto con dos capas de gasa, sujetadas al pico del embudo y protegidas por envoltura de papel grueso.
 - Probeta de 1 L.
 - Batidora o licuadora de tipo casero con vaso de vidrio y tapa, que puede ser esterilizada, de más de 1 L de capacidad.

- Tubos de ensayo con tapa rosca o algodón 16 x 160 mm.
- Un coagulador a gas o eléctrico, regulable a 80 - 85 °C, con bandeja de fondo inclinado.

a. Preparación del medio de Lowenstein-Jensen

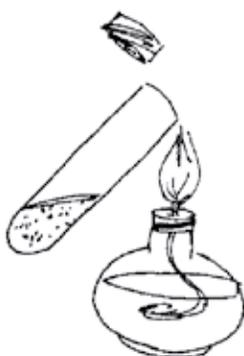
CONSTITUYENTES

- 
- ◆ Solución de sales:
 - Fosfato monopotásico (P04H2K) 2,4 g
 - Sulfato de magnesio (S04Mg7H20) ,24 g
 - Citrato de magnesio 0,6 g
 - L-asparagina 3,6 g
 - Glicerina bidestilada 12 mL
 - Agua destilada 600 mL
 - ◆ Suspensión de huevos enteros 1 000 mL
 - ◆ Solución acuosa de verde de malaquita al 2%, recién preparada: 20 ml.

MÉTODO

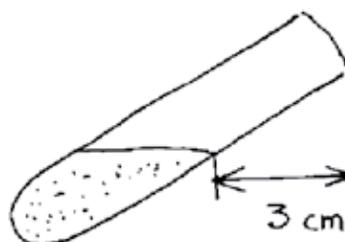
1. Disolver las tres primeras sales y la asparagina en 200 - 300 mL de agua destilada. Calentar en baño maría hasta disolución de la asparagina.
2. Pasar la solución del paso 1 a un frasco de 2 000 mL de capacidad, agregar agua destilada hasta completar 600 mL y 12 mL de glicerina.
3. Esterilizar en el autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
4. Los huevos deben ser frescos. Limpiarlos con agua y detergente, enjuagar con agua corriente y dejar secar. Luego, lavarlos con alcohol de 70°.

5. Con las manos cuidadosamente lavadas, quebrar los huevos uno por uno en el borde de una probeta de 1 L y observar la yema de cada uno, que debe ser firme y conservar la forma redonda, sin aplastarse ni romperse.
6. Vaciar los huevos de la probeta en el vaso de la licuadora y mezclarlos a baja velocidad durante algunos segundos cuidando de no causar exceso de burbujas.
7. Vaciar los huevos homogenizados (mezclados) en el frasco que contiene la solución de sales, asparagina y glicerina.
8. Agregar la solución de verde de malaquita.
9. Agitar el frasco en forma circular.
10. Filtrar el contenido por el embudo cubierto de gasa, recibir el filtrado en el frasco fraccionador cuidando de cerrar con pinza de Mohr el caño de salida.
11. **Distribuir el medio** haciéndolo escurrir por la pared del tubo, flameando la boca del tubo al sacarle y ponerle la tapa.



12. El **coagulador**, debe haberse encendido previamente hasta lograr una temperatura de 85 °C.

13. Asegurarse que cada tubo y el ángulo de la bandeja del coagulador, donde se colocan los tubos, sean adecuados como **para que el medio forme en el tubo un plano inclinado**, quedando por lo menos 3 cm entre la boca del tubo y el extremo del plano inclinado.



14. No deben transcurrir más de 15 a 20 minutos desde el momento del llenado del tubo hasta la colocación en el coagulador.
15. Colocar los tubos en el coagulador durante 30 minutos a la temperatura descrita.
16. Terminada la coagulación, llevar los tubos a una estufa a 37 °C, dejándolos con las tapas ligeramente flojas durante 48 horas para controlar su esterilidad y permitir que se elimine el agua de condensación.
17. Transcurridas las 48 horas, ajustar bien las tapas para evitar la desecación y guardar los tubos en refrigeración. Si se usan tubos con tapón de algodón, se guardarán en bolsas de plástico cerradas herméticamente, a fin de mantener la humedad.

 **¡ATENCIÓN!**

- ◆ Se recomienda no usar el medio después de transcurridos 2 meses desde su preparación.

b. Preparación del medio de Ogawa

CONSTITUYENTES

- Fosfato monopotásico (KH ₂ P ₀₄)	3 g
- Glutamato de sodio	1 g
- Agua destilada	1 g
- Glicerol	6 mL
- Verde de malaquita al 2%.	6 mL
- Huevo homogenizado.	200 mL

MÉTODO

I. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE SALES

- Disolver en 100 mL de agua destilada, el fosfato monopotásico y el glutamato de sodio y colocar en baño maría a 100 °C o en autoclave a

121 °C por 15 minutos. Luego, enfriarla a temperatura ambiente.

2. PREPARACIÓN DE HUEVO HOMOGENIZADO

- Lavar los huevos con detergente y enjuagar con agua de caño, dejar secar en una canastilla de alambre.
 - Limpiar los huevos con algodón embebido en alcohol al 70% y dejar secar. Romper los huevos uno por uno y verter en un vaso pequeño, para comprobar si están en buenas condiciones, de lo contrario descartar y cambiar de vaso.
 - Vaciar los huevos en un beaker y mezclar con una bagueta o palillos estériles. Filtrar utilizando cuatro capas de gasa estéril.
3. Agregar 6 mL de glicerol y 6 mL de verde de malaquita al 2% a la solución de sales y mezclar bien.
 4. Agregar el huevo homogeneizado lentamente a la solución del paso 3, evitando la formación de burbujas.
 5. Mezclar suavemente y dejar reposar por 30 minutos.
 6. Distribuir el medio en tubos de 20 x 125 mm, en una proporción de 6 mL por tubo, evitando la formación de burbujas.
 7. Colocar los tubos inclinados en el coagulador y dejar a 90 °C por una hora.
 8. Después de la coagulación, sacar los tubos y dejarlos enfriar. Luego, guardarlos en bolsas de plástico y cerrarlas herméticamente, anotando la fecha de preparación. Pueden guardarse en el refrigerador hasta por un mes.

PRUEBA DE SENSIBILIDAD DE *M. tuberculosis* A LOS MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSOS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Es un examen para determinar la sensibilidad o resistencia de una cepa de *M.tuberculosis* a los fármacos antituberculosis.
- ◆ **El laboratorio de referencia nacional para la realización de pruebas de sensibilidad es el Instituto Nacional de Salud (INS) y/o laboratorios acreditados por ellos y por un laboratorio supranacional a solicitud del INS.**
- ◆ **El método de las proporciones** es utilizado como el estándar internacional para la realización de las pruebas de sensibilidad a fármacos de **primera línea**. Consiste en determinar la proporción de mutantes resistentes de una población a una o más drogas.
- ◆ Para las pruebas de sensibilidad a drogas de **segunda línea** se utilizará el **método del agar en placa**.
- ◆ **Se debe solicitar la prueba de sensibilidad a drogas de primera línea en el momento del diagnóstico**, a toda persona con tuberculosis que tenga alto riesgo de desarrollar TB MDR:
 - Antecedente de ser contacto de paciente con TB MDR confirmada con prueba de sensibilidad (PS) o en tratamiento con drogas de segunda línea.
 - Coinfección VIH.
 - Diabetes mellitus.
 - Tratamiento prolongado con corticoides.
 - Recaída en menos de seis meses de egresar como “curado” de esquema uno o dos de tratamiento.
 - Persona con tuberculosis multitratada.
 - Personal de salud activo o cesante con menos de dos años de cesantía.
 - Estudiantes de ciencias de la salud que realizan actividades en áreas clínicas y/o de laboratorio y/o salas de necropsia.
 - Internos de penales o exinternos de penales.
 - Trabajador de establecimientos penitenciarios.
 - Contacto de paciente fallecido por tuberculosis, durante el tratamiento.
 - Personas con antecedente de tratamiento previo particular y/o autoadministrado.

- Personas con antecedente de abandono de tratamiento antituberculoso.
 - Antecedente de hospitalización previa por cualquier motivo en los últimos dos años, por más de 15 días.
 - Tratamiento previo con presencia de reacción adversa a fármacos antituberculosos (RAFA) que obligó a modificar dosis y/o cambiar y/o suprimir algún medicamento.
 - Contacto de persona con tuberculosis que fracasó a tratamiento antituberculosis.
 - Cepas de cultivo positivo, de personas con infección VIH o SIDA/TB.
- ◆ **Se debe solicitar la prueba de sensibilidad a drogas de primera y segunda línea a:**
- Toda persona con tuberculosis que ingresa a un esquema de tratamiento que incluya medicamentos de segunda línea.
 - Toda persona con tuberculosis con prueba de sensibilidad que indique presencia de bacilos MDR.
 - Antecedente de contacto con persona con TB MDR confirmada o en tratamiento para TB MDR.
 - Antecedente de contacto de persona con tuberculosis tratado con medicamentos de segunda línea.
 - Antecedente de haber recibido drogas de segunda línea por un período mayor de 30 días.
 - Abandono a esquemas de tratamiento con medicamentos de segunda línea.
 - Fracaso a esquemas de tratamiento con medicamentos de segunda línea.
 - Recaída a esquema de tratamiento con medicamentos de segunda línea.
- ◆ **Pruebas rápidas de sensibilidad**
- BACTEC 460 TB es responsabilidad del INS.
 - GRIESS, es una prueba directa a partir de muestras de esputo. Detecta resistencia a isoniacida y rifampicina y será de responsabilidad de los laboratorios de referencia regional y de laboratorios intermedios validados.
 - MODS, es otra alternativa de prueba directa a partir de muestras de esputo, detecta resistencia a isoniacida y rifampicina y será de responsabilidad de los laboratorios de referencia regional y de laboratorios intermedios validados.

CAPÍTULO

V

ORINA

OBTENCIÓN DE ORINA 209	Principios generales 230
Principios generales 209	Materiales 230
RECIPIENTES PARA ORINA 211	Método 231
Materiales 211	Lectura y resultados 231
Métodos de obtención 211	MEDICIÓN DEL pH..... 233
EXAMEN DIRECTO DE FROTIS DE ORINA 213	Principios generales 233
Principios generales 213	Materiales 233
Materiales 213	Método 233
Método 214	Resultados 234
Lectura e informe 215	USO DE TABLETAS Y TIRAS REACTIVAS EN LOS
SEDIMENTOS URINARIOS..... 216	EXÁMENES DE ORINA 235
Principios generales 216	Principios generales 235
Elementos microscópicos de los sedimentos urinarios 217	Tabletas y tiras reactivas 236
Preparación del sedimento urinario 228	PRUEBA DEL EMBARAZO..... 238
GRAVEDAD ESPECÍFICA Y pH DE LA ORINA..... 230	Principios generales 238
MEDICIÓN DE LA GRAVEDAD ESPECÍFICA..... 230	Materiales 238
	Métodos 239
	Método del tubo de ensayo 239
	Método del portaobjetos 239

OBTENCIÓN DE URINA

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ **La cantidad apropiada** de orina que se debe recoger es de aproximadamente 50 mL.
- ◆ **Es importante la higiene personal previa a la obtención de la orina.** La contaminación de la orina es frecuente por bacterias localizadas debajo del prepucio, en secreciones vaginales, en uretra distal, bacterias de la mano, de la piel y de ropas.
- ◆ La higiene personal previa a la obtención de la orina es necesaria hacerla **en el momento de tomar las muestras y no antes.**



V

MUJERES

- ◆ Deberán lavar el área genital en todos los casos. Evitar recolectar muestras durante los periodos menstruales.
- ◆ Utilizar compresas de gasa estéril, en una solución de jabón antiséptico, y limpiar alrededor del meato urinario, separando los labios vaginales.
- ◆ Enjuagar bien con agua estéril mientras se mantienen separados los labios vaginales. Secar con gasa estéril.



HOMBRES

- ◆ Deberán lavar el área genital en todos los casos.
- ◆ Utilizar varias compresas de gasa estéril, en una solución de jabón antiséptico para limpiar el glande. Si no está circuncidado, retraer el prepucio o piel que cubre el glande y mantenerlo retraído hasta que termine la limpieza.
- ◆ Enjuagar con agua estéril. Secar con gasa estéril.



HORAS MÁS APROPIADAS PARA OBTENER LAS MUESTRAS

- ◆ **En pacientes hospitalizados**
Lo más conveniente es obtenerla a primera hora de la mañana, la orina se encuentra concentrada.
- ◆ **En el laboratorio**
Si es posible, que el paciente produzca la muestra en el propio laboratorio.



RECIPIENTES PARA ORINA

- ◆ **Para exámenes bacteriológicos**
Usar frasco de vidrio de boca ancha, con tapa, **estéril**.
- ◆ **Para otros exámenes**
Cualquier recipiente o frasco de vidrio, **limpios**.
- ◆ **En caso de niños**
Usar una bolsa de material plástico con boca adhesiva, que se fija alrededor de los genitales.

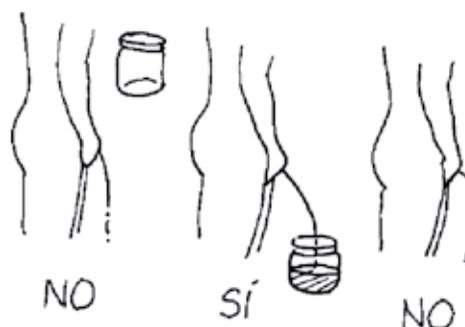
V

MATERIALES

- Recipientes indicados: estéril o limpio según sea el examen solicitado.
- Jabón antiséptico.
- Gasa estéril.

MÉTODOS DE OBTENCIÓN

- ◆ Recoger la muestra **a la mitad de la micción**. Eliminar la primera parte de la micción y desecharla. La orina que emite a continuación se recoge directamente en el recipiente. Tapar el recipiente y terminar de orinar libremente.



- ◆ **Las muestras obtenidas con sonda**, deben ser efectuadas por un médico o un personal de salud capacitado. Se indica en situaciones especiales que determina el médico.

- ◆ **En niños** la orina se puede recoger en una bolsa de material plástico con boca adhesiva, que se fija alrededor de los órganos genitales del niño durante 1 - 3 horas, dependiendo del examen solicitado.



- ◆ **Muestras de 24 horas**

- El paciente deberá orinar en la mañana, al levantarse; esta orina no se recoge.
- Posteriormente, toda la orina que se produzca durante el resto del día se reunirá en el frasco, así como toda la orina que se produzca en el curso de la noche.
- Al día siguiente, cuando el paciente se levante deberá depositar en el frasco la primera orina de la mañana. El frasco se llevará inmediatamente al laboratorio.



EXAMEN DIRECTO DE FROTIS DE ORINA

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ El sedimento urinario se usa para preparar frotis.
- ◆ El examen microscópico directo de **frotis teñidos** constituye una manera eficiente para estudiar la presencia de bacterias y otras veces, para establecer el diagnóstico de una enfermedad (por ejemplo: tuberculosis, etc.).
- ◆ Es importante que se anote una descripción detallada de los microorganismos que se observan y de los demás elementos encontrados (leucocitos, eritrocitos, células epiteliales, etc.).

MATERIALES

- Un recipiente estéril, para la obtención de la muestra.
- Una centrífuga.
- Tubos cónicos para centrifugación, estériles, con tapa rosca o tapón.
- Un portaobjetos.
- Un asa de siembra.
- Un mechero Bunsen.
- Reactivos para las tinciones de Gram y Ziehl Neelsen (Ver Anexos).
- Aceite de inmersión.
- Un microscopio.

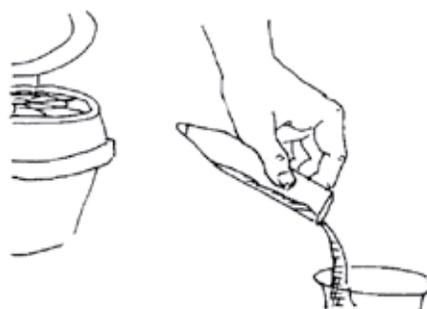


MÉTODO

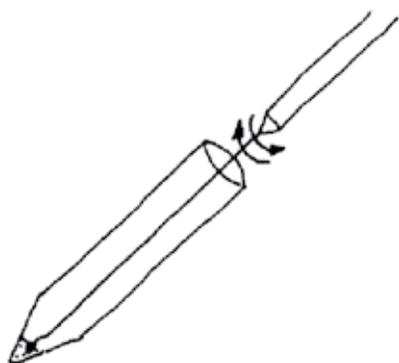
1. Verter 10 mL de la orina obtenida en el tubo cónico para centrifugación, estéril, de preferencia con tapa rosca o taponado con un taco de algodón estéril que se fijará en la boca del tubo con gasa y un hilo.

2. Centrifugar a 2 500 RPM (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.

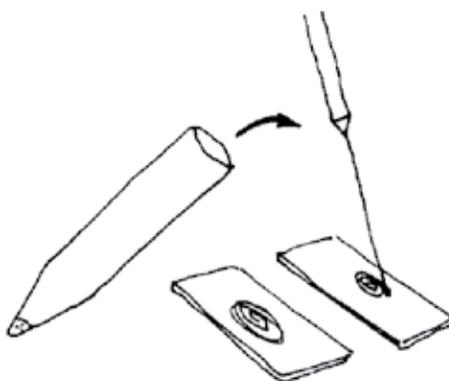
3. Eliminar el sobrenadante de la orina centrifugada.



4. Mezclar el sedimento, que queda en el fondo del tubo, usando un asa de siembra estéril (flameado) hasta que se forme una suspensión homogénea (uniforme).



5. Hacer 2 frotis de esta suspensión.



6. Teñir el frotis del portaobjetos 1 con tinción Gram y el portaobjetos 2 con tinción Ziehl Neelsen (ver Anexos)

LECTURA E INFORME

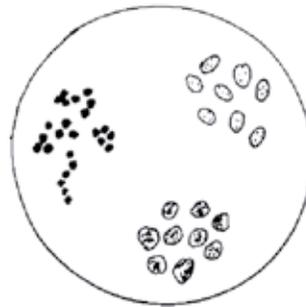
a. Frotis con tinción Gram

1. Examinar el frotis en el microscopio usando el objetivo 100x (antes, aplicar una gota de aceite de inmersión sobre el portaobjetos).

2. Buscar pus, es decir, numerosos leucocitos teñidos de rojo.

3. Buscar microorganismos como:

- Bacilos gramnegativos.
- Cocos grampositivos.
- Levaduras gramnegativos.



4. Para informar sobre los resultados, indicar si se ha observado leucocitos o pus, microorganismos, etc., haciendo una descripción precisa.

Ejemplo:

- Abundantes leucocitos.
- Escasos eritrocitos.
- Escasas células epiteliales.
- Abundantes cocos grampositivos en racimos.

b. Frotis con tinción Ziehl Neelsen

- Los bacilos se tiñen de rojo oscuro.
- Se agrupan formando hileras.

SEDIMENTOS URINARIOS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ En las personas sanas la orina casi no contiene microorganismos.
- ◆ La orina contiene elementos microscópicos en suspensión: células, cristales, etc.
- ◆ Como todos estos elementos en suspensión se sedimentan en la orina, si esta se deja en reposo durante algunas horas, se les llama **sedimentos urinarios**.
- ◆ En ciertas enfermedades del aparato urinario se pueden encontrar bacterias:
 - Cuando existe una infección en el conducto inferior, uretritis; en la vejiga, cistitis; en los riñones, nefritis.
 - Cuando se excretan en la orina bacterias de una infección que afecta otra parte del organismo.
- ◆ Cuando existen las condiciones mencionadas en el ítem anterior, los sedimentos se alteran y se pueden encontrar los siguientes elementos:
 - Pus.
 - Número anormal de glóbulos rojos o eritrocitos.
 - Cristales anormales.



ELEMENTOS MICROSCÓPICOS DE LOS SEDIMENTOS URINARIOS

a. Glóbulos rojos o eritrocitos

- ◆ Normalmente no hay eritrocitos en la orina. Sin embargo, se pueden encontrar eritrocitos en la orina de mujeres si las muestras se obtienen durante el periodo menstrual.

- ◆ Los eritrocitos pueden estar:

- **Intactos (a)**

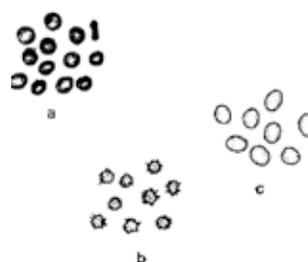
Pequeños discos amarillentos, de 8 μm .

- **Festoneados (b)**

Con bordes espinosos y diámetro reducido, de 5 - 6 μm .

- **Hinchados (c)**

Círculos de poco grosor y diámetro aumentado, de 9 - 10 μm .



- ◆ Para expresar la cantidad de eritrocitos es importante usar un solo método, para lo cual se recomienda usar:

- Una gota de sedimento urinario con pipeta Pasteur calibrada (50 gotas por cada mL).
- Un cubreobjetos de 20 x 20 mm.
- Examinar con el microscopio usando el objetivo de 40x.

- ◆ La lectura e informe teniendo en consideración lo anterior será el siguiente:

- **De 0 - 10 eritrocitos por campo = Escasos eritrocitos.**

- **De 10 - 30 eritrocitos por campo = Cantidad moderada de eritrocitos.**

- **Más de 30 eritrocitos por campo = Abundantes eritrocitos.**

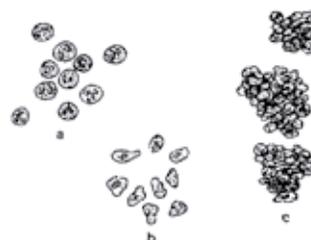


b. Glóbulos blancos o leucocitos

La presencia de abundantes leucocitos, especialmente en racimos, significa infección de los conductos urinarios.

Se pueden hallar leucocitos de las siguientes formas:

- ◆ **Intactos:** discos claros y granulosos de 10 - 15 μm . Los núcleos se pueden ver (a).
- ◆ **Degenerados:** deformes, encogidos, menos granulosos (b).
- ◆ **Pus:** leucocitos degenerados numerosos, en racimos (c).



Para expresar la cantidad de leucocitos se emplea el mismo método usado para los eritrocitos.

La lectura e informe respecto a la cantidad de leucocitos es el siguiente:

- ◆ De 0 - 10 leucocitos por campo = escasos leucocitos.
- ◆ De 10 - 20 leucocitos por campo = cantidad moderada de leucocitos.
- ◆ De 20 - 30 leucocitos por campo = abundantes leucocitos.
- ◆ Racimos de más de 20 leucocitos degenerados = se observan numerosos leucocitos en racimos.
- ◆ Racimos de leucocitos y numerosos leucocitos degenerados = campo lleno de leucocitos.



c. *Levaduras*

No se deben confundir con eritrocitos.

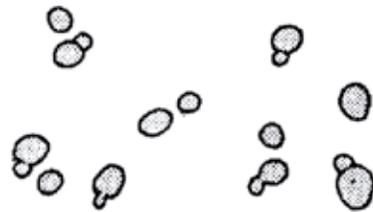
Se observan ocasionalmente en muestras de orina que contienen glucosa.

Se debe verificar que la orina sea fresca (antes de que transcurran 2 horas desde la micción).

Se observan con las siguientes características:

Tamaño: 5 - 12 μm .

Forma: cuerpos redondeados de varios tamaños, a veces se les observa en gemación (brote).



d. *Trichomonas*

De gran movilidad en la orina fresca.

Se observa:

Tamaño: 15 μm .

Forma: redonda, globular.

Membrana ondulante: lateral.

Flagelos: cuatro flagelos.



e. *Espermatozoides*

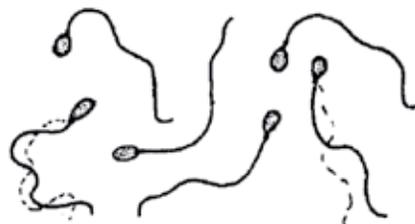
Se encuentran ocasionalmente en la orina de los hombres.

Se observa:

Cabeza: muy pequeña, 5 μm

Flagelo: largo y flexible, 50 μm .

Movilidad: móviles en la orina muy fresca.



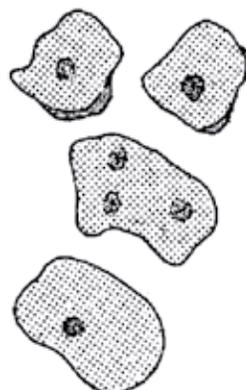
f. Células epiteliales

CÉLULAS EPITELIALES ESCAMOSAS

Proviene de la descamación, es decir, del desprendimiento de células del epitelio de los conductos y órganos urinarios.

Se originan en el uréter o en la vejiga.

Son grandes y de formas rectangulares.



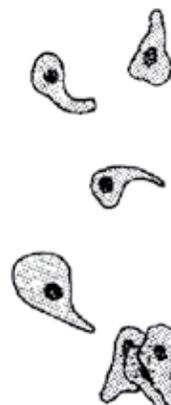
CÉLULAS DE LA VEJIGA URINARIA

Voluminosas, de forma de rombo y su núcleo se observa nítido.



CÉLULAS DE LA PELVIS RENAL

De tamaño mediano, granulosas, terminan en una prolongación que asemeja una cola corta.

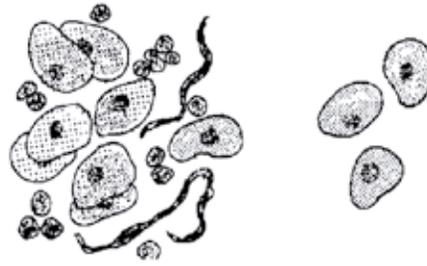


CÉLULAS DEL URÉTER Y PELVIS RENAL

Son ovals, de tamaño mediano, con núcleos visibles.

Si son abundantes y se encuentran junto con leucocitos y filamentos, es probable que provengan del uréter.

Si son escasas y no se acompañan de leucocitos pueden ser células de la pelvis renal.



CÉLULAS RENALES

Son pequeñas, granulosas y de núcleo visible.

Casi siempre se encuentran junto con las proteínas urinarias.



g. Cilindros

Tienen aspecto de cilindro y son alargados.

Cruzan casi todo el campo microscópico cuando se examinan con el objetivo de 40x.

Se forman durante las enfermedades de los túbulos renales, que se pueden llenar de sangre, de otras células y de depósitos de sustancias químicas.

Existen diferentes tipos de cilindros:

CILINDROS HIALINOS

Se encuentran en individuos sanos después de esfuerzos musculares intensos.

Son transparentes y refractan la luz.

Sus extremos son redondeados o delgados.



CILINDROS GRANULOSOS

Proviene de células epiteliales degeneradas de los túbulos renales. Estos cilindros son cortos, llenos de gránulos voluminosos, de color amarillo y extremos redondeados.



CILINDROS DE GRÁNULOS FINOS

Sus gránulos son más pequeños y no llenan completamente el cilindro. No se debe confundir con los hialinos (H) que se hallan parcialmente cubiertos por cristales amorfos de fosfatos.



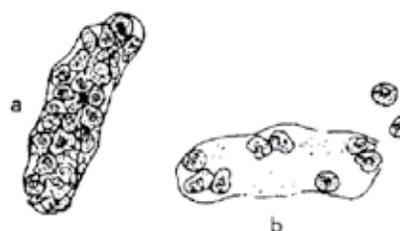
CILINDROS SANGUÍNEOS

Los cilindros se encuentran llenos de eritrocitos más o menos degenerados, de color castaño.



CILINDROS DE PUS (LEUCOCITARIO)

Los verdaderos cilindros de pus se llenan completamente de leucocitos (a). Los cilindros hialinos pueden contener algunos leucocitos (b).



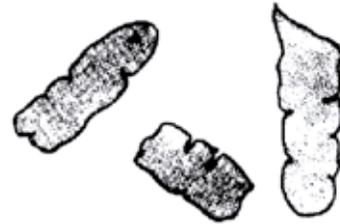
CILINDROS DE CÉLULAS EPITELIALES

Los cilindros se encuentran llenos de células epiteliales de color amarillo pálido.



CILINDROS GRASOSOS (GRASOS)

Son raros de encontrar, se observan en caso de enfermedades renales graves. De color amarillento, bordes festoneados, extremos redondeados.



¡ATENCIÓN!

- ◆ No se debe confundir con cilindros :
 - Las acumulaciones de cristales de fosfatos, que son pequeñas y delimitadas.
 - Las acumulaciones de moco translúcido, cuyos extremos se adelgazan hasta tomar forma de hilos.

h. Cristales

Los cristales pueden tener las siguientes formas:

- ◆ Formas geométricas uniformes (A).
- ◆ Formas amorfas, que consisten en acumulaciones de gránulos pequeños sin forma definida (B).



SEDIMENTOS NORMALES DE CRISTALES

OXALATO CÁLCICO (EN ORINA ÁCIDA)

A semejan sobres de correo o de maní.

Tamaño: 10 - 20 μm o 50 μm .



ÁCIDO ÚRICO (EN ORINA ÁCIDA)

A semejan formas de cuadros, rombos, cubos o "rosas".

Tamaño: 30 - 150 μm .

Color: amarillo o rojo pardo.

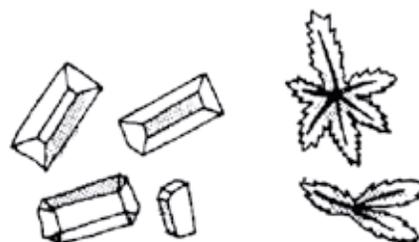


FOSFATOS TRIPLES (EN ORINA NEUTRA O ALCALINA)

De forma rectangular o semejante a hojas de helecho o estrella.

Tamaño: 30 - 150 μm .

Color: incoloro, refractan la luz.

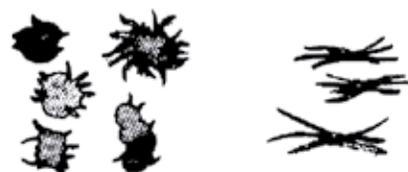


URATOS (EN ORINA ALCALINA)

A semejan cactus o grupos de agujas, frecuentemente se encuentran junto con los fosfatos.

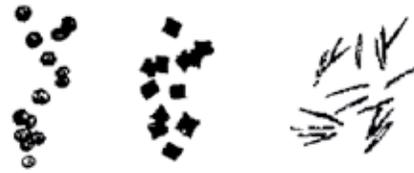
Tamaño: 20 μm .

Color: amarillo, refractan la luz.



BILIRRUBINA

- ◆ Es muy raro de hallarla
- ◆ **Forma:** muy pequeños, de forma cuadrada, esféricos o en agujas.
- ◆ **Tamaño:** 5 μm .
- ◆ **Color:** castaño.



SULFONAMIDAS (EN ORINA NEUTRA O ÁCIDA)

- ◆ Se observa en pacientes que están siendo tratados con sulfonamidas. Se debe notificar la existencia de estos cristales, ya que pueden causar lesiones renales.
- ◆ **Forma:** de formas variadas (ruedas o agujas).

CRISTALES MENOS FRECUENTES

Fosfato cálcico (en orina neutra o alcalina)

De forma estrellada.

Tamaño: 30 - 40 μm .

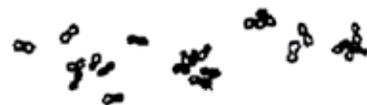
Color: incoloro.

**Carbonato cálcico (en orina neutra o alcalina)**

Agrupados en pares, asemejan granos de maíz

Tamaño: pequeños.

Color: incoloro.

**Sulfato cálcico (en orina ácida)**

Forma de prismas alargados separados o formando haces.

Tamaño: 50 - 100 μm .



CRISTALES AMORFOS

FOSFATOS AMORFOS (EN ORINA ALCALINA)

Gránulos pequeños, dispersos. Blanquecinos.



i. Sustancias extrañas

◆ Sustancias extrañas que se encuentran en el sedimento cuando:

- Se usan recipientes o portaobjetos sucios.
- Las muestras de orina se dejan expuestas al aire.

◆ Entre dichas sustancias tenemos:

- Gotas pequeñas de aceite (refractan la luz) (a).
- Gránulos de almidón (se tiñen de negro azulado) (b).
- Granos de polen (c).
- Pelos (d).
- Fibras de algodón (e).
- Burbujas (f).



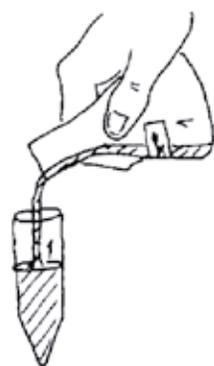
MATERIALES

- Una centrífuga eléctrica o manual.
- Un tubo cónico de 15 mL para centrifugación.
- Una pipeta Pasteur, calibrada para que suministre 50 gotas por cada mL.
- Un portaobjetos y cubreobjetos 20 x 20 mm.



PROCEDIMIENTO

1. Mezclar la orina.



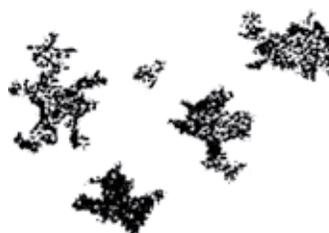
2. Verter la orina en un tubo para centrifugar hasta llenar 3/4 partes de su capacidad.

3. Centrifugar a 2 500 RPM (revoluciones por minuto) durante 5 minutos.

**URATOS AMORFOS (EN ORINA ÁCIDA)**

Gránulos muy pequeños, de color amarillento, agrupados en racimos compactos.

En la orina que se ha conservado en el frigorífico se suelen encontrar gruesos precipitados de uratos.



V

OTROS SEDIMENTOS DE CRISTALES

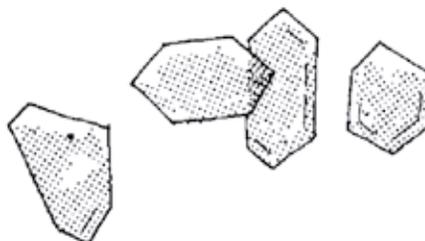
CISTINA (EN ORINA ÁCIDA)

Se encuentran en la cistinuria (enfermedad hereditaria).

Forma: laminillas hexagonales.

Tamaño: 30 - 60 μm .

Color: incoloras.

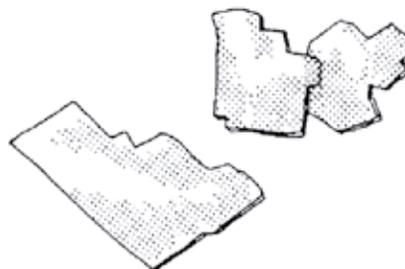


COLESTEROL (EN ORINA ÁCIDA)

Forma: laminillas cuadradas con escotaduras en un lado.

Tamaño: 50 - 100 μm .

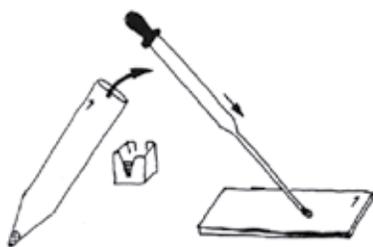
Color: incoloras.



4. Verter el sobrenadante de la orina centrifugada, invirtiendo el tubo en un vaso para análisis (no sacudir el tubo).



5. Agitar el tubo para que el sedimento forme nuevamente suspensión. Extraer algunas gotas de esta suspensión con una pipeta.



6. Colocar una gota de la suspensión en un portaobjetos y cubrirlo con el cubreobjetos. No olvidar numerar el portaobjetos con el número que contiene la muestra.

7. Examinar inmediatamente con el microscopio:

- Primero, examinar con el objetivo 10x.
- Luego, examinar con el objetivo 40x.
- No usar filtro de color.

V

GRAVEDAD ESPECÍFICA Y PH DE LA ORINA

MEDICIÓN DE LA GRAVEDAD ESPECÍFICA

PRINCIPIOS GENERALES

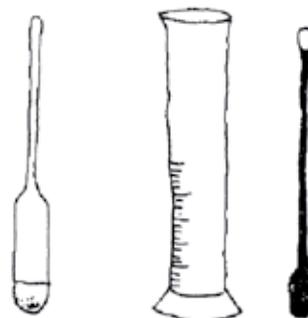
- ◆ La gravedad específica de la orina varía de acuerdo con el funcionamiento de los riñones, correspondiendo:
 - Gravedad específica elevada = Orina concentrada.
 - Gravedad específica baja = Orina diluida.

- ◆ **La gravedad específica** se mide por medio de un **urinómetro** calibrado de 1 000 a 1 060.

- ◆ La temperatura de la orina también se debe medir para calcular correctamente la gravedad específica.

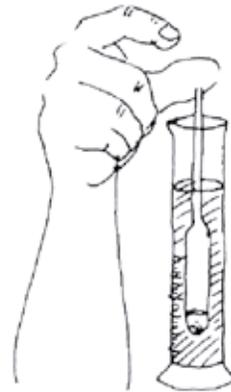
MATERIALES

- Un urinómetro.
- Un termómetro de 0 - 50 °C.
- Una probeta de 50 mL
- Muestra de orina. Se necesita por lo menos 40 mL

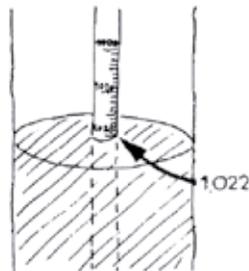


MÉTODO

1. Verter 40 mL de orina en la probeta.
2. Descender suavemente el urinómetro en la orina, y soltarlo.



3. Esperar a que el urinómetro se detenga. El urinómetro no debe tocar paredes ni el fondo de la probeta.



4. Leer la gravedad específica, que indica la escala del urinómetro en la superficie de la orina, es decir, el punto inferior del menisco.
5. Retirar el urinómetro. Medir la temperatura de la orina inmediatamente con el termómetro.

LECTURA Y RESULTADOS

- ◆ Tomar nota de:
 - La temperatura medida en la orina.
 - La temperatura a que se encuentra calibrado el urinómetro. Esta es habitualmente 20 °C.

- ◆ A la gravedad específica medida:
 - Agregar 0,001 por cada 3 °C que mida la temperatura de la orina por arriba de la temperatura de calibración del urinómetro.
 - Restar 0,001 por cada 3 °C que tenga la orina por **debajo** de la temperatura de calibración del urinómetro.

Ejemplo

- La temperatura de la orina es de 26 °C.
- La temperatura del urinómetro calibrado es de 20 °C.
- La gravedad específica medida es de 1,021.

Entonces:

La temperatura de la orina es 6 °C mayor que la temperatura de calibración del urinómetro.

Agregar a la gravedad específica:

$$6/3 \times 0,001 = 2 \times 0,001 = 0,002$$

La gravedad específica real es:

$$1,021 + 0,002 = 1,023$$

- ◆ Los resultados son:
 - **Gravedad específica normal**
1,020 (variación normal: 1,010 - 1,025).
 - **Gravedad específica baja**
Menos de 1,010 (en casos de trastornos renales, endocrinos. Carece de importancia si el paciente ha ingerido una gran cantidad de líquidos antes de la prueba).
 - **Gravedad específica elevada**
Superior a 1,025 (en casos de pérdidas de glucosa y proteínas por la orina).



MEDICIÓN DEL pH

PRINCIPIOS GENERALES

- ♦ La orina normal tiene una reacción ligeramente ácida, con un pH de 6,0 aproximadamente.
- ♦ En ciertas enfermedades el pH de la orina puede aumentar o disminuir.
- ♦ Una manera práctica y rápida de determinar el pH es sumergir en la orina piezas de papel indicador de colores. El color cambia según el pH. Este papel indicador se compara con un cuadro estandarizado testigo en el que figuran las cifras correspondientes.

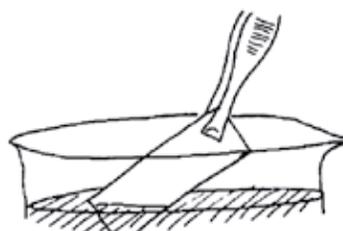
MATERIALES

- Muestra de orina fresca (recién eliminada).
- Una pinza.
- Papeles indicadores de tipo universal, para medir pH en intervalos de 1 a 10.
- Papeles indicadores de graduación limitada para intervalos de 5,0 - 7,0 y 6,0 - 8,0.

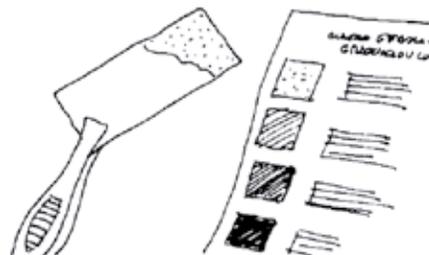


MÉTODO

1. Tomar con la pinza la tira de papel indicador de tipo universal, el cual se sumerge 0,5 cm en la orina y se observa su color.



2. Comparar el color que se ha producido con los que figuran en el cuadro estandarizado. Vea la cifra del pH en la unidad cuyo color corresponda más estrechamente al de la tira de papel.



3. Según el resultado obtenido repetir el paso 1 con una tira de papel indicador de graduación limitada.

Ejemplo:

- Para pH 6: usar el papel indicador con intervalo de 5,0 - 7,0
- Para pH 8: usar el papel indicador con intervalo de 6,0 - 8,0.



4. Comparar el color producido con los que figuren en el cuadro estandarizado del papel indicador de graduación limitada.

RESULTADOS

- ◆ **pH normal**
Aproximadamente 6,0 (límite del intervalo normal, de 5,0 a 7,0 durante el día).
- ◆ **pH ácido**
4,5 - 5,5 (casos de diabetes, fatiga muscular, acidosis, etc.).
- ◆ **pH alcalino**
7,8 - 8,0 (en casos de infección urinaria, alimentación vegetariana, etc.).



USO DE TABLETAS Y TIRAS REACTIVAS EN LOS EXÁMENES DE ORINA

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Son productos comerciales, y su presentación puede ser:
 - Tiras de papel reactivas que se sumergen en la orina.
 - Tabletas sobre las cuales se depositan gotas de orina.
 - Tabletas que se ponen en contacto con la orina.

- ◆ Si el resultado es positivo, hay un cambio de color en las tiras y las tabletas.

- ◆ **Las ventajas de este método son:**
 - Fáciles y rápidos de usar.
 - No requiere de utensilios de vidrio, balanzas o sustancias químicas.

- ◆ **Las desventajas de este método son:**
 - El costo de estos reactivos es alto.
 - En ciertos casos son poco estables y no reaccionan.

¡ATENCIÓN!

- ◆ **Es necesario :**
 - Seguir las instrucciones del fabricante.
 - Conservar estos productos en los lugares secos.
 - Conservar tapado el frasco que contiene estos productos inmediatamente después de usarlos.

- ◆ Cuando el resultado es positivo hay un cambio de color, dependiendo del reactivo impregnado en la tira o tableta.
- ◆ En todos los casos, sea con tiras o tabletas, se deben poner en contacto con la orina, sumergiendo las tiras o colocando gotas en las tabletas.

TABLETAS Y TIRAS REACTIVAS

a. *Detección de glucosa*

- ◆ Las tiras están impregnadas con glucosa oxidasa y reactivos de color.
- ◆ Si el resultado es positivo se forma en el papel un color violeta azulado.
- ◆ Se puede usar para confirmar un resultado débilmente positivo que se haya obtenido por medio de métodos que no sean específicos.

b. *Detección de proteínas*

- ◆ Las tiras están impregnadas con azul de tetrabromofenol.
- ◆ Si el resultado es positivo se forma en el papel un color verde amarillento (huellas de proteínas) o verde azulado (fuertemente positivo).
- ◆ Algunos son demasiado sensibles y pueden dar resultados débilmente positivos que son falsos.

c. *Detección de sustancias cetónicas*

- ◆ Las tiras están impregnadas de pentacianonitrosilferrato (2-) sódico o nitroprusiato sódico.
- ◆ En caso de usar tabletas, esta se coloca en un recipiente y se agrega una gota de orina en la tableta. Si el resultado es positivo, se forma un color violeta en menos de 30 segundos.



d. Detección de pigmentos biliares

- ◆ Las tiras están impregnadas a base de 2-4 dicloroanilina diazotada.
- ◆ Si el resultado es positivo a la presencia de bilirrubina, adquiere un color café.

e. Detección de urobilinógeno

- ◆ Las tiras están impregnadas del p-dimetilaminobenzaldehído.
- ◆ El resultado positivo produce un color rojo.

PRUEBA DEL EMBARAZO

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La prueba del embarazo se basa en la presencia de **gonadotrofina coriónica humana (HCG)** en la orina de la mujer embarazada.
- ◆ Actualmente se **dispone de preparados comerciales** para detectar la **HCG urinaria**, que resultan más rápidos y económicos.
- ◆ **Con este tipo de prueba** en general, **los resultados positivos** se observan a partir de 15 días después de que ha existido retraso en el período menstrual.
- ◆ Las muestras de orina se deben obtener en un frasco limpio, bien enjuagado. Si quedan huellas de un detergente, puede causar un resultado falso.



¡ATENCIÓN!

- ◆ La prueba debe realizarse sin demora, si esto no es posible, conservar la orina en la refirgeradora

MATERIALES

- Reactivo comercial para llevar a cabo la prueba.
- Un tubo de ensayo o un portaobjetos.

MÉTODOS

MÉTODO DEL TUBO DE ENSAYO

1. Seguir las instrucciones del fabricante.

2. Resultados

- **Resultado positivo**
Se observa un anillo uniforme de color rojo pardo, en el fondo del tubo.
- **Resultado negativo**
No se forma anillo. El líquido continúa siendo homogéneo



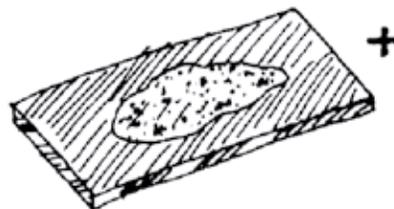
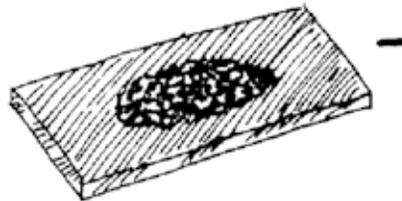
V

MÉTODO DEL PORTAOBJETOS

1. Uno de los reactivos usados se compone principalmente de una suspensión de partículas de látex.
2. Seguir las instrucciones del fabricante.

3. Resultados

- a. **Resultado negativo**
Las partículas de látex se aglutinan sobre el portaobjetos.
- b. **Resultado positivo**
No se produce aglutinación (lo impide la HCG que se encuentra en la orina de la mujer embarazada).



PARASITOLOGÍA Y MICOLOGÍA

OBTENCIÓN DE HECES.....	243	EXAMEN DE GOTA GRUESA Y FROTIS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>Plasmodium</i>.....	281
Principios generales	243	Principios generales	281
RECIPIENTES PARA HECES	245	Coloración de la gota gruesa y frotis	282
Materiales	245	Examen microscópico del <i>Plasmodium</i>	286
Método de obtención	246	Principios generales	286
PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO EN PARASITOLOGÍA.....	249	Frotis.....	288
GUÍA DE IDENTIFICACIÓN	249	Gota gruesa.....	290
HELMINTOS ADULTOS QUE SE ENCUENTRAN EN HECES.....	250	Determinación de la densidad parasitaria	293
Helmintos redondos frecuentes.....	250	OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS	297
Tenias o helmintos planos segmentados	251	Muestra de cuerpos fluidos (linfa)	297
Otros helmintos	254	Muestra de frotis.....	298
HUEVOS Y LARVAS DE PARASITOS INTESTINALES	255	Muestra de tejido (biopsia)	300
Principios generales	255	EXAMEN DIRECTO Y CULTIVO EN EL DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA.....	302
Características de los huevos	256	Principios generales	302
AMEBAS, FLAGELADOS Y CILIADOS: FORMAS MÓVILES.....	262	Procesamiento e identificación del parásito.....	303
Principios generales	262	EXAMEN QUÍMICO PARA ENCONTRAR SANGRE OCULTA EN LAS HECES.....	310
Amebas	262	Principios generales	310
Flagelados	264	Materiales y reactivos.....	310
Ciliados.....	265	Método.....	310
AMEBAS, FLAGELADOS Y CILIADOS: FORMAS QUIÍSTICAS	266	Precauciones en el laboratorio	312
Principios generales	266	Precauciones para el paciente	312
Quiestes de amebas.....	267	OBTENCIÓN DE ESCAMAS	313
Quiestes de flagelados y ciliados	268	Principios generales	313
EXAMEN DIRECTO DE HECES.....	269	EXAMEN DIRECTO CON HIDROXIDO DE POTASIO AL 10%.....	313
Principios generales	269	Materiales	314
EXAMEN DE TINCIÓN CON YODO Y CON SOLUCIÓN SALINA O CLORURO DE SODIO.....	270	Procedimientos.....	314
Materiales	270	Lectura.....	314
Método.....	270	Control de calidad interna.....	315
EXAMEN DE HUEVOS DE OXIUROS MÉTODO DE LA CINTA ADHESIVA.....	273	CULTIVO Y TIPIFICACIÓN DE HONGOS DERMATOFITOS	315
Principios generales	273	Materiales	315
Materiales	273	Procedimiento.....	316
Método.....	273	Lectura.....	316
MÉTODO DE CONCENTRACIÓN DE PARÁSITOS.....	274	Control de calidad interna.....	319
Principios generales	274	MEDIOS DE CULTIVO.....	319
Método de flotación de Faust	274	Agar Sabouraud glucosado	319
Método de sedimentación de Ritchie	276	Agar papa glucosado.....	320
EXAMEN DIRECTO DE <i>Trichomonas</i> EN SECRECIONES GENITOURINARIAS.....	279		
Principios generales	279		
Materiales	279		
Método.....	279		

OBTENCIÓN DE HECES

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Cada muestra debe contener, por lo menos 4 mL (4 cm³). Esta es necesaria para facilitar la detección de los parásitos cuando se encuentran poco concentrados.



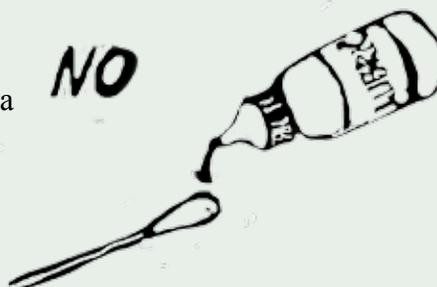
¡ATENCIÓN!

- ◆ **Nunca** dejar las muestras de heces expuestas al aire en recipiente sin tapa.
- ◆ **Nunca** dejar muestras para examinarlas al terminar la mañana (2 o 3 horas después).
- ◆ **Nunca** aceptar muestras de heces mezcladas con orina.



 ¡ATENCIÓN!

- ◆ **Nunca** dejar lubricantes para humedecer el hisopo rectal.



- ◆ Usar un recipiente estéril si se trata de un examen bacteriológico.

- ◆ Para exámenes bacteriológicos **no se debe refrigerar la muestra.**



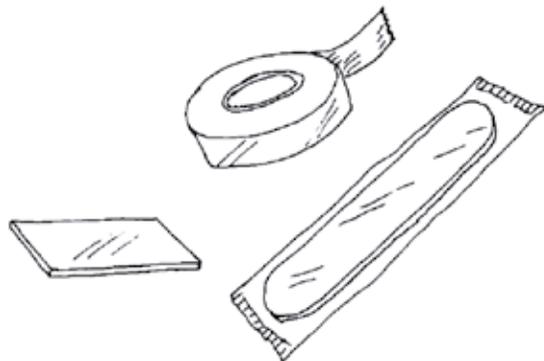
RECIPIENTES PARA HECES

- ◆ Los recipientes apropiados son:
 - Una caja de cartón encerado. Un envase de material plástico.
 - Un frasco de vidrio transparente, de boca ancha con o sin una cucharilla fija en la tapa.

- ◆ Para el examen **bacteriológico** el recipiente debe estar estéril.

MATERIALES

- Recipientes indicados según el examen solicitado.
 - Hisopo rectal estéril si el examen solicitado es bacteriológico y el paciente tiene problemas en la recolección, o se trata de un niño pequeño.
-
- ◆ Para la obtención de huevos de oxiuros se necesita:
 - Una cinta adhesiva transparente de 12 cm de largo por 1 cm de ancho.
 - Un bajalengua.
 - Una lámina portaobjetos.



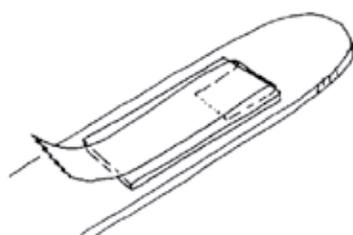
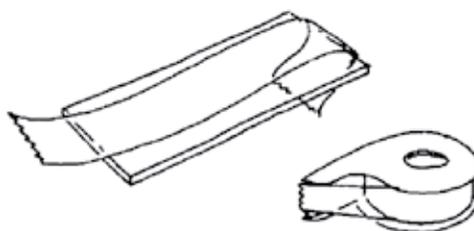
MÉTODO DE OBTENCIÓN

a. Examen parasitológico

- ◆ Usar un recipiente limpio para obtener la muestra.

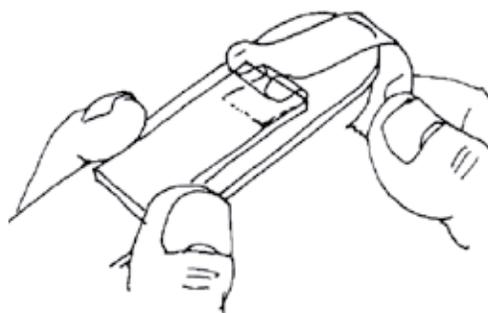
OBTENCIÓN DE HUEVOS DE OXIUROS (TEST DE GRAHAM)

1. Pegar la cinta adhesiva en la lámina portaobjeto, dejando que sobresalgan ambos extremos de la cinta.

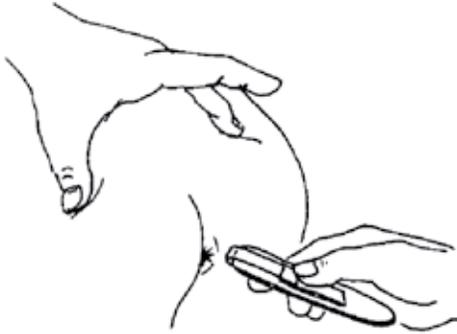
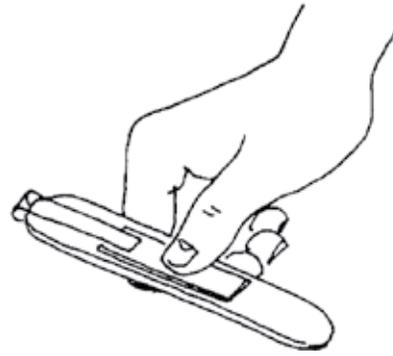


2. Colocar el lado plano del bajalengua debajo del portaobjeto.

3. Separar la cinta adhesiva del portaobjeto con suavidad y doblarla sobre el extremo del mango del bajalengua, de tal modo que la parte pegante quede hacia fuera.

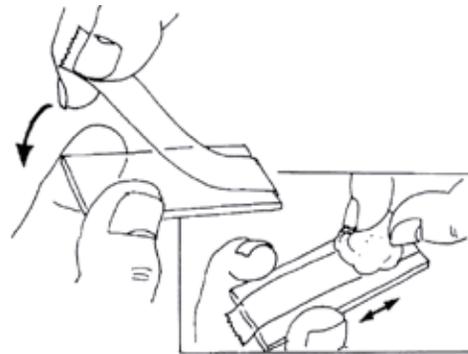


4. Sostener el extremo formado (bajalengua y la cinta adhesiva) con la mano derecha, presione firmemente el portaobjeto contra el mango del bajalengua.



5. Separar con la mano izquierda las nalgas del paciente. Aplicar presionando el extremo del bajalengua cubierto con la cinta adhesiva, en varios sitios de la piel que rodea al ano.

6. Colocar de nuevo la cinta adhesiva sobre el portaobjeto, con el lado adhesivo hacia abajo. Para estar seguro que la cinta se adhiere uniformemente y no se forme burbujas de aire, presionar el portaobjeto con un trozo de algodón.



VI

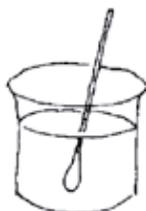
b. Examen bacteriológico

- ◆ Usar un recipiente estéril para obtener la muestra.



- ◆ Debe recolectarse antes de la administración de cualquier antibiótico.

- ◆ Se prefiere una muestra más que un hisopado rectal.

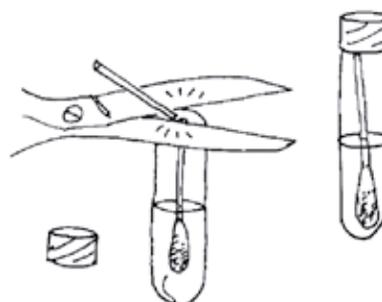


- ◆ **En el caso de niños u otros pacientes que tengan problemas en la recolección de muestra**, obtenerla directamente, introduciendo en el recto un hisopo previamente embebido en el espesor del medio de transporte que se va usar y luego se introduce en el recto.

Una vez que está dentro del recto (alrededor de 3 cm), aplicar un movimiento de rotación amplio al hisopo para arrastrar mucosidad de la pared de la ampolla rectal y luego un movimiento circular pequeño para arrastrar deposición.

MÉTODO

1. Colocar el hisopo con la muestra en un tubo estéril o en el tercio superior del tubo con medio de transporte.



2. Cortar la porción sobrante del palo del hisopo y ajustar fuertemente la tapa del tubo.

PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO EN PARASITOLOGÍA

GUÍA DE IDENTIFICACIÓN

- ◆ La parasitología médica es el estudio de los parásitos que causan enfermedades al ser humano.
- ◆ En el laboratorio se pueden llevar a cabo exámenes de:

- **Helmintos (gusanos)**
Que se observan a simple vista.



- **Huevos o larvas de helmintos**
Que son visibles por medio del microscopio.



- **Protozoarios (organismos unicelulares)**

Formas vegetativas
Presentan movilidad.

Formas quísticas
Carecen de movilidad.



HELMINTOS ADULTOS QUE SE ENCUENTRAN EN HECES

- ◆ Los helmintos adultos, que son llevados al laboratorio para ser identificados, se pueden haber recogido de las heces, la ropa personal o de la cama, o durante una operación quirúrgica.

- ◆ Se debe anotar:
 - Su longitud.
 - Su forma.

HELMINTOS REDONDOS FRECUENTES

a. *Áscaris*

Helmintos redondos grandes.

Color: rosáceo.

Grosor: 0,3 - 0,5 cm.

Longitud: macho: 15 cm (con cola en forma de bucle).

hembra: 20 - 25 cm (con cola recta).



b. *Oxiuros*

Frecuente en heces de niños. También se pueden hallar en los pliegues de la piel que rodea el ano.

Helmintos redondos **pequeños**.

Color: blanco.

Longitud: macho: 0,5 cm.

hembra: 1 cm (de cola puntiaguda).



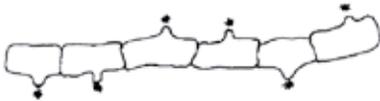
TENIAS O HELMINTOS PLANOS SEGMENTADOS

a. *Tenias*

Color: marfil o azul pálido.

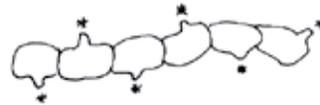
Longitud: 3 - 10 m (para el examen por lo general llegan los segmentos maduros separados, de longitud variable).

b. *Tenias frecuentes*

Tenía de la res (<i>Taenia saginata</i>)	
<p>Segmentos rectangulares separados.</p> <p>Salen por el ano acompañados o no de heces.</p> <p>Poros colocados alterna e irregularmente.</p>	
<p>Segmentos color marfil, de 1-2 cm.</p> <p>Con veinte ramificaciones uterinas aproximadamente.</p>	
<p>Escólex o cabeza : cuatro ventosas de 2 mm de diámetro.</p>	

Tenia del cerdo (*Taenia solium*)

Pequeñas cadenas de 3-4 segmentos rectangulares. Salen por el ano casi siempre acompañados de heces.



Poros colocados generalmente alterna y uniformemente.



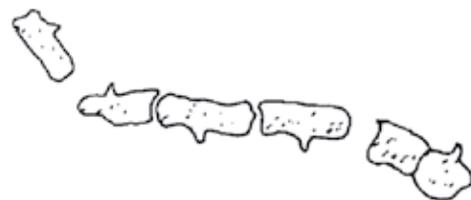
Escólex o cabeza :

Dos coronas de gancho y una ventosa de 1mm de diámetro.

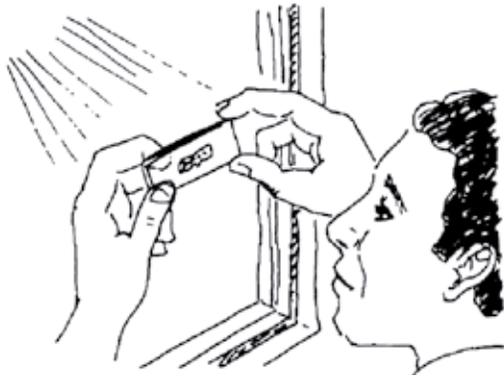
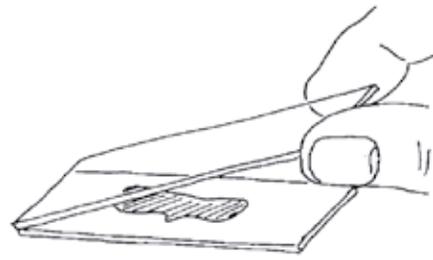


c. Examen de tenias

- i. Examinar una cadena de segmentos para observar el orden de los poros laterales



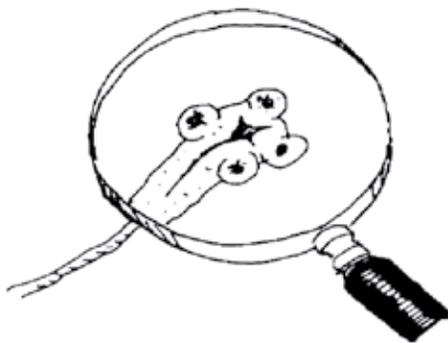
2. Examinar un solo segmento aplanado suavemente entre dos portaobjetos.



3. Sostener el portaobjetos contra la luz, observar y contar las ramificaciones uterinas a simple vista.

4. Para examinar el escólex o cabeza, seguir los siguientes pasos:

- Colocar todo el helminto en una placa Petri o en un plato lleno de agua.
- Por medio de una pinza trasladar el helminto poco a poco a otro plato, desenrollarlo comenzando por el extremo más grueso.



- Si al final de la **porción más delgada** (cuello), se observa un ensanchamiento del tamaño de un alfiler (escólex o cabeza), examinar con una lupa o microscopio.

OTROS HELMINTOS

a. *Ancylostoma*

Pequeño helminto redondo, parecido a un oxiuro (semejante a un trozo de hilo).

La cabeza se examina con el microscopio.

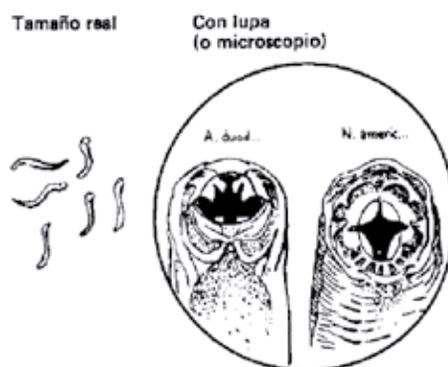
Longitud: 1 - 1,5 cm.

Color: blanco, o rojo si contiene sangre.



a. *Ancylostoma duodenale*

Presenta una cápsula bucal que muestra dos dientes fusionados.



b. *Necátor americanus*

En lugar de dientes, tiene un par de placas semilunares en las superficies ventral y dorsal de la cápsula bucal.

b. *Tricocéfalo (Trichuris trichiura)*

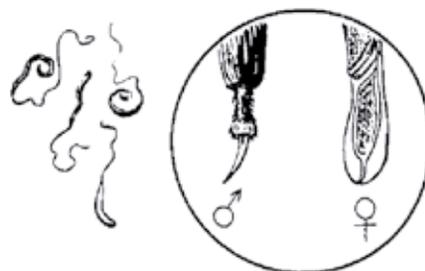
Semejante a un pequeño látigo.

La tercera parte de su cuerpo es gruesa y el resto es filiforme.

Se encuentra en la pared del recto o en el ciego.

Longitud: 3 - 5 cm.

Color: blanco.



HUEVOS Y LARVAS DE PARASITOS INTESTINALES

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Los huevos de parásitos intestinales se identifican por su:
 - Tamaño.
 - Envoltura.
 - Forma.
 - Contenido.

- ◆ El tamaño de los huevos se puede determinar adaptando una regla micrométrica al ocular del microscopio.

- ◆ Entre las estructuras que se pueden confundir con huevos de parásitos tenemos:

- ◆ Gránulos de almidón de origen vegetal que son residuos de alimentos, como la papa, la yuca, etc. (a).

- Fibras de carne digerida (b).
- Jabones (c).
- Burbujas y gotas de grasa (d).
- Pelos vegetales (e).
- Granos de polen y esporas de Hongos (f).



CARACTERÍSTICAS DE LOS HUEVOS

a. *Ancylostoma duodenale*

Tamaño: 50 - 60 μm .

Forma: oval, con polos o extremos redondos y ligeramente aplanados.

Envoltura: delgada, se observa como una línea oscura.

Color: las células que hay en su interior son gris pálido.

Contenido: varía según el grado de maduración:

- **Heces frescas:** Se observa 4, 8 o 16 células granulosas.
- **Heces de menos de 12 horas:** masa uniforme compuesta por numerosas células granulosas.
- **Heces de 12 a 48 horas:** el huevo se encuentra lleno por una larva enrollada sobre sí misma, se llama "huevo embrionario".

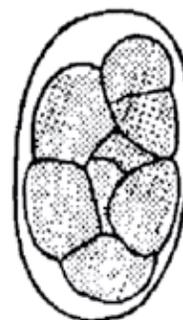


b. *Necátor americanus*

Los huevecillos son semejantes a los de *Ancylostoma*, pero un poco más largos y estrechos de 30 x 40 μm a 64 x 76 μm .

c. *Áscaris lumbricoides*

Existen cuatro tipos de huevos de áscaris:



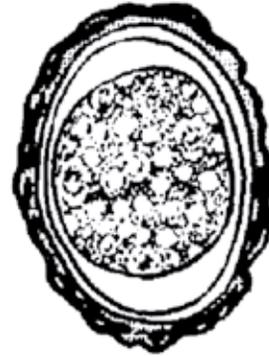
HUEVOS FECUNDADOS, CON ENVOLTURA DOBLE

Tamaño: aproximadamente 70 μm .

Forma: oval o redonda.

- Envoltura: tiene dos envolturas: envoltura externa, que es áspera, parda, cubierta de pequeñas protuberancias (mamelonada).
- Envoltura interna, que es lisa, gruesa, sin color.

Contenido: una sola masa central, redonda y granulosa.



HUEVOS NO FECUNDADOS, CON ENVOLTURA DOBLE

Tamaño: Aproximadamente 80 - 90 μm .

Forma: Alargada e irregular.

Envoltura: Tiene dos envolturas:

- Envoltura externa, que es parda y con protuberancia.
- Envoltura interna, que es muy delgada, a veces se observa dos líneas.

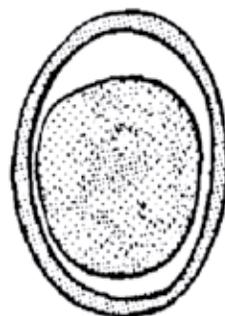
Contenido: Se encuentra lleno de gránulos brillantes, voluminosos y redondos.



HUEVOS SEMIDECORTICADOS, FECUNDADOS

Envoltura: carecen de envoltura externa. Tienen envoltura única lisa, gruesa, de color amarillo pálido.

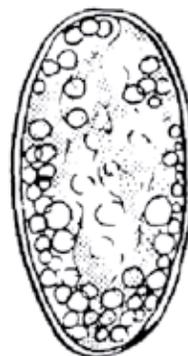
Contenido: una sola masa granulosa central redonda.



HUEVOS SEMIDECORTICADOS, NO FECUNDADOS

Envoltura: una sola envoltura lisa delgada con doble línea.

Contenido: gránulos voluminosos, redondos.



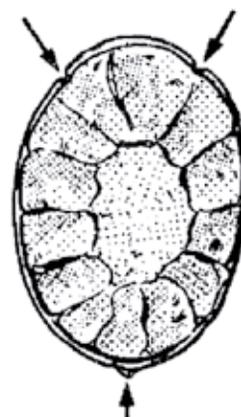
d. *Diphyllobothrium latum*

Tamaño: 70 μm .

Forma: oval, uniforme.

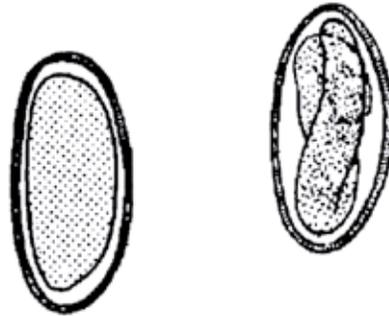
Envoltura: lisa y delgada.

Contenido: masa de células pequeñas ordenadas alrededor de una célula central voluminosa. Color amarillo pálido.



e. *Enterobius vermicularis*

- Tamaño:** 50 - 60 μm .
Forma: oval, plana de un lado y redondeada del otro lado.
Envoltura: lisa y delgada, a veces se observa doble línea.
Contenido: masa granulosa pequeña, oval e irregular. Se puede observar en otros casos el embrión (pequeña larva enrollada).



f. *Fasciola hepática*

- Tamaño:** 130 μm .
Forma: oval con polos redondeados.
Color: amarillo o pardo oscuro.
Envoltura: lisa, con doble línea.
Contenido: una masa de células voluminosas granulosas.

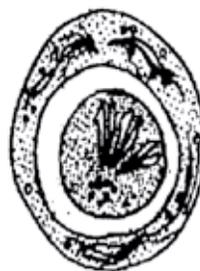
Otras características

Presenta **opérculo (O)** en uno de los polos; en esta región la envoltura es irregular. En el polo contrario hay **engrosamiento (E)** de la envoltura.



g. *Hymenolepis nana*

- Tamaño:** 40 - 45 μm .
Forma: oval o redonda.
Color: gris pálido.
Envoltura: Presenta dos envolturas:
 - La envoltura externa, delgada.
 - La envoltura interna, más gruesa en los polos, con filamentos que salen a partir de estos. Se observa gránulos entre ambas membranas.
Contenido: masa redonda que corresponde al embrión con seis ganchos, dispuestos en forma de abanico y con gránulos en el centro.



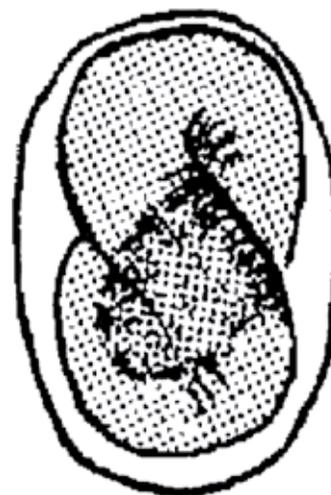
h. *Strongyloides stercoralis*

- LARVAS:** de gran movilidad
- Tamaño:** 200 - 300 μm de longitud y 15 μm de grosor.
- Cola:** delgada.
- Boca:** pequeña.
- Tubo digestivo:** consta de un **esófago (O)** con un ensanchamiento en un extremo y un poro **anal (A)** en el otro extremo.
- Primordio genital (E):** espacio redondo, en la parte media de la larva.



- HUEVOS:** se pueden hallar en heces líquidas.

- Tamaño:** 50 μm .
- Forma:** oval, con polos redondos y ligeramente aplanados.
- Color:** gris pálido, la solución de yodo los tiñe de pardo oscuro.
- Envoltura:** delgada, se observa como una línea oscura.
- Contenido:** una larva gruesa, enrollada una o dos veces, algunas veces en movimiento.



i. *Trichuris trichiura*

- Tamaño:** 50µm
- Forma:** alargada.
- Color:** envoltura anaranjada.
Contenido amarillo.
- Envoltura:** doble, gruesa y lisa.

Otras características

Presenta un tapón redondo y transparente en cada polo.

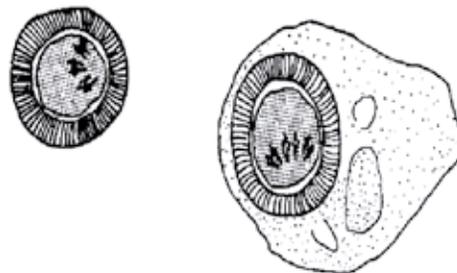
- Contenido:** una masa granulosa uniforme.



j. *Taenia saginata* o *Taenia solium*

Los huevos de estos céstodos son casi idénticos. Son huevos embrionarios.

- Tamaño:** 30 - 40 µm.
- Forma:** redonda.
- Color:** el color de la envoltura es amarillo oscuro. El contenido es amarillo claro o gris.
- Envoltura:** gruesa, lisa y con líneas transversales.
- Contenido:** una masa granulosa con tres pares de ganchos.



- Saco externo:** a veces el huevo se encuentra encerrado en un saco transparente, en cuyo interior flota.

AMEBAS. FLAGELADOS Y CILIADOS: FORMAS MÓVILES

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ **Los protozoarios** son microorganismos compuestos por una sola célula. Su forma móvil se denomina trofozoíto y la forma inmóvil, quiste.

- ◆ **Los trofozoítos** se encuentran principalmente en:

- Heces líquidas.
- Heces con moco.
- Heces blandas, no formadas.



- ◆ **Los trofozoítos** tienen movimiento debido a:

- Movimientos lentos de la célula.
- Presencia de flagelos, que semejan látigos.
- Presencia de cilios, que son pelos numerosos y cortos.

- ◆ **Los trofozoítos** se clasifican en:

- **Amebas:** sin flagelos ni cilios
- **Flagelados:** con flagelos.
- **Ciliados:** con cilios.

AMEBAS

a. *Entamoeba histolytica*

Tamaño: 12 - 35 μm .

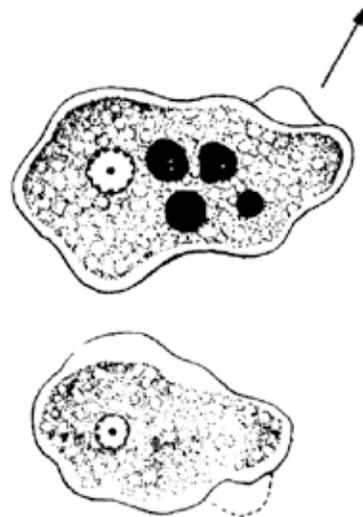
Forma: en movimiento se alarga y cambia de forma; si no está en movimiento es redonda.

Núcleo: al teñido con yodo se observa una membrana uniforme y un cariosoma central, pequeño y oscuro.

Movilidad: se mueve en una sola dirección ayudada por un pseudópodo que le hace avanzar.

Citoplasma: el ectoplasma es transparente y el endoplasma granuloso fino en la que puede haber vacuolas.

La entamoeba patógena presenta vacuolas en cuyo interior se observa glóbulos rojos.



b. *Entamoeba coli*

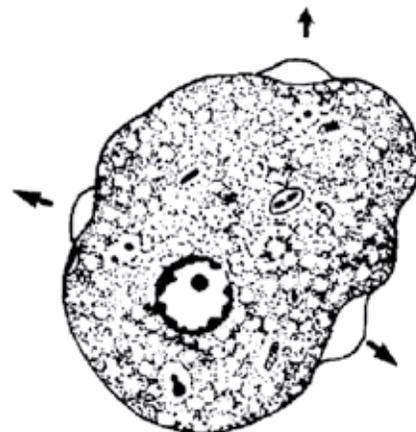
Tamaño: 20 - 40 μm .

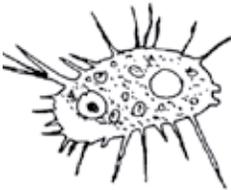
Forma: ovalo alargada.

Núcleo: visible en preparaciones frescas, sin tinción. La membrana es irregular y granulosa; el cariosoma es grande y excéntrico.

Movilidad: frecuentemente inmóvil o se desplaza con lentitud emitiendo pseudópodos.

Citoplasma: es difícil diferenciar el ectoplasma del endoplasma granuloso.

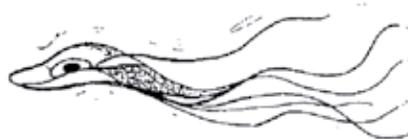
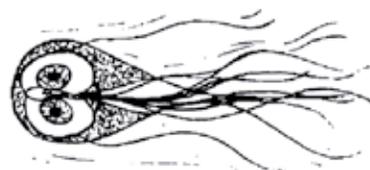


Características	Naegleria sp.	Acanthamoeba
Hábitat natural	Suelos húmedos, fondo de piscinas, aguas termales.	Suelos húmedos, fondo de piscinas, aguas termales.
Patogenicidad	Aguda	Crónica
Vía de invasión	Nasal	Nasal y otras vías
Trofozoítos	Ameboide y flagelar	Ameboide
Núcleo	Cariosoma grande, central. Membrana nuclear gruesa sin cromatina en su pared interna.	Cariosoma grande, central. Membrana nuclear gruesa sin cromatina en su pared interna.
Membrana quística	Con dos o más poros que atraviesan las dos membranas quísticas.	Pared quística muy arrugada, mamelonada con poros
Trofozoítos		

FLAGELADOS

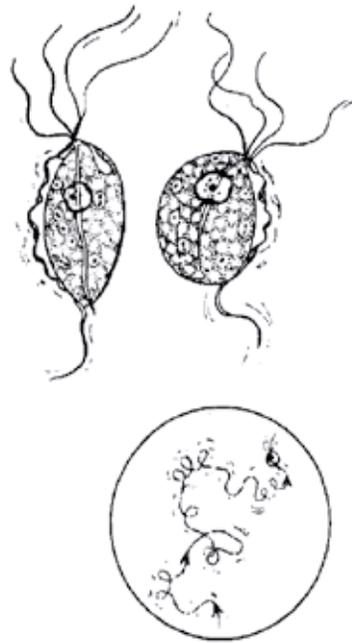
a. *Giardia lamblia*

- Tamaño:** 10 - 18 μm .
- Forma:** vista frontal: piriforme (pera).
vista lateral: forma de cuchara.
- Movilidad:** se desplaza hacia delante con pequeños saltos, o bien dando **giros**.
- Contenido:** presenta dos grandes núcleos ovalados, poco visibles.



b. *Trichomonas hominis*

- Tamaño:** 10 - 15 μm .
- Forma:** oval con dos polos adelgazados.
- Núcleo:** difícil de identificar.
- Flagelos:** generalmente cuatro.
- Membrana ondulante:** solo se encuentra en un lado; es sumamente móvil.
- Movilidad:** gira y parece vibrar.

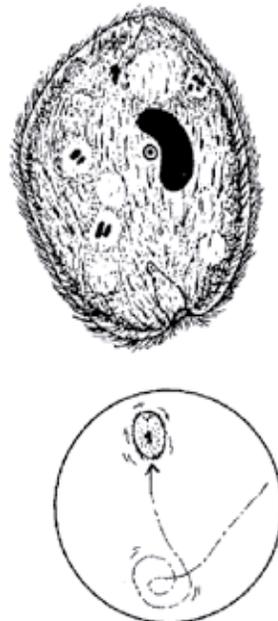


CILIADOS

VI

a. *Balantidium coli*

- Tamaño:** 50 μm . Mayor que un huevo de Ascaris.
- Forma:** oval, con un polo más redondo que el otro.
- Cilios:** cubierto por cilios pequeños, que se mueven.
- Núcleo:** asemeja la forma de un riñón junto a otro núcleo pequeño y redondo.
- "Boca":** un citostoma, especie de boca que se abre y se cierra dando entrada a diversos materiales.
- Movilidad:** se desplaza con rapidez en una dirección, a veces se mueve en círculos.



AMEBAS. FLAGELADOS Y CILIADOS: FORMAS QUÍSTICAS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ **Los quistes** son pequeñas formas inmóviles y resistentes de ciertos protozoarios intestinales. Pueden tener uno o varios núcleos.

- ◆ **Los quistes**, por lo general, se encuentran en heces blandas o formadas. Se pueden observar como glóbulos transparentes de envolturas definidas. En la misma muestra se pueden encontrar quistes de especies diferentes.

- ◆ **Los quistes no deben confundirse con:**
 - **Levaduras**, que son pequeñas (5 - 6 μm), con brote o yema. De color rojo pardo con solución de yodo. En su interior se observa 3 - 6 gránulos en posición excéntrica.

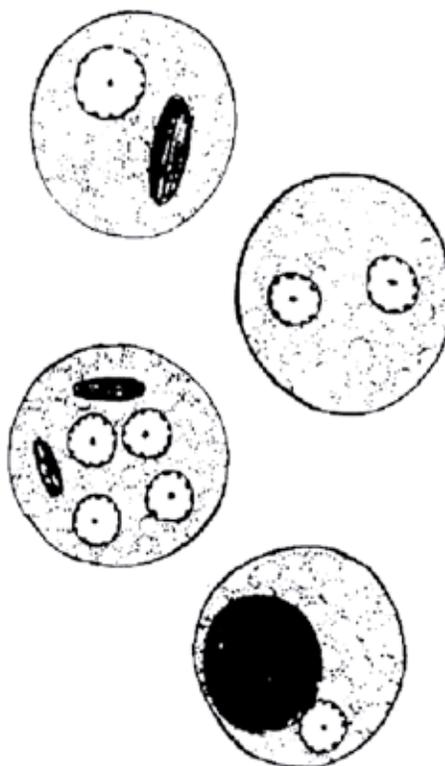
 - **Leucocitos**, 10 - 20 μm , de forma redonda o alargada, cuyo citoplasma contiene vacuolas pequeñas.

 - **Pus**, se observa como una masa de leucocitos degenerados, de color grisáceo y no transparente como el moco.

QUISTES DE AMEBAS

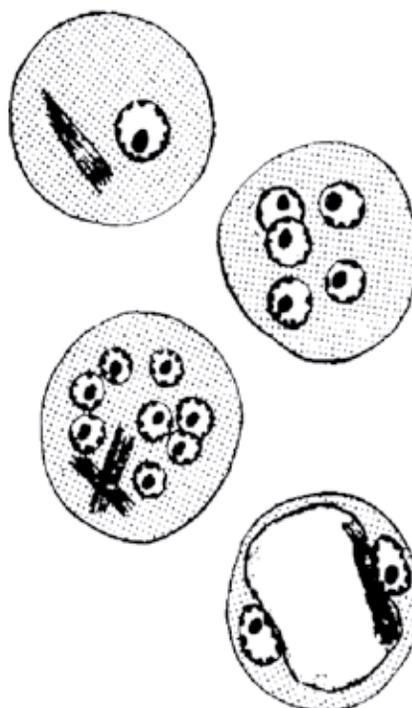
a. *Entamoeba histolytica*

- Tamaño:** 12 - 15 μm .
- Forma:** redonda.
- Núcleos:** 1 - 4, de membrana delgada circular. Con cariosoma pequeño, compacto, semejante a un punto negro.
- Vacuola:** voluminosa, teñida de yodo, es de color pardo rojizo.
- Citoplasma:** granuloso, con yodo se tiñe de gris amarillento.
- Cuerpos cromatoides:** extremos redondeados en forma de "salchicha".



b. *Entamoeba coli*

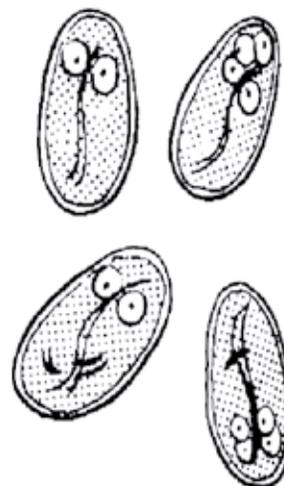
- Tamaño:** 12 - 20 μm .
- Forma:** redonda o ligeramente oval.
- Núcleos:** 1 - 8, de membrana irregular engrosada en algunas partes, no forma un círculo perfecto. Con cariosoma voluminoso excéntrico.
- Vacuola:** algunas veces existe una vacuola voluminosa, que comprime dos núcleos, uno en cada polo.
- Citoplasma:** con yodo se tiñe de amarillo pálido brillante.
- Cuerpos cromatoides:** extremos agudos o mellados, en forma de "cuchillo".



QUISTES DE FLAGELADOS Y CILIADOS

a. *Giardia lamblia*

- Tamaño:** 8 – 12 μm .
- Forma:** oval, con un polo más redondeado que otro. Con gruesa envoltura de doble pared.
- Núcleos:** 2 - 4, de membrana delgada cariosoma pequeño, central.
- Fibrilla:** semeja un cabello; en forma de "S" que recorre el quiste a lo largo, por el centro.
- Citoplasma:** claro, con yodo se tiñe verde amarillento o azulado.



b. *Balantidium coli*

- Tamaño:** 50 – 70 μm .
- Forma:** redonda.
- Núcleos:** uno semejante a un riñón y otro pequeño que asemeja una mancha gruesa.
- Envoltura:** delgada con pared doble.
- Citoplasma:** granuloso, verdoso, lleno de cuerpos de inclusión.



EXAMEN DIRECTO DE HECES

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Si en el laboratorio se recibe muchas muestras en el mismo día, **comenzar por examinar las más líquidas.**
- ◆ **Examinar heces frescas de menos de una hora de eliminadas.** Esto aumenta la posibilidad de encontrar amebas.
- ◆ Elegir, preferentemente, para el examen directo una porción **de la superficie de la muestra donde se encuentre el moco.**
- ◆ Examinar en una solución de cloruro de sodio (ver Anexos) u **observar directamente con el microscopio cuando las heces son muy líquidas.**
- ◆ Los trofozoítos se inmovilizan en solución de yodo (ver Anexos) y puede ser difícil diferenciar entre trofozoítos y quistes.
- ◆ En las heces líquidas los depósitos de moco frecuentemente contienen grupos numerosos de *Giardia lamblia*.
- ◆ Si las heces se dejan expuestas al aire en un recipiente sin tapa pueden caer en ellas microorganismos de la atmósfera, como los infusorios. Estos son muy semejantes a *Balantidium coli*.

EXAMEN DE TINCIÓN CON YODO Y CON SOLUCIÓN SALINA O CLORURO DE SODIO

MATERIALES

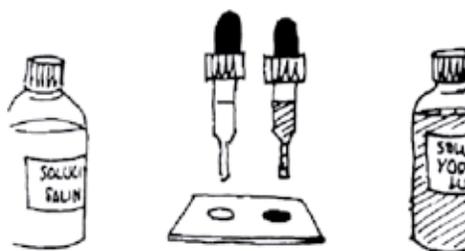
- Portaobjetos o láminas.
- Cubreobjetos o laminillas.
- Aplicadores de madera.
- Solución yodurada de lugol (ver Anexos).
- Solución salina o de cloruro de sodio.
- Un microscopio.
- Lápiz de cera.



MÉTODO

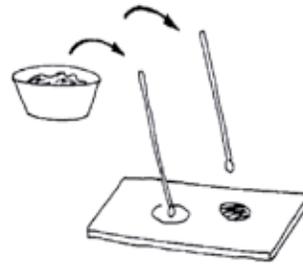
1. En un portaobjetos colocar

- Una gota de solución salina o de cloruro de sodio, en la mitad del lado izquierdo del portaobjetos.
- Una gota de solución yodurada de lugol, en la mitad del lado derecho del portaobjetos.



- #### 2.
- Tomar 1 - 2 mg de material fecal (de preferencia de la parte profunda de la muestra y si hay moco, elegir esta porción) con el aplicador de madera.

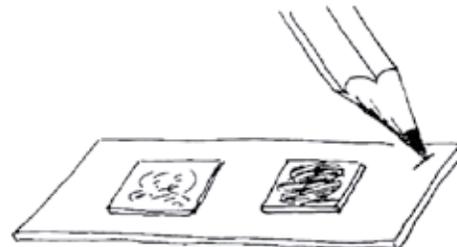
3. Mezclar la porción tomada de la muestra con la gota de solución salina o de cloruro de sodio.



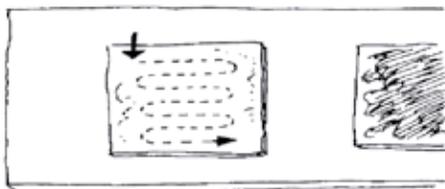
4. Tomar otra porción de la muestra y mezclarla con la gota de solución yodurada.



5. Colocar un cubreobjeto sobre cada gota.



6. Con el lápiz de cera marcar el número de la muestra en el portaobjetos.



7. Examinar las preparaciones con el microscopio con objetivos de 10x y 40x, comenzando en el ángulo superior izquierdo del cubreobjeto.

- 8.** Observar con atención las formas, recordando que los quistes y trofozoítos de los protozoarios se observan en forma natural en el lado sin colorear (solución salina o de cloruro de sodio).

- 9.** Las estructuras internas (núcleos, vacuolas, etc.) se observan en las tinciones con solución yodurada de lugol.

- 10.** Suele encontrarse como elementos normales, estructuras pertenecientes a la ingestión de alimentos, como fibras vegetales, granos de almidón, esporas de hongos, granos de polen, fibras musculares lisas o estriadas, cristales de ácidos grasos, cristales de oxalato de calcio, etc.



EXAMEN DE HUEVOS DE OXIUROS MÉTODO DE LA CINTA ADHESIVA

PRINCIPIOS GENERALES

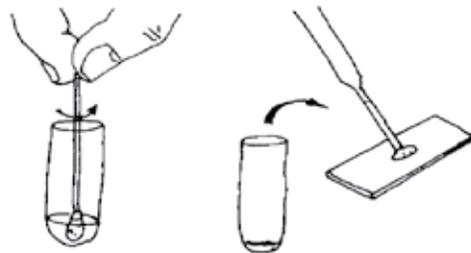
- ◆ Los oxiuros (*Enterobius vermicularis*) afectan frecuentemente a los niños.
- ◆ Sus huevos se recogen de los pliegues de la piel que rodea al ano, porque raras veces se hallan en las materias fecales.

MATERIALES

- Material para obtención de huevos de oxiuros.
- Un microscopio.
- Una pipeta Pasteur.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.

MÉTODO

1. Obtenida la muestra por el método de la cinta adhesiva, esta queda lista para mirarla al microscopio.
2. Si la muestra es obtenida usando un hisopo de algodón aspirar la solución de cloruro de sodio (donde ha sido sumergido el hisopo) con una pipeta de Pasteur. Colocar una gota en el portaobjeto, poner un cubreobjeto encima de la gota y queda lista para mirarla al microscopio.



3. Observar con el microscopio utilizando objetivo de 10x, en busca de los huevos de *Enterobius vermicularis*.

MÉTODO DE CONCENTRACIÓN DE PARÁSITOS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Antes de preparar una concentración de parásitos se debe realizar un examen microscópico directo de las heces.
- ◆ El método de concentración hace posible que se detecten parásitos que están presentes en escaso número.
- ◆ Este método se basa en el peso específico de los quistes o huevos.
- ◆ En este método de concentración de parásitos no se encuentran formas móviles de protozoarios.
- ◆ En el método de concentración, cuando se usa soluciones de baja densidad, los huevos o quistes **sedimentan** y cuando se usa soluciones de alta densidad, los huevos o quistes **flotan**.

MÉTODO DE FLOTACIÓN DE FAUST

- ◆ Es una técnica mixta de centrifugación y flotación que concentra quistes y huevos con la solución de sulfato de zinc.
- ◆ El método permite concentrar los quistes, los huevecillos y las larvas.

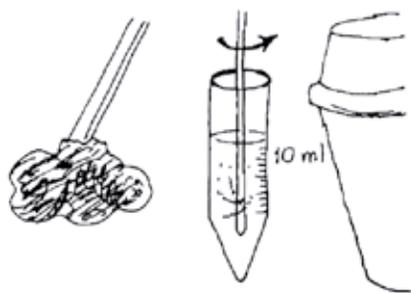
MATERIALES

- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Sulfato de zinc al 33,3% (ver Anexos).
- Lugol (ver Anexos).
- Agua corriente tibia.
- Aplicador de madera.
- Una centrífuga.
- Un microscopio.



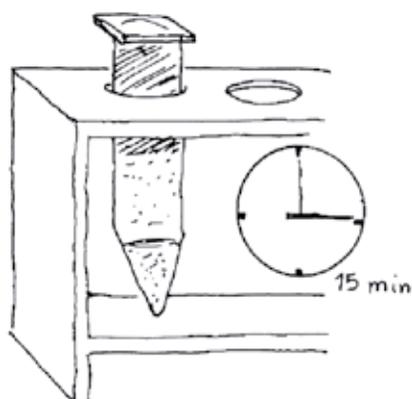
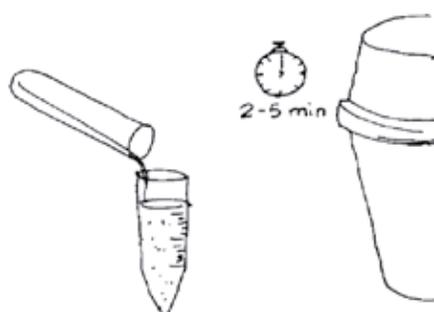
MÉTODO

1. En el tubo de ensayo mezclar, usando el aplicador de madera, 2 g de heces con 8 - 10 mL de agua corriente tibia, centrifugar a 3 000 RPM durante 3 minutos.



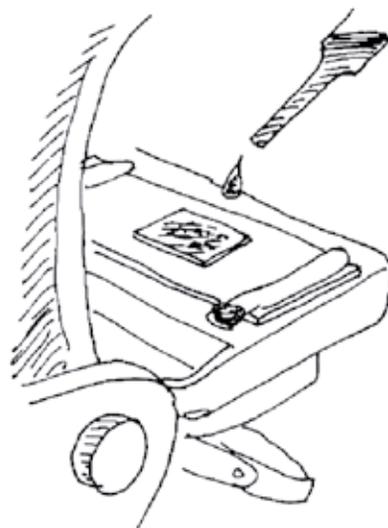
2. El líquido sobrenadante obtenido en el tubo centrifugado, se elimina. Añadir 2 - 3 mL de agua y volver a centrifugar según el procedimiento anterior. Repetir 3 - 4 veces esta operación hasta obtener un líquido sobrenadante claro.

3. Se añaden 3 - 4 mL de solución de zinc al 33,3%, se centrifuga durante 2 - 5 minutos a 3 000 RPM.



4. Colocar el tubo centrifugado en una gradilla, llenándolo con el sulfato de zinc hasta el borde del tubo y colocar encima un cubreobjetos, dejar en reposo por 15 minutos.

- Después de los 15 minutos, sacar el cubreobjetos, levantándolo. Colocar en un portaobjetos con una gota de lugol y observarlo al microscopio con objetivos de 10x y 40x.



MÉTODO DE SEDIMENTACIÓN DE RITCHIE

MATERIALES

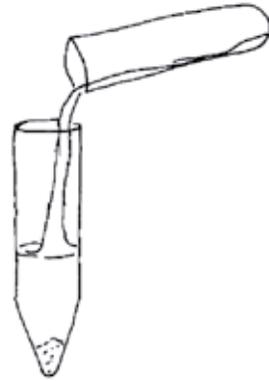
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Formol al 10% (ver Anexos).
- Éter sulfúrico comercial.
- Lugol (ver Anexos).
- Agua corriente tibia.
- Un aplicador de madera.
- Bagueta.
- Una centrífuga.
- Un microscopio.



MÉTODO

- Lavar las heces en igual forma que en la técnica de Faust.

2. Después del último lavado, llenar hasta la mitad el tubo centrifugado, con formol al 10% y 2 mL de éter.



3. Tapar con un tapón de jebes y sacudir vigorosamente, teniendo cuidado que el tapón no salte.

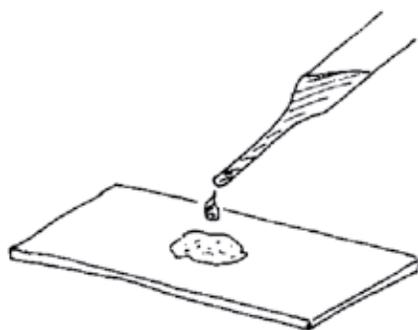
4. Retirar el tapón y centrifugar a 3 000 RPM por 3 minutos.

5. Se observará que en el tubo quedan cuatro capas que son, de arriba hacia abajo: el éter con las grasas disueltas, una capa de detritus, el formol y el sedimento.



6. Desprender el tapón de detritus de las paredes del tubo, usando una bagueta y eliminar el resto de las capas, quedando en el tubo, **únicamente el sedimento.**

- 7.** Diluir el sedimento con el líquido sobrante que escurre por las paredes del tubo, agitándolo.



- 8.** Poner una gota en un portaobjetos, con una gota de lugol. Colocar encima un cubreobjetos y observar en el microscopio con objetivos de 10x y 40x.



EXAMEN DIRECTO DE *Trichomonas* EN SECRECIONES GENITOURINARIAS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La *trichomona vaginalis* es un protozoo que puede causar secreciones genitourinarias, principalmente en la mujer y ocasionalmente en el hombre.
- ◆ Esta secreción es blanquecina o puede ser gris - verdusca y espumosa.
- ◆ La secreción se debe entregar al laboratorio inmediatamente después de haberse recogido.
- ◆ Es preferible colocar la muestra obtenida con un hisopo de algodón en un tubo de ensayo que contenga solución de cloruro de sodio; de este modo las trichomonas conservan su movilidad durante varias horas.

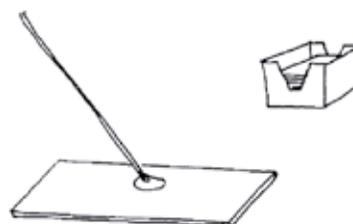
VI

MATERIALES

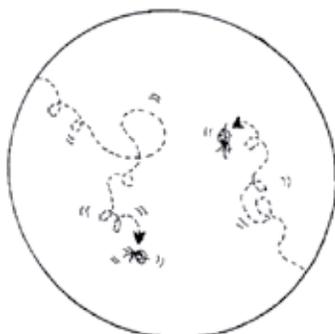
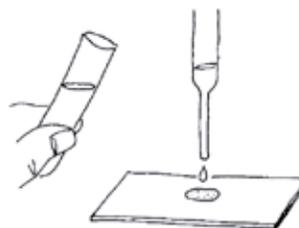
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Solución de cloruro de sodio, tibia a 37 °C (ver Anexos).
- Un asa de siembra.
- Material para obtención de muestra.
- Un microscopio.

MÉTODO

1. Obtener la muestra.
2. Depositar una gota de la secreción con el asa de siembra, en un portaobjetos.



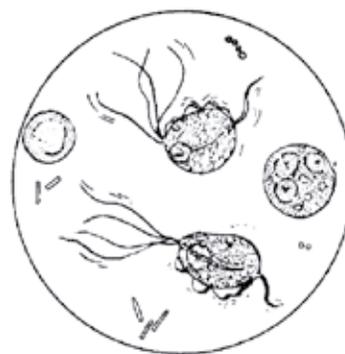
3. Añadir una gota tibia de solución de cloruro de sodio. Mezclar y poner un cubreobjetos.



4. Observar en el microscopio con objetivo de 10x: unos organismos pequeños redondeados y transparentes, del tamaño de un leucocito, que se mueven rápido dando saltos y giros.

5. Observar en el microscopio con objetivo de 40x los cuerpos de trichomonas:

- Tamaño:** 10 - 20 μm .
Forma: redonda, globulosa.
Movilidad: giran.
Flagelos: tienen cuatro, semejantes a látigos.
Membrana: ondulante, se encuentra solo en un lado y parece aleta de un pez; es muy móvil.

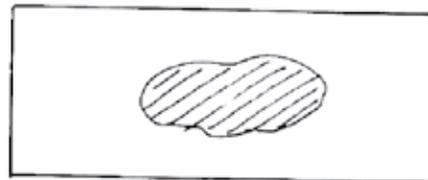
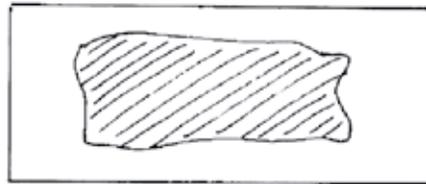


6. Si no se encuentra nada en la gota que se ha examinado, preparar en otro portaobjetos un frotis amplio y delgado de la secreción. Aplicar tinción Gram al frotis seco (buscar bacterias, podría haber gonococos).

EXAMEN DE GOTA GRUESA Y FROTIS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PLASMODIO

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ El parásito causante de la malaria o paludismo es el plasmodio que se encuentra en la sangre.
- ◆ **La gota gruesa** es la extensión de una gota de sangre en forma cuadrangular de un diámetro aproximado de 1 a 1,5 cm mediante la cual se puede concentrar la densidad del parásito permitiendo un examen rápido. Con la gota gruesa se puede **detectar la presencia** del plasmodio, su especie y la densidad parasitaria.
- ◆ **El frotis sanguíneo** es la extensión de una gota de sangre de tal manera que se pueden observar al microscopio, tanto los eritrocitos como los parásitos en un sólo plano. Con el frotis sanguíneo se logra **diferenciar claramente** la especie de *plasmodio*.
- ◆ La recolección de sangre se debe hacer en el momento en que se presenta la fiebre (en esta etapa los parásitos son más numerosos) y antes que se administren medicamentos antipalúdicos.
- ◆ Para el pronóstico y el tratamiento de la enfermedad es importante que se identifique la especie en el laboratorio.



- ◆ Existen 4 especies diferentes de parásitos que causan malaria o paludismo en el mundo:
 - *Plasmodium vivax*.
 - *Plasmodium malariae*.
 - *Plasmodium ovale*.
 - *Plasmodium falciparum*.

- ◆ En el Perú solo se presentan tres de ellas. *Plasmodium ovale* solo se encuentra presente en el África.

- ◆ Un paciente puede tener más de una especie de parásitos del paludismo al mismo tiempo.

COLORACIÓN DE LA GOTA GRUESA Y FROTIS

- ◆ La preparación de la **gota gruesa se tiñe inmediatamente** con Giemsa diluida. Los **frotis se deben primero fijar** durante 2 - 3 minutos con metano.

MATERIALES

- Probetas de 10, 50 y 100 mL.
- Beaker o vaso plástico de trabajo.
- Un agitador de vidrio.
- Una gradilla para portaobjetos.
- Un cronómetro o reloj con segundero.
- Un frasco gotero con metanol.
- Colorante Giemsa (solución madre) (ver Anexos).
- Agua amortiguada (ver Anexos) puede ser reemplazada por agua de lluvia o agua hervida fría.



a. **Método para colorear de 1 a 10 láminas**

1. Utilizar la probeta de vidrio para preparar colorante de **Giemsa diluido** al 5% con agua amortiguada de pH 7,2 en la **proporción de 1 gota de Giemsa (solución madre) con 1 mL de agua amortiguada (o agua de lluvia o agua hervida fría)**.

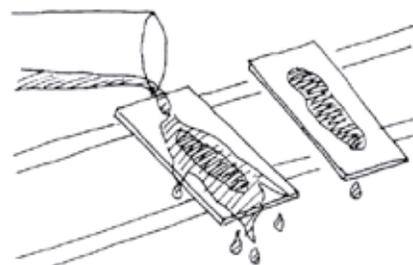


2. Mezclar suavemente con una varilla de vidrio.

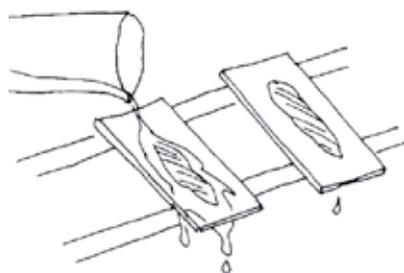
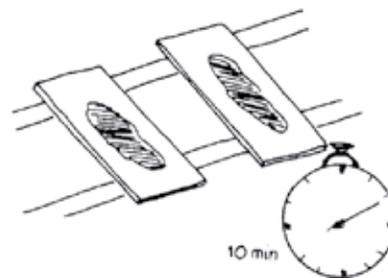
3. Si solo es una lámina (gota gruesa) para colorear, se necesitará aproximadamente 1,5 mL de solución preparada. Si se tuviera que colorear dos láminas, se necesitará tres gotas de solución Giemsa (solución madre) por cada 3 mL de agua amortiguada.

4. **Antes de colorear** verificar si las claves de las láminas coincidan con las solicitudes de diagnóstico.

5. Colocar las láminas a través de dos varillas de vidrio. Cubrir las suavemente con el colorante de Giemsa diluido. **Nunca** echar el colorante muy alejado de las láminas, porque pueden formarse "espumas" que dificultarían el examen microscópico.

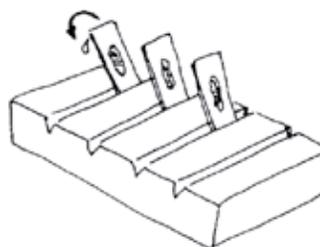


6. Dejar reposar las láminas con el colorante por 10 minutos (la experiencia le indicará el tiempo correcto para cada lámina o grupo de láminas).



7. Transcurrido el tiempo indicado de coloración, lavar suavemente el colorante de la lámina añadiendo un chorro suave de agua limpia.

8. Colocar en una gradilla las láminas inclinadas, con la cara de sangre teñida hacia abajo, para eliminar el exceso de agua, facilitar el secado y protegerlos del polvo.

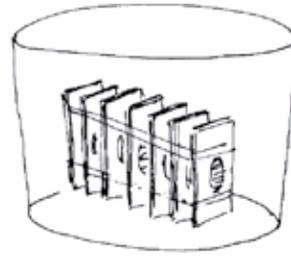


b. Método para colorear más de diez láminas: coloración en bloque

- ◆ Generalmente se usa cuando se realizan muestreos hemáticos masivos.

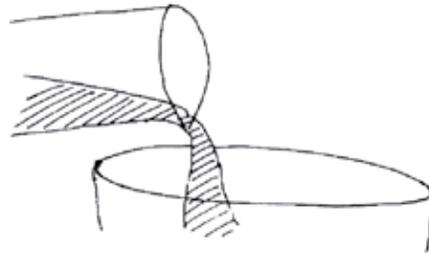
 1. Previamente se debe conocer el diámetro y capacidad del beaker o vaso plástico de trabajo para calcular la cantidad de láminas que en posición vertical puedan ser coloreadas. Asimismo, se debe conocer el volumen del colorante Giemsa diluido que se va a utilizar (calcular de acuerdo con el método anterior).

2. Colocar las láminas con las muestras hemáticas en el beaker o vaso, en posición vertical, de dos en dos y separadas por tarjetas de cartón de 2 x 3 cm de área, de tal manera, que los lados que contengan la muestra estén hacia las caras externas y entren en contacto con el colorante. Asegurar el bloque de láminas formadas, pasándole alrededor una liga o hilo de pabilo.



3. Preparar una cantidad suficiente de colorante de Giemsa diluido para llenar el beaker o vaso plástico.

4. Una vez que las láminas con las muestras se hayan colocado en el beaker o vaso plástico, llenar el recipiente lentamente con el colorante de Giemsa diluido. Evitar mojar los cartones. Tapar el beaker.



5. Dejar las láminas en el colorante por 10 minutos, lejos de la luz del sol.
6. Transcurrido el tiempo indicado de coloración, quitar la tapa, sacar el bloque de láminas del recipiente con colorante y enjuagarlo sumergiéndolo y sacándolo alternativamente en un recipiente con agua limpia, hasta que no se desprenda colorante en el enjuague. Evitar mojar los cartones.
7. Dejar escurrir el agua del bloque. Colocarlo sobre papel toalla o papel higiénico y dejarlo secar.
8. Cuando esté seco, retirar las láminas del bloque, una por una, y colocarlas en la gradilla de madera, de modo que queden inclinadas y con la gota gruesa hacia abajo, evitando que la muestra toque algo.

EXAMEN MICROSCÓPICO DEL PLASMODIO

- ♦ Durante el examen microscópico se debe anotar las características de los estadios del plasmodio.

a. **Trofozoíto joven**

Es el estadio más pequeño, presenta un núcleo o cromatina de color rojo grosella y una masa citoplasmática tenue de color celeste. Carece de pigmento malárico. Las formas de citoplasma pueden variar desde anillos, comas, círculo. En *P. vivax* y *P. falciparum* se pueden presentar formas con dos núcleos.

b. **Trofozoíto mediano**

Más grande que el estadio anterior. El citoplasma en *P. vivax* se puede presentar en forma de anillo, coma o fragmentado. En *P. malariae* el citoplasma es redondeado y compacto. En *P. falciparum* es similar, pero no es común observarlo en sangre periférica.

A partir de este estadio se observa pigmento malárico o hemozoína.

c. **Trofozoíto adulto o maduro**

El citoplasma y el núcleo son más compactos.

d. **Esquizonte presegmentado**

Parecido al adulto pero con presencia de dos a más núcleos.

e. **Esquizonte segmentado**

El número de merozoítos (cromatina rodeada de citoplasma) define la especie. El pigmento se encuentra a un lado.

f. **Gametocitos**

En *P. vivax* y *P. malariae* solo se puede observar el gametocito macho o microgametocito cuyo núcleo es grande y el citoplasma muy tenue. El pigmento se ve en forma concéntrica.

PRINCIPIOS GENERALES

GOTA GRUESA Y FROTIS

- ◆ En climas húmedos y cálidos, las muestras se fijan muy rápidamente, por lo tanto, deben ser coloreadas con solución Giemsa cuanto antes, a más tardar en un plazo de 3 días después de obtenida la muestra, a fin de evitar la fijación y contaminación por hongos.
- ◆ Las láminas con muestras de sangre no deben exponerse a la luz solar fuerte o estar cerca a fuentes de calor.
- ◆ Las láminas con muestras de sangre deben protegerse de moscas, cucarachas y hormigas. Estas comen la sangre seca y dañan la muestra.
- ◆ Para cumplir con las medidas de bioseguridad y evitar posibles contagios, las muestras de sangre serán procesadas como material altamente infeccioso.
- ◆ Para la conservación y el envío de muestras, las láminas deben ser envueltas y rotuladas individualmente, con sus respectivas fichas. Luego se introducirán en una caja de cartón rotulada para enviarse al laboratorio del centro de salud.

LÁMINAS TEÑIDAS

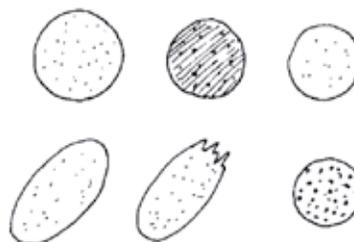
- ◆ En todas las etapas de desarrollo las diversas partes del parásito se tiñen del mismo color.
- ◆ La cromatina (núcleo del parásito) es generalmente redonda y se colorea de un rojo intenso.
- ◆ El citoplasma del parásito toma diferentes formas, desde una forma de anillo a una totalmente irregular. Se colorea siempre de azul, aunque la tonalidad puede variar entre las especies de plasmodio.

FROTIS

- ◆ Para fines de aprendizaje de las especies de *plasmodio*, etapas de desarrollo, etc.; es mejor iniciarse en la lectura del frotis.

1. Una manera de distinguir entre las cuatro especies de malaria es ver el efecto que tiene el parásito dentro de los glóbulos rojos infectados:

- El tamaño del glóbulo rojo.
- Su forma, su color.
- Los gránulos de Schüffner se pueden ver como un moteado en los glóbulos rojos.
- El pigmento malárico.



2. El examen de frotis de sangre **no es recomendable rutinariamente**, ya que requiere mayor tiempo de observación en comparación con la gota gruesa.

3. El examen de frotis **es recomendado en los siguientes casos:**

- Cuando no es posible examinar la gota gruesa por ser muy pequeña.
- Cuando es necesaria la identificación de la especie.

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES ENTRE LOS PLASMODIOS VISTOS EN EL FROTIS DE SANGRE HUMANA

Características	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>
Glóbulos rojos aspecto general	Tamaño aumentado Gránulos de Shüffner presentes.	Tamaño normal Pueden ser dentados	Tamaño normal o menor que lo normal
Trofozoíto joven (anillos)	Pequeño a grande. Un anillo por eritrocito. La infección múltiple es muy rara.	Pequeño y delicado, a menudo dos puntos de cromatina y generalmente dos o más anillos por eritrocito.	Casi compacto. Generalmente uno a dos anillos por eritrocito.
Trofozoíto mediano	Grande, ameboide. Pigmento en forma de bastones finos.	Raro en sangre periférica. Si lo hay es de tamaño moderado. Pigmento en gránulos.	Pequeño, compacto. A menudo en forma de banda. Pigmento granulado.
Trofozoíto maduro o adulto	Tamaño mediano, con citoplasma compacto. Pigmento fino.	Raro en sangre periférica	
Esquizonte	Grande, con numerosos merozoítos(12-24), promedio 16. Pigmento concentrado en 1 - 2 masas.	Mediano, con numerosos merozoítos(12-32). Pigmento en una masa única. Raro en sangre periférica.	Pequeño, pocos merozoítos grandes (6-12), promedio: ocho dispuestos en rosetas. Pigmento granulosos ubicado generalmente en la parte central.
Gametocitos	Esféricos, compactos. Núcleo único. Pigmento difuso y fino.	Forma de plátano o salchicha. Núcleo único central.	Parecido al de la <i>P. vivax</i> pero más pequeño y menos numeroso en el frotis.



GOTA GRUESA

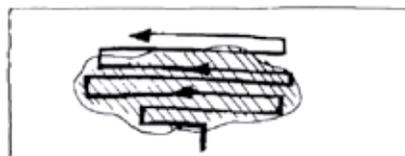
- ◆ El examen de la gota gruesa es mejor para detectar la presencia de parásitos.
- ◆ **Rutinariamente, la gota gruesa debe ser examinada primero.** Presenta las siguientes características:
 - Los glóbulos rojos han desaparecido.
 - Los gránulos de Schüffner se pueden observar alrededor del parásito.
 - Los leucocitos se conservan sin modificaciones. Los parásitos pueden ser vistos semejantes a los leucocitos, pero tienen apariencia más pequeña que en el frotis.
 - El citoplasma de los anillos finos de los trofozoítos puede aparecer incompleto o roto en las preparaciones de gota gruesa.
 - Las granulaciones de Maurer de *Plasmodium falciparum* no pueden ser vistos en gota gruesa.



a. Técnica para el examen de gota gruesa

- ◆ El examen de rutina de gota gruesa está basado en el examen de 100 campos.
- ◆ **Se reporta lámina negativa** solo después de no haber encontrado parásitos en 100 campos de la muestra de sangre. Si son encontrados parásitos debe finalizarse el examen con la identificación de la especie.
- 1. Colocar la lámina entre los soportes de la platina mecánica del microscopio. Examinar la muestra con el objetivo de 7x o 10x hasta localizar una zona en la que los leucocitos sean numerosos y aparezcan bien coloreados.
- 2. Colocar aceite de inmersión sobre la zona localizada de la gota gruesa y cambiar el objetivo a 100x.

3. Examinar 100 campos. Desplazar la muestra de sangre siguiendo las flechas de la figura.
4. Usar un contador manual para contar los campos que van a ser examinados y para el recuento de parásitos.
5. Al encontrar el parásito anotar sus características de color, aspecto, etc.



CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES ENTRE ESPECIES Y ESTADIOS DEL PLASMODIO EN LA GOTA GRUESA

TROFOZOÍTO

Estado/ Característica	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium malarie</i>
Tamaño	Pequeño a grande.	Pequeño a mediano.	Pequeño a grande.
Número	Moderado.	Por lo general abundante.	Escaso a moderado.
Citoplasma	Fragmento de forma irregular.	Uniforme, fino.	Regular, denso.
Cromatina	Única, a veces dos.	A menudo dos núcleos.	Única grande.
Formas	Jóvenes (anillos, comas sin pigmento) mediano(citoplasma ameboide, fragmentado, con pigmento). Maduro o adulto (compacto)	Frecuentemente anulares y comas, las formas maduras(compactas) sólo presentes en casos graves.	Jóvenes (anulares) adultos (redondos, compactos).
Pigmentos	Filtro, desperdigado	Pocos gránulos o en masa única	Abundante, generalmente rodeando el citoplasma.



EZQUIZONTE

Estado/ Característica	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium malarie</i>
Tamaño	Grande.	Pequeño a mediano.	Pequeño .
Número	Escaso a moderado.	Poco frecuentemente, sólo en formas graves.	Escaso .
Citoplasma	12-24 generalmente 16.	12 -30, o más.	6 - 12, genralmente ocho.
Cromatina	En conglomerado regular formas maduras	Aglomerados y compactos.	Merozoítos en conglomerado laxo, de forma madura, algunos aparentemente sin citoplasma.
Formas	Dispuesto en masa suelta.	Masa única y oscura	Concentrado.

GAMETOCITO

Estado/ Característica	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium malarie</i>
Formas inmaduras	Dificiles de distinguir de trozoítos maduros.	Inmaduras: puntiagudas.	Dificiles de distinguir de trofozoítos maduros .
Formas maduras	Redondos, grandes.	En forma de banana o redondeadas.	Redondeadas, compactas algunas veces también es difícil de distinguir de los trofozoítos maduros .
Cromatina	Grande y única bien definida.	Única bien definida.	Única, bien definida.
Pigmento	Desperdigado fino	Desperdigado, grueso	Desperdigada, rugoso, puede estar distribuido en la periferie.
Formas erosionadas	Con citoplasma oscuro o ausente, y sOlo con cromatina y pigmento.	A veces se observa de color rosa.	Solo con cromatina y pigmento.

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD PARASITARIA

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La densidad de los parásitos es el número de parásitos que se cuentan en cada campo microscópico.
- ◆ Generalmente se determina la densidad parasitaria en la gota gruesa.
- ◆ Es importante notificar la densidad de los parásitos por estadios en caso de *P. falciparum* (estadios asexuados y sexuados), los cuales se asocian a enfermedad más grave, que algunas veces causa la muerte.
- ◆ La determinación de la densidad parasitaria es útil para conocer la gravedad de la malaria y para conocer la respuesta al tratamiento antimalárico. Si el tratamiento es eficaz, la densidad parasitaria en la sangre debe disminuir progresivamente.

VI

a. **Métodos de determinación de la densidad parasitaria**

EL SISTEMA DE CRUCES (+) O MÉTODO SIMPLE

- ◆ Es un método sencillo para determinar el número de parásitos en gota gruesa, usado rutinariamente.
- ◆ Se observan 100 campos microscópicos, vistos con un aumento de 750x. Una muestra de gota gruesa corresponde aproximadamente a 0,2 μ L de sangre. Por lo tanto, si encontramos un parásito por campo microscópico, en 1 μ L tendremos $(100 \times 1) \times 5 = 500$ parásitos.
- ◆ Si luego de leer 100 campos microscópicos se observan menos de 40 parásitos

(1 a 39) se determina el número exacto de parásitos.

- ◆ Cuando se encuentra más de 40 parásitos en 100 campos microscópicos se usa cruces, de la siguiente manera:

+/2	De 40 a 60 parásitos en 100 campos.
+	Un parásito por campo en 100 campos.
++	De 2 a 20 parásitos por campo en 100 campos.
++++	Más de 200 parásitos por campo en 100 campos.

PARÁSITOS POR MICROLITRO DE SANGRE

- ◆ Es un método práctico y de precisión aceptable.
- ◆ El número de parásitos por microlitro de sangre en gota gruesa es contado en relación con el número estándar de leucocitos (8 000).
- ◆ A pesar de que hay variaciones en el número de leucocitos entre personas sanas y enfermas, este método permite una precisión aceptable.
- ◆ Se requiere de dos contadores: uno para los parásitos y otro para los leucocitos.
- ◆ Si después de contar 200 leucocitos, se han encontrado diez o más parásitos, se debe anotar los resultados en función del número de parásitos por 200 leucocitos.



Ejemplo:

once parásitos por 200 leucocitos.

- ◆ Si después de contar 200 leucocitos, hay nueve o menos parásitos, continuar contando hasta llegar a 500 leucocitos en su contador, luego anotar el número de parásitos por 500 leucocitos.

Ejemplo:

siete parásitos por 500 leucocitos.

- ◆ Para informar los resultados por microlitro de sangre, se debe usar la siguiente fórmula:

$$\text{Parásitos por microlitro} = \frac{\text{Número de parásitos} \times 8\,000}{\text{Número de leucocitos}}$$

Esto significa que:

- Si son contados 200 leucocitos, entonces:

$$\text{Parásitos por microlitro} = \frac{\text{Número de parásitos} \times 8\,000}{200}$$

$$\text{Parásitos por microlitro} = \text{Número de parásitos} \times 40$$

- Si son contados 500 leucocitos, entonces:

$$\text{Parásitos por microlitro} = \frac{\text{Número de parásitos} \times 8\,000}{500}$$

$$\text{Parásitos por microlitro} = \text{Número de parásitos} \times 16$$

b. En caso de *Plasmodium falciparum*

- ◆ Cuando la infección es por *Plasmodium falciparum*, además de la densidad parasitaria se debe registrar las fases de desarrollo:

F	=	Anillos solamente.
F y Fg	=	Anillos y gametos.
Fg	=	Gametos solamente.

- ◆ Cuando se detecta un caso positivo a *Plasmodium falciparum*, debe ser reportado al jefe inmediato y realizar un seguimiento o control tomando muestras como mínimo durante 7 días consecutivos. Si al paciente se le puede seguir observando por más tiempo, se debe tomar dos muestras semanales la segunda, tercera y cuarta semanas.
- ◆ Para garantizar el diagnóstico en el seguimiento o evolución de un caso de *Plasmodium falciparum*, se debe observar como mínimo 300 campos microscópicos con la finalidad de observar cualquier signo de resistencia o recrudescencia (nueva aparición de los parásitos).
- ◆ En caso de seguimiento a *Plasmodium falciparum*, se identificará la muestra con la clave original (primera muestra), en todas las láminas que se tomen, agregándose un número correlativo para cada una de ellas.

Ejemplo:

Clave original:	(150) 10
Claves de seguimiento:	(150) 10 - 1, (150) 10 - 2, (150) 10 - 3, etc.

No olvidar adicionar la fecha de toma de muestra en cada muestra de sangre.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS

- ◆ Para el diagnóstico de leishmaniasis se requiere de muestras de linfa, frotis de tejido, exudado y biopsias.
- ◆ Las biopsias deben ser realizadas por el médico o por personal de salud capacitado.

MUESTRA DE CUERPOS FLUIDOS (LINFIA)

MATERIALES

- Una jeringa de tuberculina estéril (1 mL).
- Algodón.
- Alcohol al 70%.
- Agua oxigenada.
- Suero fisiológico estéril.
- Tubos con medio de cultivo agar sangre o NNN (ver Anexos).

MÉTODO DE OBTENCIÓN

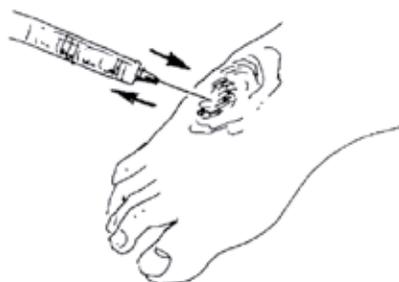
1. Lavar la lesión ulcerada (área necrótica, muerta) del paciente con agua y jabón.



2. Elegir el área decolorada de la pápula (pequeño nódulo) que se halla al margen de la úlcera. Desinfectarla con alcohol al 70% y agua oxigenada.



3. Cargar la jeringa de tuberculina con 0,2 mL de solución salina estéril.



4. Por punción inyectar suavemente dentro del área elegida y enseguida aspirar el contenido inyectado.

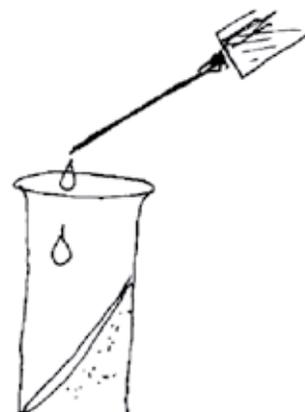
5. Retirar la jeringa.

6. Con 2 o 3 gotas del material aspirado, inocular en los tubos con medio de cultivo.

MUESTRA DE FROTIS

MATERIALES

- Láminas portaobjetos limpias y desgrasadas.
- Un bisturí con hoja 20 o 21 estéril.
- Algodón y gasa estéril.
- Alcohol al 70%.



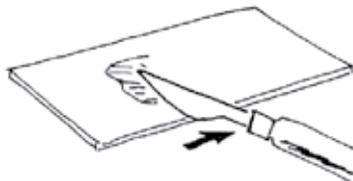
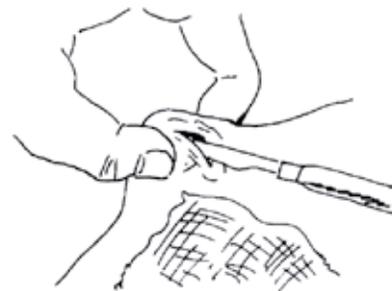
MÉTODO DE OBTENCIÓN

1. Lavar la lesión ulcerada con agua y jabón.



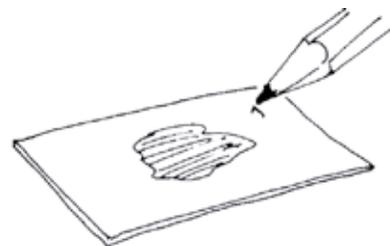
2. Elegir el borde de la lesión ulcerada. Desinfectar con alcohol al 70%.

3. Presionar con firmeza los bordes de la lesión hasta que palidezca; en el borde interno, hacer una pequeña incisión con la hoja del bisturí estéril tratando de levantar la piel; secar la sangre con gasa y raspar el tejido.



4. Con el material obtenido en la hoja de bisturí, hacer el frotis en el portaobjetos, procurando que este sea delgado y evitando pasar dos veces por el mismo sitio.

5. **Rotular** el portaobjetos y dejar secar al medio ambiente.



¡ATENCIÓN!

- ◆ El frotis también puede realizarse con material de biopsia.

MUESTRA DE TEJIDO (BIOPSIA)

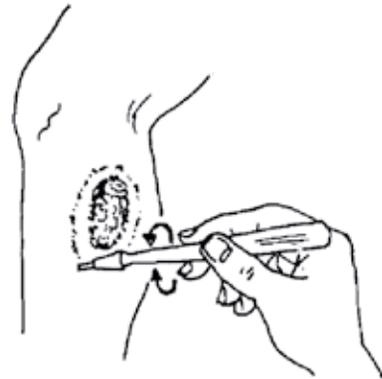
MATERIALES

- Algodón y gasa.
- Alcohol al 70%.
- Agua oxigenada.
- *Punch* de biopsia de 2 - 4 mm, estéril.
- Bisturí con hoja 20 o 21 estéril.
- Pinzas estériles punta roma.
- Xilocaína al 2%.
- Papel filtro.
- Viales.
- Solución salina estéril o formol.

MÉTODO DE OBTENCIÓN

1. Lavar la lesión ulcerada con agua y jabón.
2. Elegir el borde de la lesión ulcerada. Desinfectar con alcohol al 70% y agua oxigenada.
3. Anestesiarse con 0,5 cc de xilocaína el área elegida.

4. Introducir el *punch* en el borde de la lesión y rotar varias veces con movimiento suave.

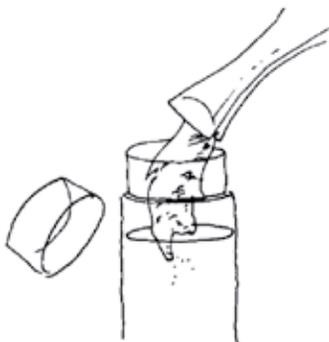
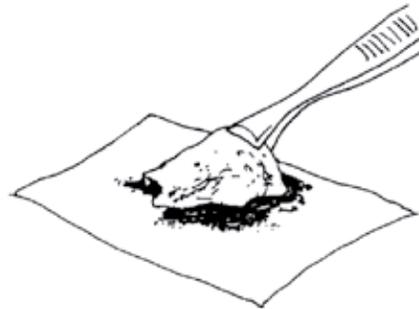


5. Retirar el *punch*, y con ayuda de la pinza y la hoja de bisturí, cortar la base del tejido removido por el *punch*.

6. Presionar con gasa el área donde se ha retirado el tejido, hasta que deje de sangrar. Luego cubrir la herida.

VI

7. Colocar la biopsia (el tejido cortado) sobre un papel filtro para absorber el exceso de sangre.



8. Introducir el tejido en un vial que contenga solución salina estéril o formol de acuerdo con lo indicado en el examen.

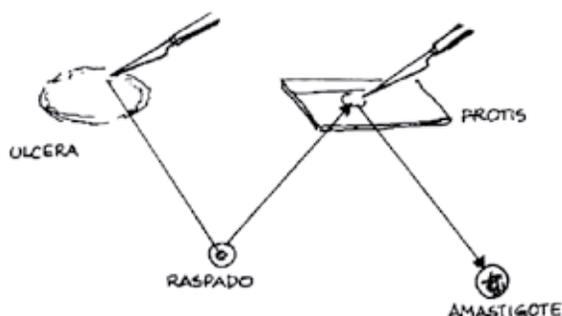
EXAMEN DIRECTO Y CULTIVO EN EL DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria endémica en los valles interandinos y el llano amazónico de nuestro país. Es transmitida por picaduras de flebotominos.
- ◆ El agente causal es un protozooario parásito del género *Leishmania*, del cual se han reportado cinco especies en el Perú: *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* y *L. lainsoni*. Siendo las dos primeras las responsables de la mayoría de los casos de leishmaniasis.
- ◆ En nuestro país se han descrito como forma clínica, la leishmaniasis tegumentaria ya sea cutánea (uta) o cutánea-mucosa (espundia).

EXAMEN DIRECTO

- ◆ Se basa en la detección del parásito bajo su forma de amastigote, los cuales se encuentran dentro de los macrófagos.
- ◆ Los amastigotes tienen formas redondeadas y en el citoplasma se nota el núcleo y el kinetoplasto.



La muestra se obtiene por frotis, de una punción - aspiración o una biopsia con la cual se puede realizar una impronta - frotis.

- ◆ Este examen tiene una positividad que varía del 33 - 43%. A pesar de su baja positividad es de bajo costo y fácil de aplicar en sitios que cuentan **como mínimo con un microscopio**.

CULTIVO

- ◆ Se basa en la recuperación del parásito bajo su forma de promastigote.
- ◆ La muestra se obtiene de una punción - aspiración o una biopsia.

PROCESAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL PARÁSITO

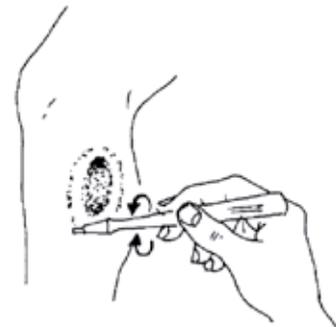
a. Examen directo

MATERIALES

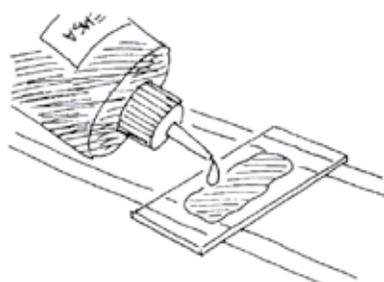
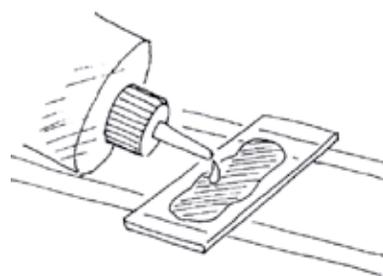
- Materiales para la obtención de muestra.
- Metanol absoluto.
- Coloración Giemsa diluido 1 en 10 a partir de una solución *stock* (ver Anexos).
- Agua corriente de caño.
- Microscopio con objetivo de 100x.
- Aceite de inmersión.

MÉTODO

- I. Obtener la muestra de frotis o una impronta - frotis.



2. Fijar las láminas que contienen el frotis o impronta-frotis cubriéndolas con metanol absoluto durante 3 minutos o hasta que se haya evaporado.



3. Cubrir la lámina con coloración Giemsa diluida 1 en 10 a partir de una solución *stock* (ver Anexos) por 30 minutos.



4. Descartar el colorante y lavar ligeramente con agua corriente.

5. Dejar secar la lámina a temperatura ambiente durante 10 minutos.



6. Observar la lámina a un aumento de 100x, adicionar una gota de aceite de inmersión y examinar el frotis hasta que se visualicen los parásitos.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE FROTIS

- ◆ La observación de formas **amastigotes de Leishmania** en los frotis indica un resultado positivo.
- ◆ El resultado debe informarse: **leishmaniasis (+): observación de amastigotes de Leishmania.**

b. Cultivo

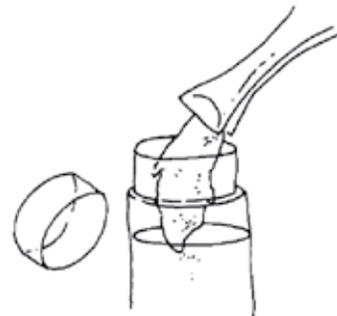
CULTIVO DE BIOPSIA (TEJIDO)

MATERIALES

- Materiales para la obtención de la biopsia.
- Papel filtro.
- Una jeringa o micropipeta estéril.
- Placa Petri estéril u homogenizador.
- Vial que contenga solución salina más antibióticos (ver Anexos).
- Tubos con medios de cultivo NNN, USMARU o agar sangre (ver Anexos).

MÉTODO

1. Colocar la biopsia obtenida sobre un papel filtro para absorber el exceso de sangre.
2. Enseguida, introducir la biopsia en un vial que contenga solución salina más antibiótico por dos horas, para que el antibiótico actúe sobre la flora normal de la piel.



3. Triturar la biopsia en un homogenizador o placa Petri estéril que contenga 0,5 mL de solución salina más antibiótico.



4. Con una jeringa o micropipeta tomar la suspensión obtenida.

5. Inocular 0,2 mL de suspensión para cada tubo de medio de cultivo.
6. Mantener los cultivos a una temperatura de 22 °C, hasta un máximo de 25 °C.

CULTIVO DE ASPIRADO (PUNCIÓN. ASPIRACIÓN)

MATERIALES

- ◆ Materiales para la obtención del aspirado.
- ◆ Solución salina más antibióticos (ver Anexos).
- ◆ Tubos con medios de cultivo NNN, USMARU o agar sangre (ver Anexos).

MÉTODO

1. Obtener la muestra por aspirado (punción - aspiración).
2. Inocular 2 - 3 gotas del material aspirado, en cada tubo que contiene medio de cultivo.



3. Mantener los tubos de cultivo a 22 °C, siendo la temperatura máxima de 25 °C.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE CULTIVOS DE BIOPSIAS O ASPIRADO

1. Los tubos deben ser revisados cada 2 días.
2. Utilizando un asa de siembra, tomar una gota del sobrenadante y observar al microscopio de luz con objetivo de 10x en búsqueda de promastigotes.
3. Solo la observación de formas móviles de **promastigotes indica positividad de la muestra.**
4. El resultado debe informarse: **Leishmaniasis (+): observación de promastigotes de Leishmania.**



c. **Intradermoreacción de Montenegro o Leishmanina**

- ◆ La prueba de Montenegro o leishmanina, es **una suspensión de promastigotes (antígeno) de Leishmania**, colocados intradérmicamente en la superficie del antebrazo.
- ◆ En los sujetos **con reacción positiva se produce una reacción de hipersensibilidad cutánea**: Se observa generalmente una zona rojiza e indurada en el sitio de la inoculación.
- ◆ Un diámetro de induración en el sitio de la inoculación de 5 mm o más se considera positivo.

MATERIALES

- Una jeringa de lec con aguja N.º 26 de ½ pulgada (jeringa de tuberculina).
- Alcohol al 70%.
- Algodón.
- Leishmanina (antígeno) conservado en refrigeración.
- Un lapicero.
- Una regla graduada en mm.

MÉTODO

1. Tomar asépticamente 0,1 mL de leishmanina con la jeringa de tuberculina.



2. Limpiar con alcohol el tercio medio anterior del brazo izquierdo.

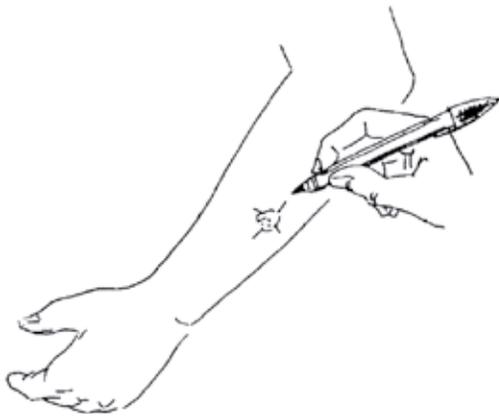
3. Introducir intradérmicamente la aguja de la jeringa con el bisel hacia arriba, cargada con leishmanina. Lentamente introducir el antígeno formando una pequeña pápula.



4. Recomendar al paciente que **no debe frotarse en el área de aplicación.**

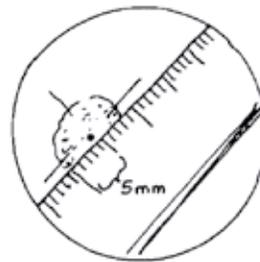
LECTURA E INTERPRETACIÓN

1. A las 48 horas leer la prueba.
2. En la zona de la inoculación delimitar el área de induración con el lapicero, de la siguiente manera:



- Trazar líneas con el lapicero desde uno de los bordes de la reacción hacia el centro de la inoculación, avanzando hasta encontrar resistencia al trazado.

- Repetir el trazo de líneas siguiendo los cuatro puntos cardinales.



3. Medir ahora el diámetro vertical (eje Y) del área indurada (pápula) con una regla.
4. Si el diámetro es igual o superior a 5 mm se considera positivo.

EXAMEN QUÍMICO PARA ENCONTRAR SANGRE OCULTA EN LAS HECES

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Cuando la hemoglobina de la sangre se pone en contacto con peróxido de hidrógeno se libera oxígeno. Este oxígeno liberado reacciona con aminofenazona (aminopirina) y se forma una coloración azul.

MATERIALES Y REACTIVOS

- Una centrífuga.
- Tubos cónicos para centrifugación.
- Aplicadores.
- Una probeta de 20 mL.
- Tubos de ensayo.
- Ácido acético al 10%.
- Peróxido de hidrógeno (solución fresca, de 10 vol.)
- Etanol al 95%.
- Aminofenazona cristalina.

MÉTODO

1. Inmediatamente antes de llevar a cabo el ensayo preparar una solución de aminofenazona como se indica a continuación:
 - Poner alrededor de 0,25 g de aminofenazona en el fondo de un tubo de ensayo.
 - Añadir 5 mL de etanol al 95%.
2. Colocar una porción de la muestra de heces de 4 mL (4 cm³) aproximadamente para un tubo de centrifugación.

3. Agregar 7 mL de agua destilada y mezclarla completamente.
4. Centrifugar a baja velocidad aproximadamente durante 5 minutos, o hasta que se precipiten los sólidos (se puede emplear una centrífuga manual).
5. Decantar el líquido flotante en otro tubo de ensayo y conservarlo.
6. Añadir al tubo de ensayo que contiene el líquido flotante, sin mezclar:
 - 10 gotas de ácido acético al 10%.
 - 5 mL de la solución de aminofenazona.

Para evitar que se mezclen poner la solución de aminofenazona con una pipeta deslizándola por la pared interior del tubo de ensayo.
7. Agregar diez gotas de solución de peróxido de hidrógeno de 10 vol. No mezclar. Dejar reposar un minuto.

REACCIÓN POSITIVA

- ◆ Entre las dos capas de líquido aparece una coloración azul:
 - Azul pálido = reacción positiva +
 - Azul oscuro = reacción positiva intensa ++
 - Azul negra = reacción positiva sumamente intensa +++

REACCIÓN NEGATIVA

- ◆ No ocurre cambio alguno en el color.

PRECAUCIONES EN EL LABORATORIO

¡ATENCIÓN!

- ◆ Los utensilios de vidrio deben estar limpios (sin residuos de sangre).
- ◆ Se debe observar el resultado antes de que transcurra 5 minutos.
- ◆ Se pueden realizar ensayos testigos:
 - Negativos: con agua destilada.
 - Positivos: con agua que contenga 1% de sangre.



PRECAUCIONES EN EL PACIENTE

¡ATENCIÓN!

- ◆ Durante un día entero, antes del examen, el paciente:
 - No deberá comer carne de ninguna clase.
 - No deberá cepillarse los dientes vigorosamente.
- ◆ Se ha dejado de recomendar el ensayo con bencidina a causa de las propiedades carcinógenas de esta sustancia

OBTENCIÓN DE ESCAMAS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Las escamas son laminillas formadas de células epidérmicas que se desprenden espontánea y mecánicamente de la piel; se incrementan como respuesta a un proceso infeccioso e inflamatorio.
- ◆ Los hongos productores de micosis superficiales y cutáneas se encuentran asociados al estrato córneo de la epidermis, siendo necesario tratar las escamas para eliminar el material queratínico y liberar las estructuras micóticas, para su óptima visualización.
- ◆ Antes de tomar la muestra, interrogue al paciente sobre el uso de talcos o cremas en el día del examen, para evitar la presencia de artefactos y dar resultados falsos (negativos o positivos).
- ◆ Igualmente, la muestra no debe tomarse cuando el paciente haya recibido tratamiento antimicótico en los últimos 5-10 días, ya que los resultados pueden ser falsamente negativos.
- ◆ Se recomienda limpiar el área afectada con gasa humedecida en alcohol o en agua destilada estéril, con el fin de eliminar el polvo y los contaminantes ambientales depositados en la piel.
- ◆ No se recomienda el uso de torundas de algodón, ya que las fibras del mismo pueden interferir con el examen directo.
- ◆ Las escamas suelen recolectarse por raspado con bisturí, en las márgenes de la lesión, donde está el crecimiento activo del hongo. Se aconseja tomar muestras de varias lesiones para obtener la mayor cantidad de escamas.

EXAMEN DIRECTO CON HIDRÓXIDO DE POTASIO AL 10%

- ◆ El hidróxido de potasio al 10%, es una solución que **disuelve la queratina** y se utiliza para muestras clínicas con abundantes células y restos celulares, sin afectar la morfología de los elementos fúngicos, permitiendo su mejor visualización.

MATERIALES

- Lámina portaobjeto 75 x 25 mm, limpia y desengrasada.
- Lámina cubreobjeto 22 x 22 mm.
- Pipeta de transferencia estéril de 2 mL.
- Hidróxido de potasio al 10% (KOH10%) (Ver anexos).
- Asa de siembra
- Plumón marcador

PROCEDIMIENTO

1. Con un plumón marcador, escribir en el borde de la lamina portaobjeto el código de la muestra clínica a examinar.
2. Colocar una gota del KOH 10% en el centro de la lámina portaobjeto.
3. Esterilizar a la llama el asa de siembra.
4. Agregar con el asa de siembra, sobre la gota del KOH 10%, una porción de la muestra clínica a examinar.
5. Colocar una laminilla cubreobjeto encima de la preparación y dejar a temperatura ambiente por 03 minutos.
6. Observar al microscopio con objetivos de 10x y 40x.

LECTURA

◆ NEGATIVO

- Cuando hay ausencia de elementos fúngicos.

◆ POSITIVO

- Cuando se observa elementos fúngicos se reportaran de la siguiente manera:

- Presencia de hifas hialinas, tabicadas, o ambas.
- Presencia de levaduras
- Presencia de hifas y levaduras

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- ◆ MATERIAL DE REFERENCIA
 - Escamas positivas y negativas
 - Se utiliza cada vez que se prepara la solución de KOH10%.
 - Es aceptado si la lectura microscópica corresponde a las características fúngicas de la muestra de referencia, utilizando el KOH10%.
 - En caso no cumpla con los criterios de control interno, deberá repetirse la preparación de la solución de KOH10%.

CULTIVO Y TIPIFICACIÓN DE HONGOS DERMATOFITOS

- ◆ Los hongos dermatofitos son un grupo de hongos queratinofilicos, taxonómicamente relacionados, que son causantes de la dermatofitosis, infección de los tejidos queratinizados (piel, pelos y uñas).
- ◆ Los agentes etiológicos se clasifican en tres géneros diferentes: *Microsporum*, *Trichopyton* y *Epidermophyton*.
- ◆ El cultivo es un procedimiento de diagnóstico específico, que nos permite tipificar con certeza el género y la especie causal de la micosis causada por hongos dermatofitos. El diagnostico se basa fundamentalmente en el uso de claves taxonómicas que aplica criterios morfológicos, macro y microscópicos, relacionado con la fase de reproducción asexual, que observamos en el cultivo.

MATERIALES

- Tubos conteniendo medio de cultivo agar Sabouraud glucosado en pico de flauta.
- Tubos conteniendo medio de cultivo agar papa glucosado en pico de flauta.
- Asa de siembra
- Muestra clínica

PROCEDIMIENTO

1. Procesar las muestras de forma inmediata, preferentemente.
2. Sembrar por puntura con una diferencia de 1cm entre puntura y puntura la muestra clínica.
3. Sembrar la muestra clínica en cuatro tubos con el medio de cultivo elegido
4. Incubar a 25-30 °C entre 7 a 30 días como máximo.

LECTURA

◆ MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA

- El color de las colonias presentan en general colores claros, desde tonos blanquecinos, rojos, amarillentos a marrón claro y naranja.

◆ MORFOLOGIA MICROSCÓPICA

- Las características microscópicas son las que determinan su identificación en la mayoría de casos.
- Se observan en el microscopio a 40x y aplicar los criterios de las claves taxonómicas.

◆ CLAVES TAXONÓMICAS

DERMATOFITOS (ver figuras anexos)
--

- | | |
|---|------------------------------|
| 1. Macroconidios presentes | 2 |
| No se observan macroconidios..... | 6 |
| 2. Macroconidios en forma de huso, de paredes gruesas y rugosas y frecuentemente con un pico terminal característico. Están formadas normalmente por más de seis células (Figura 1.3a)..... | M. canis (Figura 1.4) |
| Macroconidios, cuando se presentan, similares a los de <i>M. canis</i> , aunque de mayor | |

longitud y con paredes más lisas. Se observan formas con una constricción en la zona central del macroconidio (Figura 1.3b). Con frecuencia la presencia de macroconidios es escasa, o no se llegan a observar. Clamidosporas terminales (Figura 1.3k) e hifas pectinadas características (Figura 1.3ñ). En contraste con *M. canis*, no se desarrolla o presenta crecimiento escaso en el medio de arroz..... ***M. audouinii***

Macroconidios de paredes delgadas.....	3
3. Macroconidios de paredes rugosas.....	4
Macroconidios de paredes lisas.....	5
4. Macroconidios abundantes, fusiformes y simétricos, conteniendo hasta seis células (Figura 1.3c).....	<i>M. gypseum</i> (Figura 1.5)
5. Macroconidios alargados en forma de cigarro habano (Figura 1.3d) no siempre presentes. Abundantes microconidios redondeados formando grupos que asemejan racimos de uva inmadura (Figura 1.3i). Presencia de hifas espiriladas (Figura 1.3n). Ureasa positivo. Ensayo de perforación del pelo positivo	<i>T. mentagrophytes</i>^b (Figura 1.6)
Microconidios piriformes, estrechos, en forma de lágrima, aislados y dispuestos lateralmente en las hifas (Figura 1.3j). Macroconidios generalmente no presentes. Cuando se presentan, similares a los de <i>T. mentagrophytes</i> (Figura 1.3e). Reverso de la colonia rojiza; se estimula la producción de este pigmento rojizo en PDA. Ureasa negativo. Ensayo de perforación del pelo negativo.....	<i>T. rubrum</i>^c
Macroconidios ovales en forma de porra, aislados o en racimos (Figura 1.3f). Ausencia de microconidios. Clamidosporas abundantes.....	<i>E. floccosum</i> (Figura 1.7)
6. Microconidios abundantes.....	7
Microconidios escasos o no se observan.....	8
7. Abundantes microconidios redondeados formando grupos que asemejan racimos de uva inmaduros (Figura 1.3i). Presencia de hifas espiriladas (Figura 1.3n). Ureasa positivo. Ensayo de perforación del pelo positivo	<i>T. mentagrophytes</i>^b
Microconidios piriformes y estrechos, en forma de lágrima, aislados y dispuestos	



lateralmente en las hifas (Figura 1.3j) Reverso de la colonia rojizo; se estimula la producción de este pigmento en PDA. Ureasa negativo.
 Ensayo de perforación del pelo negativo *T. rubrum*^c

Microconidios de mayor tamaño, en forma de porra más o menos alargados. Algunos en forma de globo (Figura 1.3h). Crece poco en ausencia de tiamina. Infección del pelo tipo endotrix *T. tonsurans* (Figura 1.8)

8. Crecimiento moderadamente rápido (colonias > 15 mm de diámetro en 7 días)..... 9

Crecimiento lento (colonias < 10 mm de diámetro en 7 días) 10

9. Microconidios, si se detectan, pequeños, en bajo número y en forma de porra. Similares a los de otras *Microsporum spp.* (Figura 1.3g). Clamidosporas terminales (Figura 1.3k) e hifas pectinadas características (Figura 1.3ñ). No se desarrolla o presenta un crecimiento escaso en el medio de arroz.....*M. audouinii*

10. Colonias color púrpura oscuro, violeta. No se detectan conidios. Escaso crecimiento en ausencia de tiamina.

Infección del pelo tipo endotrix *T. violaceum*

Colonias con coloraciones claras, blanquecinas, grisáceas, marronáceas..... 11

11. Clamidosporas en cadenas largas densamente compactadas (Figura 1.3l). Algunas hifas en candelabro (Figura 1.3o) y/o terminadas en cabeza de clavo (Figura 1.3p). La mayoría de cepas requieren tiamina^d o tiamina e inositol. Infección del pelo tipo ectotrix megasporado *T. verrucosum*

No se observan conidios. Típicas hifas en candelabro (Figura 1.3o) y/o terminadas en cabeza de clavo (Figura 1.3p). No requieren tiamina. Infección del pelo tipo fávico .
 *schoenleinii*

b: *Trichophyton mentagrophytes* está considerado como un complejo de especies (*T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (variedad granular), *T. mentagrophytes* var. *erinacei*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. mentagrophytes* var. *nodular* (*T. krajdennii*), *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*). Según autores algunas de estas variedades son consideradas como especies independientes o sinónimos de *T. mentagrophytes*. En contraste con *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var. *erinacei* y *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* pueden presentar microconidios alargados (en forma de porra de pequeño tamaño) en vez de redondeados.

c: *T. rubrum* está considerado como un complejo de especies. Para algunos autores las especies *T. fischeri*, *T. kanei*, *T. raubitscheckii*, son consideradas como variedades o

sinónimos de *Trichophyton rubrum*. Algunas de las diferencias que presentan son: *T. fischeri* (especie no patógena), *T. kanei* (ausencia de microconidios; ureasa positivo débil), *T. raubitscheckii* (ureasa positivo).

d: Se han descrito cepas aisladas de tiñas de ovejas que no necesitan tiamina o inositol (*T. verrucosum* var. *autotrophicum*). En un estudio sobre los requerimientos nutricionales de esta especie se cita que el 84% de las cepas se desarrollaron en el medio conteniendo tiamina e inositol, el 16% en el medio conteniendo tiamina y ninguna cepa se desarrolló en el medio sin vitamina.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

♦ MATERIAL DE REFERENCIA

- Cepas referenciales de dermatofitos
- La cepas referenciales se mantienen en viales de agua destilada estéril, codificados y a temperatura de medio ambiente y se reactiva cada 06 meses en medios de cultivo especializado.
- Se utiliza cada vez que se usa clave taxonómica.
- En caso no cumpla con los criterios de control interno, deberá repetirse la prueba.

VI

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR SABOURAUD GLUCOSADO

Es un medio estándar para el aislamiento, esporulación y conservación de muchos hongos. El cambio pH y la concentración de glucosa favorece la esporulación.

COMPOSICIÓN

- | | |
|------------------|-------------------|
| - Peptona | 10g. |
| - Glucosa | 20g. |
| - Agar | 15g. |
| - Agua destilada | 1 000 mL |
| - pH final | 7,0 ± 0,2 a 25 °C |

PREPARACIÓN

1. Mezclar los ingredientes y hacerlos hervir hasta su disolución completa.
2. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
3. Dispensar en tubos o placas (si se utilizan tubos de cristal, también se puede dispensar antes de esterilizar).
4. Solidificar en posición inclinada.
5. Controlar la esterilidad colocando el medio envasado en una incubadora a 37 °C por 24 horas y mantener el medio envasado en la refrigeradora hasta el momento de usarlo.
6. El medio debe ser de color ámbar, transparente.

AGAR PAPA GLUCOSADO

Es un medio para la estimulación de la formación de conidias, en la preparación de inóculos de hongos miceliales y en la estimulación de producción de pigmento rojo en *Trichophyton rubrum*, rosa salmón en *Microsporium audouinii* y amarillo en *Microsporium canis*.

COMPOSICIÓN

- Papa	200 g
- Glucosa	10 g
- Agar	18 g
- Agua destilada	1 000 mL
- pH final	5,6 ± 0,2 a 25 °C

PREPARACIÓN

1. Pelar las papas, cortarlas en cubos y hervir en agua durante 1 h.
2. Filtrar con papel whatman N.º 2, añadir la glucosa y el agar y hervir hasta disolver el agar completamente.
3. Ajustar el volumen a un litro.

4. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
5. Dispensar en placas Petri o tubos.
6. Controlar la esterilidad colocando el medio envasado en una incubadora a 37 °C por 24 horas y mantener el medio envasado en la refrigeradora hasta el momento de usarlo.
7. El medio debe ser de color ámbar, transparente.

SECRECIONES

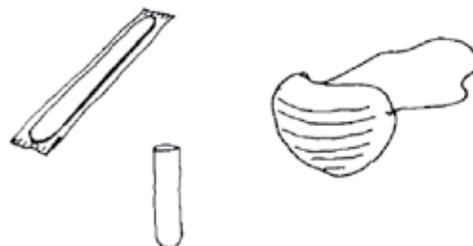
OBTENCIÓN DE SECRECIONES	
FARÍNGEAS.....	325
Materiales	325
Método de obtención	325
OBTENCIÓN DE SECRECIÓN ÓTICA	327
Materiales	327
Método de obtención	327
OBTENCIÓN DE SECRECIÓN URETRAL	328
Materiales	328
Método de obtención	328
OBTENCIÓN DE SECRECIÓN VAGINAL.....	330
Materiales	330
Método de obtención	330
PREPARACIÓN DE FROTIS	332
Materiales	332
Método.....	332
TINCIÓN DE GRAM.....	335
Principios generales	335
Reactivos.....	335
Método.....	335
Lectura.....	336
MICROORGANISMOS QUE SE OBSERVAN EN EL FROTIS	338
Examen directo de frotis con tinción de Gram.....	338



OBTENCIÓN DE SECRECIONES FARÍNGEAS

MATERIALES

- Hisopos de algodón estéril en tubos de ensayo, para recolectar las muestras.
- Un baja lengua estéril.
- Una mascarilla protectora.
- Tubo estéril.



MÉTODO DE OBTENCIÓN

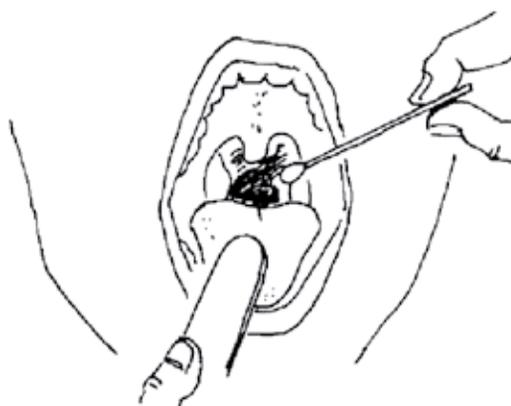
1. El paciente debe permanecer sentado en la posición más cómoda y con la mejor iluminación (se puede usar una linterna).
2. Indicar al paciente que abra la boca sin sacar la lengua y que diga "ahhh...".

3. Mientras el paciente dice "ahhh...", bajar las 2/3 anteriores de la lengua con el bajalengua, empleando la mano izquierda.

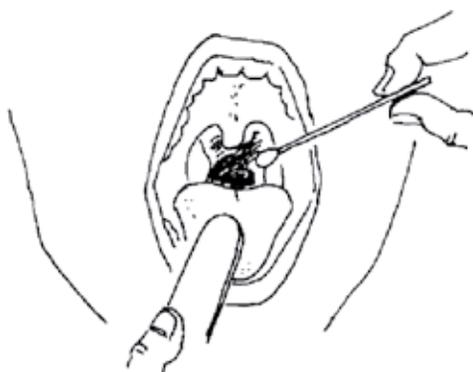
4. Se deberá observar las amígdalas (A), el fondo de la faringe limitada por los pilares (P) y úvula (U).



5. Introducir el hisopo con la mano derecha. **Evitar** tocar la lengua, que se encuentra cubierta de microorganismos.



6. Ubicar el lugar inflamado de la garganta (amígdalas o pilares). Estará enrojecida o blanca, según sea el caso.



7. Frotar el hisopo con firmeza en la parte inflamada, haciéndolo girar y, si existen membranas, recójalas con el hisopo.

8. Si no se encuentra inflamación pasar el hisopo por las amígdalas, los pilares. Evitar tocar la úvula.

9. Introducir el hisopo con la muestra en el tubo estéril.



OBTENCIÓN DE SECRECIÓN ÓTICA

MATERIALES

- Hisopo de algodón no demasiado abultado.
- Tubo estéril.

MÉTODO DE OBTENCIÓN

1. Si el pus sale al exterior y llena el pabellón de la oreja, es preferible eliminado previamente con algodón estéril.



2. Introducir el hisopo en el conducto auditivo externo siguiendo una dirección ligeramente oblicua de atrás hacia adelante y de abajo hacia arriba.

3. Introducir el hisopo con la muestra en el tubo estéril.



OBTENCIÓN DE SECRECIÓN URETRAL

MATERIALES

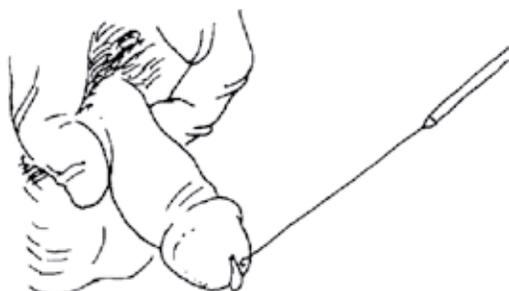
- Asa bacteriológica estéril o hisopo estéril de alambre delgado y de algodón no demasiado abultado.
- Guantes quirúrgicos estériles.
- Solución salina estéril.
- Tubo con medio de transporte.



MÉTODO DE OBTENCIÓN

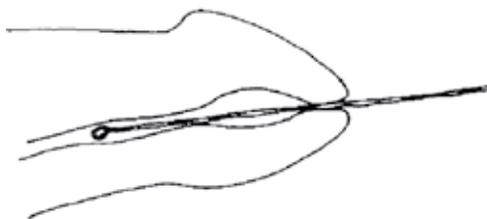
1. Tomar la muestra a primera hora de la mañana, antes de que el paciente haya orinado.

2. Limpiar el meato con algodón humedecido con solución salina estéril.

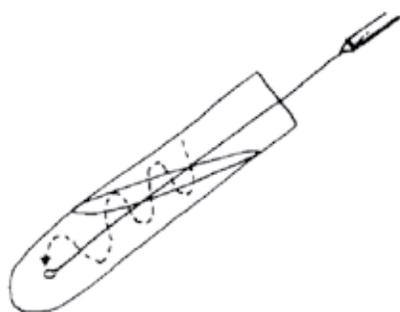


3. Aplicar al pene una ligera presión (desde atrás), de manera que salga una gota de secreción (pus) por el meato.

4. Si la gota de pus no aparece introducir el asa o hisopo estéril en el conducto uretral anterior, hasta una profundidad de 2,5 cm aproximadamente para obtener la muestra.



5. Tomar el pus con el asa o hisopo estéril e introducirlo en el tubo con medio de transporte.



OBTENCIÓN DE SECRECIÓN VAGINAL

- ◆ La muestra debe ser tomada del conducto cervical por un médico o por personal de salud capacitado.
- ◆ En los casos de gonorrea crónica se deberá tomar inmediatamente antes o inmediatamente después del periodo menstrual.

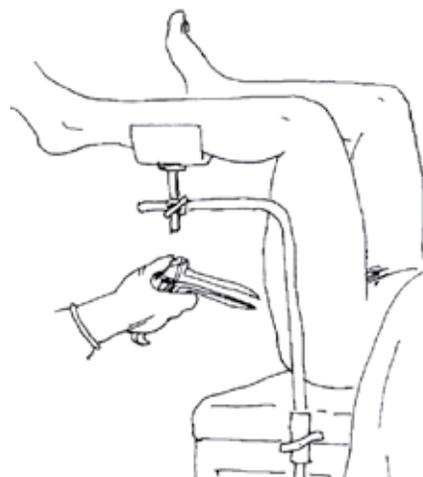
MATERIALES

- Hisopo estéril de alambre delgado y de algodón no demasiado abultado.
- Guantes quirúrgicos estériles.
- Espéculo estéril.
- Tubo con medio de transporte.

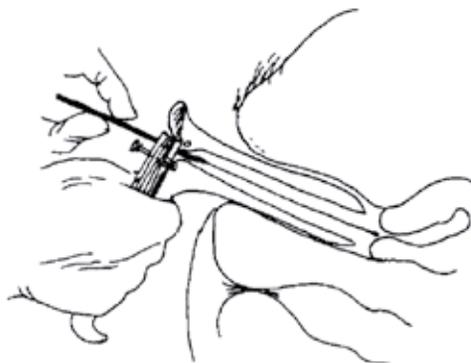


MÉTODO DE OBTENCIÓN

1. Colocar a la paciente en posición ginecológica.
2. Entrearbrir la vulva.
3. Introducir un espéculo humedecido en agua tibia en la vagina. **No usar lubricante.** Visualizar el cuello uterino.



4. Introducir el hisopo estéril dentro del canal cervical rotándolo suavemente y permitiendo que permanezca allí por 10 - 30 segundos; retirar y colocar en un tubo estéril o en un tubo con medio de transporte.



¡ATENCIÓN!

- ◆ En mujeres que no han tenido relaciones sexuales se puede tomar la muestra a través del orificio vaginal con un hisopo estéril.

PREPARACIÓN DE FROTIS

- ◆ El examen microscópico directo de **frotis teñidos** constituye una manera eficiente para estudiar la presencia de bacterias en medios biológicos que normalmente son estériles, como el líquido cefalorraquídeo y el líquido pleural.
- ◆ También se aplica a la orina centrifugada, esputo, pus y muestras que provienen del cuello del útero, vagina, bronquios, etc.

MATERIALES

ASA DE SIEMBRA

- ◆ Es un alambre, con una aleación de níquel y cromo, que por un extremo se fija a un mango que lo sostiene y por el otro extremo se dobla formando un pequeño círculo de aproximadamente 2mm.



PORTAOBJETOS

- ◆ Se debe limpiar con una mezcla de etanol y éter, mediante una gasa. El portaobjetos deberá estar rotulado.

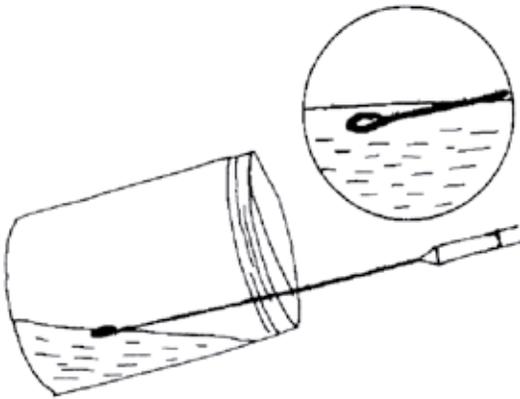


MECHERO DE BUNSEN O DE ALCOHOL**MÉTODO**

1. Flamear el asa de siembra hasta que se ponga al rojo vivo, para lograrlo, colocar el asa por arriba de la porción azul de la llama, en posición vertical.



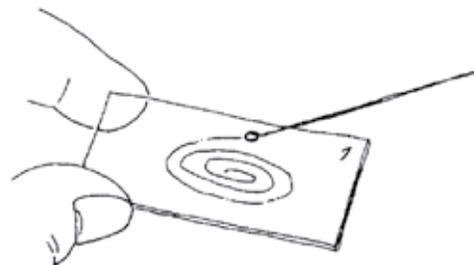
2. Dejar enfriar el asa, contar hasta 20.



3. Tomar una porción de la muestra que se va a examinar, colocando el asa en posición plana en la superficie del líquido.

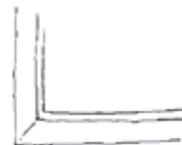
4. Colocar el asa sobre el portaobjetos y aplanar ligeramente en el centro de este.

5. Sosteniendo todavía el asa aplanada sobre el portaobjetos, mover trazando un espiral del centro a la periferia.

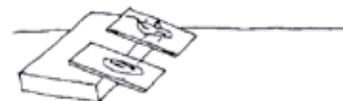


6. Dejar cierto espacio entre la muestra y cada uno de los cuatro lados del portaobjetos.

7. Dejar secar la muestra completamente al aire.

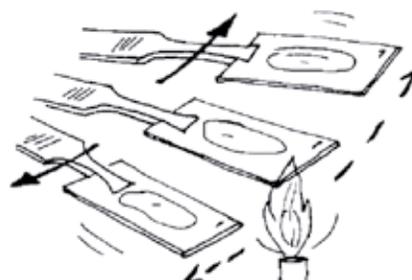


8. En caso de frotis para diagnóstico citológico (cuello de útero, vagina, etc.), los frotis no se deben dejar secar, pues se alteraría la morfología de las células. En cuanto estén listos y mientras están húmedos todavía, se fijan con alcohol absoluto y éter o laca especial en *spray*.

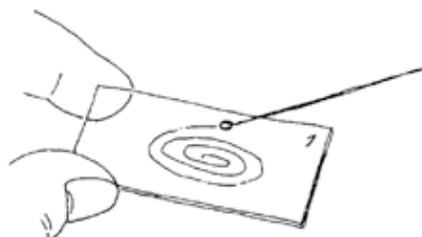


9. Flamear de nuevo el asa hasta que esté al rojo vivo para destruir las bacterias que se encuentren en ella, una vez usada.

10. Proceder a fijar, pasando el portaobjetos tres veces a través de la llama del mechero de Bunsen, con la muestra hacia arriba. Dejado enfriar antes de aplicar la tinción.



11. Hacer la tinción de frotis fijo, se tiene la tinción de Gram, de Ziehl y Neelsen.



12. Es preferible marcar un círculo alrededor del frotis con un lápiz grueso, a fin de que se pueda ver más fácilmente.

TINCIÓN DE GRAM

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La tinción Gram sirve para clasificar las bacterias en dos grupos:
 - **Bacterias grampositivas**, que se tiñen de azul violáceo oscuro.
 - **Bacterias gramnegativas**, que se tiñen de rojo, grosella o rosado.

REACTIVOS

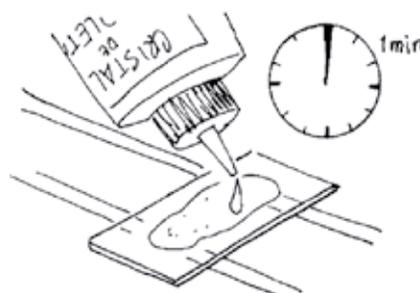
- Solución de cristal violeta al 1 %.
- Solución de safranina.
- Solución de Lugol.
- Alcohol acetona.
- Agua corriente.



VII

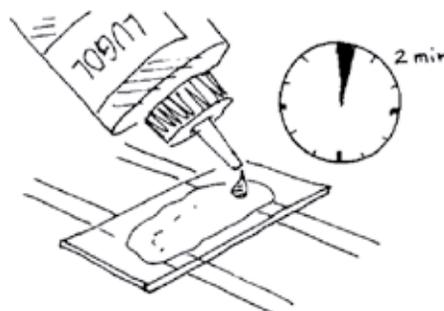
MÉTODO

1. Fijar el frotis por calor suave y dejarlo enfriar.
2. Cubrir el frotis con **cristal violeta al 1 %**, dejando que el colorante actúe **por 1 minuto**.



3. **Enjuagar suavemente** la preparación con agua corriente y dejarla escurrir.

- Cubrir el frotis con **solución lugol**, dejando actuar por **2 minutos**.



- Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente.
- Cubrir el frotis con **alcohol acetona por 1 minuto**.
- Enjuagar suavemente** con agua corriente.
- Cubrir el frotis con **solución de safranina, por 30 segundos**
- Enjuagar suavemente** con agua corriente y **dejar secar la preparación al aire libre**.



LECTURA

- ◆ Observar al microscopio, utilizando el lente de inmersión.
- ◆ Se deberá buscar:

Bacterias grampositivas:

Se tiñen de azul violáceo oscuro, como estafilococo, estreptococos neumococos enterococos, etc.

Bacterias gramnegativas:

Se tiñen de color rojo, grosella o rosado, como gonococos, vibrios, enterobacterias.

 **¡ATENCIÓN!****◆ Puede ocurrir reacción grampositiva falsa porque:**

- El frotis se ha fijado antes de que estuviera seco.
- El frotis ha sido demasiado grueso.
- Quedaron sedimentos en el frasco de la solución cristal violeta (debe filtrarse antes de usarlo).
- La solución de lugol no se escurrió completamente.
- La solución de safranina se dejó demasiado tiempo en el frotis.

◆ Puede ocurrir reacción gramnegativa falsa porque:

- No se dejó actuar suficiente tiempo la solución de lugol.
- El alcohol acetona se dejó demasiado tiempo en el frotis y no se lavó adecuadamente.

MICROORGANISMOS QUE SE OBSERVAN EN EL FROTIS

EXAMEN DIRECTO DE FROTIS CON TINCIÓN DE GRAM

a. Cocos grampositivos de forma redonda

♦ Se pueden encontrar en:

- Racimo (estafilococo).
- Cadenas (estreptococos).
- Pares (neumococo).
- Grupos de cuatro, etc.



♦ Se observan en muestras de pus, orina, sangre y otras.

b. Diplococos gramnegativos en pares

♦ Se pueden encontrar:

- Asemejando granos de café o arriñonado.
- Formando racimos en el citoplasma de un leucocito.



♦ Se observan en muestras de pus provenientes de la uretra (gonococo) y del líquido cefalorraquídeo (meningococo). Existen otros diplococos que generalmente no son patógenos y se observan en muestras de exudado faríngeo o de esputo.

c. *Bacilos grampositivos semejantes a bastoncillos*

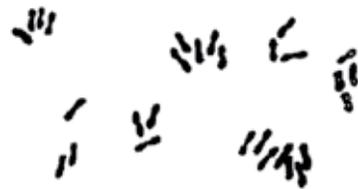
BACILOS GRAMPOSITIVOS CON ESPORAS

- ◆ Son largos, gruesos y pueden terminar en extremos cuadrados (ántrax) o romos (tétanos).
- ◆ La espora es una amplia zona incolora, en el interior del bacilo, que no se tiñe con la coloración de Gram.



BACILOS GRAMPOSITIVOS SIN ESPORAS

- ◆ Son pequeños y de formas variables, y los extremos pueden estar ensanchados; se agrupan en hileras o parecen formar letras.
- ◆ Se observan en muestras de exudado faríngeo, sangre, piel, etc. (difteria, listeria, etc.)



VII

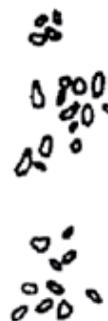
d. *Bacilos gramnegativos*

- ◆ Son de tamaño variable, con extremos redondeados o agudos.
- ◆ Pueden ser largos y rectos (bacilos coleriformes), con forma de coma (vibrio) o cortos y gruesos (proteus).



e. *Cocobacilos gramnegativos*

- ◆ Su forma es variable; no son tan redondos como los cocos, ni tan alargados como los bacilos (*haemophilus*).
- ◆ Se pueden encontrar en diversas muestras.



f. *Levaduras y actinomicetos*

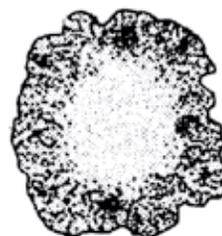
LEVADURAS

- ◆ Son de tamaño variable, aunque mayores que las bacterias, puede observarse gemación.
- ◆ Se puede observar como patógenas en exudado genital.



ACTINOMICETOS

- ◆ Gránulos voluminosos que a veces pueden observarse a simple vista (su color varía entre blanco y amarillo).
- ◆ El centro es gramnegativo y la periferia grampositiva. Se encuentran en muestras de pus cutáneo, esputo, etc.



BACTERIOLOGÍA

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	343	ANTIBIOGRAMAS.....	368
Principios generales	343	Principios generales	368
Preparación de los principales medios de cultivo..	344	Método.....	368
Métodos de siembra en medios de cultivo	355	Lectura.....	368
Métodos.....	356	DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE	
Lectura e Informe de una muestra cultivada	358	GONORREA	370
UROCULTIVO.....	361	Principios generales	370
Principios generales	361	Examen directo.....	370
Materiales	362	Identificación presuntiva de <i>Neisseria</i>	
Método.....	362	<i>gonorrhoeae</i>	375
Lectura e Interpretación.....	362	Identificación confirmatoria de <i>Neisseria</i>	
HEMOCULTIVOS.....	364	<i>gonorrhoeae</i>	375
Principios generales	364	Informe	375
Elección del medio para hemocultivo	364	DIAGNÓSTICO DE <i>Yersinia pestis</i>.....	376
Obtención de la muestra	365	Principios generales	376
Lectura del hemocultivo.....	366	Obtención de muestras	377
Microorganismos que se pueden encontrar en los		Procesamiento de muestras.....	379
hemocultivos.....	367		

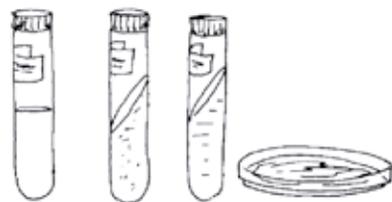
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Las bacterias requieren de **medios de cultivo** que contengan sustancias nutritivas parecidas en lo posible al medio natural en el que viven y se reproducen.
- ◆ Es importante conocer la procedencia de la muestra, para escoger el medio de cultivo apropiado que permita el crecimiento del microorganismo que se necesita estudiar.
- ◆ **Las sustancias nutritivas**, que contienen los medios de cultivo son:
 - Compuestos orgánicos nitrogenados.
 - Compuestos inorgánicos.
 - Sustancias energéticas, etc.
- ◆ Los medios de cultivo se agrupan de acuerdo con:

Su estado físico

- Medio líquido.
- Medio sólido.
- Medio semisólido.



Los requerimientos para el diagnóstico son:

- **Medios nutritivos simples**
Se usa para el cultivo de la mayoría de las bacterias. Ejemplo: caldo y agar nutritivo.
- **Medios nutritivos enriquecidos**
Permite el crecimiento de microorganismos exigentes en sus requerimientos nutritivos. Ejemplo: agar sangre y agar chocolate.

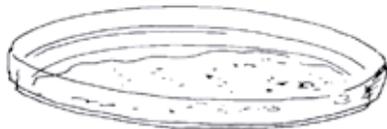
- **Medios selectivos o especiales**
Permiten solo el crecimiento de la especie que se desea aislar. Contienen sustancias que impiden el desarrollo de algunos grupos bacterianos, favoreciendo a su vez el desarrollo de otros. **Ejemplo:** agar Mac Conkey, agar hipertónico de Chapman, etc.
- **Medios diferenciales**
Ponen de manifiesto la actividad bioquímica de un microorganismo, lo cual permite diferenciarlo de otro parecido.
- **Medios para transporte**
Permite el transporte y la viabilidad de microorganismos. **Ejemplo:** el medio de Stuart es útil para el transporte y conservación de la viabilidad del gonococo hasta por 24 horas.

PREPARACIÓN DE LOS PRINCIPALES MEDIOS DE CULTIVO

- ◆ **Se debe asegurar** el máximo porcentaje de sustancias nutritivas de crecimiento.
- ◆ Debe adaptarse la reacción final del medio de cultivo, a un **pH óptimo** para los microorganismos que se van a cultivar, con errores no mayores de 0,1 de la unidad del pH requerido.
- ◆ No debe olvidarse que una filtración exagerada del medio puede eliminar las sustancias nutritivas.
- ◆ **La esterilización** debe tener un control minucioso de la temperatura y tiempo de duración. La prolongación indebida en el tiempo de esterilización destruye las sustancias nutritivas y se produce una reducción del volumen de los medios.
- ◆ Debe usarse durante la preparación de los medios solo **recipientes de cristal**, de preferencia Pyrex o similares.
- ◆ La repartición de los medios de cultivo se realiza siempre cerca del mechero de Bunsen (o de alcohol), en tubos o placas Petri. En los tubos se debe formar un plano inclinado y en las placas se debe tener una distribución homogénea.
- ◆ Los medios de cultivo contenidos en tubos se conservan mejor en refrigeración, ya que se disminuye la evaporación.

- ◆ Se tiene medios inclinados en tubo y medios en placa Petri:

- **Medios inclinados en tubo**, se emplea principalmente para resembrar cepas aisladas previamente, con la finalidad de identificarlas.



- **Medios en placa Petri**, se emplea principalmente para permitir el crecimiento de colonias individualmente aisladas. Las placas se colocan en la estufa con la base hacia arriba.

- ◆ Debe seguirse al pie de la letra las instrucciones escritas en relación con la preparación de medios de cultivo, debiendo usarse exclusivamente, productos químicamente puros, a no ser que se indique lo contrario.

- ◆ En casas comerciales los medios se adquieren en **forma deshidratada**. Se debe registrar en el recipiente del medio deshidratado la fecha de recepción y de apertura. Entre uso y uso, se debe almacenar como se indica en la etiqueta, con escasa luz, baja humedad ambiental, y con el recipiente fuertemente tapado.



- ◆ Antes de empezar a usar un nuevo lote de medios de cultivo, realizar un control de calidad del medio.

a. Medios nutritivos simples

CALDO NUTRITIVO

COMPOSICIÓN

- Extracto de carne	0,3 g
- Peptona	1,0 g
- Dextrosa	0,5 g
- Cloruro de sodio	0,5 g
- Agua destilada	100 mL
- pH	7,0 - 7,4

PREPARACIÓN

1. Disolver en agua destilada los ingredientes previamente pesados.
2. Someter a la acción del calor, agitando constantemente hasta llegar al primer hervor.
3. Ajustar el pH con las tiras indicadoras de pH. Si está por debajo de un pH de 6,8 (ácida) agregar gota a gota la solución de NaOH, si por el contrario esta por encima de 7,4 (alcalino) agregar gota a gota la solución de HCL hasta el pH adecuado (7,0 - 7,4).
4. Envasar el medio en tubos y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.
5. Controlar la esterilidad colocando el medio envasado en una incubadora a 37 °C por 24 horas.
6. Mantener el medio envasado en la refrigeradora hasta el momento de usarlo.



AGAR NUTRITIVO

COMPOSICIÓN

- Extracto de carne	3 g
- Peptona	5 g
- Agar	15 g
- Agua destilada	1 000 mL
- pH final	6.8 ± 0,2 a 25 °C

PREPARACIÓN

1. Disolver los ingredientes previamente pesados en 1 000 mL de agua destilada, cuidando de disolver primero el agar.
2. Someter a la acción del calor y calentar hasta el primer hervor para que se disuelva por completo, agitando constantemente.
3. Ajustar el pH con las tiras indicadoras de pH. Si está por debajo de un pH de 6,8 (ácida) agregar gota a gota la solución de NaOH, si por el contrario está por encima de 7,0 (alcalino) agregar gota a gota la solución de HCL hasta el pH adecuado (6,8 - 7,0).
4. Envasar el medio en tubos o placas de Petri y llevados a esterilizar al autoclave.
5. Controlar la esterilidad colocando el medio envasado en una incubadora a 37 °C por 24 horas y mantener el medio envasado en la refrigeradora hasta el momento de usarlo.
6. El medio debe ser de color ámbar claro, de transparente a ligeramente opalescente.

b. Medios nutritivos enriquecidos

AGAR SANGRE

1. En un frasco licuar 100 mL de agar nutritivo esteril, en baño maría a 55 °C.
2. Dejar enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45 °C, es decir, hasta que el calor sea soportable en el dorso de la mano.
3. Agregar 5 mL de sangre citrada o desfibrinada de carnero con una pipeta estéril. Agitar por rotación en forma suave, con el fin de obtener una buena mezcla y evitar la formación de burbujas.
4. Su color normal debe ser rojo cereza homogéneo.
5. Repartir el contenido en placas Petri estériles y dejar solidificar.
6. Controlar la esterilidad en incubadora a 37 °C, por 24 horas.
7. Mantener el medio envasado en la refrigeradora.

AGAR CHOCOLATE

1. Preparar agar sangre hasta obtener su color normal rojo cereza.
2. Llevar el agar sangre antes de su solidificación al baño maría a 80 °C por 10 minutos. Por el calentamiento, el color rojo cereza cambiará al chocolate, debido a la ruptura de los hematíes y la salida de la hemoglobina.
3. Durante el calentamiento mezclar constantemente para evitar la formación de precipitado (grumos).

4. Repartir con mucho cuidado en las placas Petri para evitar la formación de burbujas.
5. Otra manera de preparar agar chocolate es utilizar como base un agar de Mueller Hinton mezclado con sangre de carnero.

c. **Medios selectivos o especiales**

AGAR MAC CONKEY

COMPOSICIÓN

- Peptona	17,0	g
- Proteosa peptona	3,0	g
- Lactosa	10,0	g
- Sales biliares	1,5	g
- Cloruros de sodio	5,0	g
- Agar	13,5	g
- Rojo neutro	0,03	g
- Cristal violeta	0,001	g
- pH	7,1	

PREPARACIÓN

1. **Para rehidratar el medio se suspenden 50 gramos de agar Mac Conkey en 1 000 mL de agua destilada fría.**
2. Calentar hasta el punto de hervor para disolver el medio completamente.
3. Esterilizar en la autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
4. Cuando el medio se ha enfriado a 50 °C, repartir en placas Petri más o menos 20 a 25 mL por placa.

AGAR SALMONELLA SHIGELLA (SS)

COMPOSICIÓN

- Extracto de carne	5,0	g
- Proteosa peptona	5,0	g
- Lactosa	10,0	g
- Sales biliares	8,5	g
- Citrato de sodio	8,5	g
- Tiosulfato sódico	8,5	g
- Citrato férrico	1,5	g
- Agar	13,5	g
- Verde brillante	0,00033	g
- Rojo neutro	0,025	g
- pH	7,0 ± 0,1	

PREPARACIÓN

1. Para rehidratar el medio preparado se suspende 60 gramos de agar salmomella shiguella en 1 000 mL de agua destilada fría.
2. Calentar hasta punto de hervor para disolverlo por completo.
3. Repartir el medio en placas Petri, más o menos 20 a 25 mL por placa.

¡ATENCIÓN!

- ◆ No se debe esterilizar en autoclave.

AGAR TRIPLE AZÚCAR HIERRO (TSI)

COMPOSICIÓN

- Extracto de carne	3,0	g
- Extracto de levadura	3,0	g
- Peptona	15,0	g
- Proteosa peptona	5,0	g
- Lactosa	10,0	g
- Sacarosa	10,0	g
- Glucosa	1,0	g
- Sulfato ferroso	0,2	g
- Tiosulfato de sodio	0,3	g
- Agar	15,0	g
- Rojo de fenol	0,024	g
- Cloruro de sodio	5,0	g

PREPARACIÓN

1. Pesar 65 g de agar triple azúcar hierro (TSI) para 1 000 mL de agua destilada.
2. Calentar al fuego hasta mezclar completamente.
3. Esterilizar a 121 °C, durante 15 minutos.
4. Repartir en tubos, de tal manera que queden con 2,5 cm de fondo y 3,5 cm de tendido (medio inclinado).

THAYER-MARTIN MODIFICADO

COMPOSICIÓN

- Agar	10	g
- Medio base para gonococos (GC)	36	g
- Hemoglobina	10	g
- Suplemento nutritivo	10	mL
- Solución de antibióticos	10	mL
- Agua destilada	1 000	mL
- pH final	7,2 ± 0,2 a 25 °C	

PREPARACIÓN

1. En un matraz de 250 mL colocar 125 "perlas de vidrio" (que sirven para obtener una buena mezcla) agregar los 10 g de hemoglobina y 125 mL de agua destilada, agitar hasta observar completa disolución.
2. En una probeta de 500 mL colocar un embudo de vidrio con filtro de gasa -algodón - gasa (a manera de sandwich) para filtrar la solución de hemoglobina. Completar a 500 mL con agua destilada y al final, colocar esta solución en un matraz de 2 L para ser esterilizada en la autoclave.
3. En un matraz de 2 L mezclar 36 g de medio de GC base y 10 g de agar en 500 mL de agua destilada, calentando hasta hervir para disolver completamente.
4. Esterilizar por separado el agar base GC y la solución de hemoglobina en autoclave a 121 °C por 15 minutos.
5. Mantener estas soluciones estériles en baño maría a la temperatura de 50 - 56 °C.
6. Rehidratar el suplemento nutritivo con líquido rehidratante estéril y agitar para asegurar una completa disolución. Seguir las instrucciones del fabricante.
7. Rehidratar la solución de antibióticos con agua destilada estéril y dejar reposar 20 minutos. Seguir las instrucciones del fabricante.



8. Agregar al medio base 10 mL de suplemento nutritivo y 10 mL de solución de antibióticos, mezclando suavemente.
9. Mezclar suavemente la solución de hemoglobina al agar base y mantener en baño maría a la temperatura de 50 - 56 °C hasta el momento de repartir el medio.
10. Repartir en placas Petri estériles entre 15 a 20 mL por placa de 100 mm de diámetro.

¡ATENCIÓN!

- ◆ Los medios que no van a ser utilizados deben conservarse a temperatura de refrigeración (aproximadamente durante 6 meses) protegidos con bolsas de plástico, con la finalidad de reducir al mínimo la deshidratación.
- ◆ Los medios almacenados a temperatura ambiente se conservan entre 2-3 semanas.

d. Medios de transporte

MEDIO DE CARY Y BLAIR

COMPOSICIÓN

- Fosfato disódico	1,1	g
- Cloruro de sodio	5,0	g
- Tioglicolato de sodio	1,5	g
- Agar	5,0	g
- Agua destilada	991	mL
- pH final	8,4	

PREPARACIÓN

1. Colocar los ingredientes en un balón con el agua destilada.
2. Calentar en baño maría hasta que la solución esté clara (no se permite que hierva).
3. Enfriar a 50 °C. Agregar 9 mL de solución de cloruro de calcio al 1 % recién preparada y ajustar el pH a 8,4 con NaOH 10 N gota a gota.
4. Colocar cantidades de 5 a 7 mL en tubos con tapas de rosca (aflojado) estériles de 13 x 100 mm.
5. Esterilizar (no en autoclave) a 100 °C en baño maría hirviendo durante 15 minutos. Se aprietan las tapas después de la esterilización.

¡ATENCIÓN!

- ◆ El medio es bastante estable si se almacena en un lugar fresco y oscuro y no se permite que se seque.
- ◆ Este medio se puede utilizar mientras no presente pérdida de volumen contaminación, ni cambio de color.

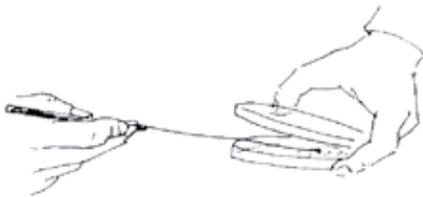
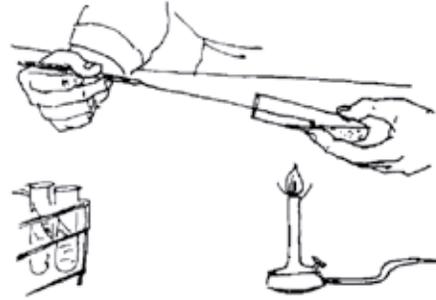
MEDIO TRANSGROW – TG

- ◆ Este medio está compuesto por agar Thayer Martin modificado al cual se le agrega bicarbonato de amonio hasta lograr una concentración final de 0,1 %.

MÉTODOS DE SIEMBRA EN MEDIOS DE CULTIVO

- ♦ **La siembra** es el procedimiento por el cual se pone en contacto el microorganismo con un medio de cultivo, para que en condiciones óptimas de temperatura y tiempo de incubación pueda desarrollarse y multiplicarse in vitro.

- ♦ **Siempre debe** trabajarse cerca del mechero de Bunsen para flamear la boca del tubo o la placa Petri con el medio, antes y después de sembrar para evitar contaminaciones.



- ♦ **Para sembrar en placa Petri** es importante que la superficie del medio este completamente seca, para conseguir esto las placas deben quedar en reposo durante 2 horas.

MATERIALES

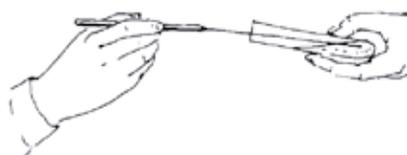
- Muestras para cultivar.
- Tubos y placas Petri con medios de cultivo
- Asas de siembra.
- Aguja de platino.
- Mechero de Bunsen.



MÉTODOS

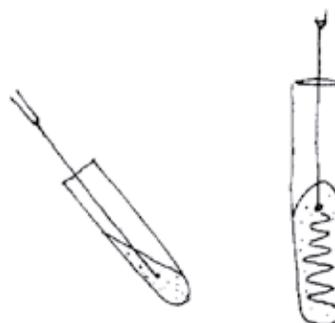
a. Método por inoculación en medio líquido

1. El asa de siembra debe ser esterilizada en la llama (flameada) y enfriada.
2. Tomar con el asa de siembra una cantidad suficiente de la muestra.
3. Introducir el asa de siembra con la muestra hasta el fondo del tubo con medio líquido, sin tocar las paredes del mismo.



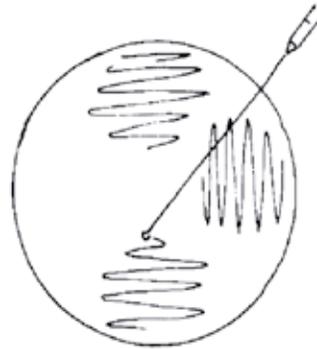
b. Método por estría en medio sólido en tubo

1. El asa de siembra debe ser esterilizada en la llama (flameada), y enfriada.
2. Tomar una pequeña muestra con el asa de siembra.
3. Deslizar el asa de siembra suavemente en zigzag en el tubo con medio sólido, empezando desde el fondo del tubo.



c. Método por dispersión - agotamiento en medio sólido en placa Petri

1. El asa de siembra debe ser esterilizada a la llama (flameada), y enfriada.
2. Tomar con el asa de siembra una cantidad suficiente de muestra.
3. El asa debe ser sostenida suavemente entre los dedos con cuidado de no hundida en el medio.
4. Sembrar en el medio sólido en placa Petri, dividido en cuatro cuadrantes, inoculando la muestra en cantidades sucesivamente menores en cada cuadrante. Cada cuadrante presentará diferente distribución de colonias.



d. Método por puntura en medio semisólido en tubo

1. La aguja de platino debe ser esterilizada a la llama (flameada), y enfriada.
2. Tomar con la aguja de platino (o alambre recto), una pequeña cantidad de muestra.
3. Sembrar en el agar semisólido introduciendo la aguja en forma vertical. Debe tenerse cuidado en hacer que el trayecto de salida sea el mismo que el de entrada.



LECTURA E INFORME DE UNA MUESTRA CULTIVADA

- ◆ Una vez sembrada, se rotula correctamente para identificarla y se incuba a 37 °C.
- ◆ Algunos microorganismos requieren atmósfera con un 3 - 5% de CO₂ Y otros como los anaerobios que requieren una atmósfera privada de oxígeno (O₂).
- ◆ El período de incubación para los microorganismos patógenos comunes es de 18 - 24 horas, al término del cual los cultivos se sacan del incubador, se observa su crecimiento estudiando sus características.
- ◆ Entre las características de las colonias se debe detallar:

- **Forma**

Circular, elíptica puntiforme, filamentosa, etc.



- **Elevación**

Plana convexa, umbilicada, etc.



- **Borde**

Entero, ondulado, dentado, filamentoso, etc.



- **Superficie**

Lisa, rugosa, granular.

- **Tamaño**

Medida del diámetro en milímetros.

- **Consistencia**

Membranosa, cremosa mucosa, etc.

- **Pigmentación**

Amarilla, blanca, gris negra, etc.

- **Olor**

Pútrido, alcohólico, etc.



En ocasiones esta descripción puede llevar al diagnóstico presuntivo del género y especie de que se trata.

- ◆ Posteriormente de una de las colonias, se debe hacer una coloración Gram para determinar:
 - Morfología.
 - Característica de la tinción.
 - Agrupación.

- ◆ El aislamiento y pureza de la cepa aislada son indispensables. Debe pasarse a distintos sustratos para:
 - Llegar a la identificación por pruebas bioquímicas
 - Realizar pruebas de sensibilidad antibiótica.

CLASIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES MEDIOS DE CULTIVO

Medios de cultivo	Principales medios
Nutritivos	Agua peptonada, agar nutritivo, caldo nutritivo.
Enriquecidos	Agar sangre, agar chocolate.
Selectivos	Mac-Conkey, telurita, agar Sabourand, Lowenstein- Jensen, Selenia F, SS, corazón-cerebro, Thayer-Martin, TSI, LIA.
Diferenciales	Carbohidratos, agar con úrea, agar con citrato, gelatina, descarboxilasa.
Transporte	Stuart, Amies, Transgrow, Cary y Blair.

CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

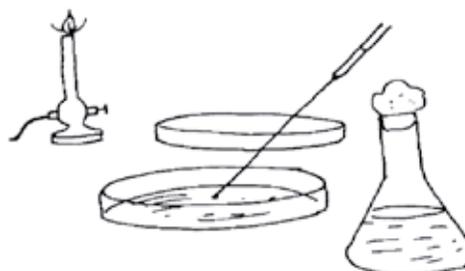
- ◆ Para el control de calidad de los medios de cultivo: se debe probar cada lote de medio con cepas conocidas, si no se obtienen los resultados característicos debe desecharse el medio.

Medio	Organismo control	Reacciones esperadas
Agar Mac-Conkey	<i>Escherichia coli.</i>	Colonias rojas.
	<i>Proteus mirabilis.</i>	Colonias incoloras.
Agar Salmonella-Shigella	<i>Salmonella enteritidis.</i>	Colonias incoloras con centros rojos.
Agua peptonada(Indol)	<i>Escherichia coli.</i>	Siempre rojo (+).
	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>	No rojo (-).
Motilidad	<i>Proteus mirabilis.</i>	Móvil
	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>	No móvil



UROCULTIVO

PRINCIPIOS GENERALES



- ◆ Los cultivos son **esenciales para determinar la identidad y cantidad exacta de las bacterias** y para reconocer si los microorganismos encontrados en una muestra son patógenos o inoos (no afectan la salud del hombre y se llaman también "saprofitos").
- ◆ Para hacer el cultivo de la orina, llamado también urocultivo, el paciente no debe haber recibido antibióticos por lo menos cinco días antes del examen.
- ◆ Los cultivos sirven para aislar microorganismos que se encuentran en escasa cantidad y decidir cuál será el antibiótico más efectivo en el tratamiento de la infección (antibiograma).
- ◆ Los cultivos bacterianos pueden ser:
 - Medios sólidos: agar en placas Petri o en tubos.
 - Medios líquidos: tubos con caldos de cultivo.
- ◆ Los microorganismos que frecuentemente se encuentran en la orina infectada:
 - *E. coli*.
 - *Pseudomona aeruginosa*.
 - *Enterococo*.
 - *Citrobacter*.
 - *Klebsiella*.
- ◆ Se acepta que **un recuento superior de 100 000 bacterias por mL de orina, indica infección** de las vías urinarias.

MATERIALES

- Muestra de orina.
- Microscopio.
- Placas de agar Mac Conkey.
- Placas de agar sangre.
- Asa de siembra estándar (calibrada).

MÉTODO

1. Tomar la orina sin centrifugar, con el asa de siembra calibrada, es decir, que cada asada suministre 0,01 o 0,001 mL de orina.
2. Sembrar la orina por dispersión-agotamiento con un asa de siembra calibrada, sobre una placa de agar sangre y otra sobre una placa de agar de Mac Conkey.
3. Rotular e incubar a 37 °C.



LECTURA E INTERPRETACIÓN

- ◆ Detallar las características de las colonias en el agar Mac Conkey y el agar sangre. Seleccionar colonias del agar Mac Conkey y replicar (resembrar) en los medios de diferenciación bioquímica (TSI, citrato, úrea, etc.)
- ◆ Las interpretaciones se harán de acuerdo con las reacciones bioquímicas de las enterobacterias (ver Anexos).

- ◆ Para conocer el número de microorganismos en un 1 mL de orina, se cuentan las colonias y el resultado se multiplica por 100 si se usó asa de 0,01 mL o por 1 000 si se usó asa de 0,001 mL.
- ◆ El resultado será el número de bacterias por ml de orina, considerándose:

Negativo (contaminación)	De 0 - 100 000 bacterias por ml de orina.
Dudoso, discutible y se pueden deber a envió tardío de la muestra al laboratorio, o a una contaminación importante.	De 10 000 - 100 000 bacterias por ml de orina.
Indica infección urinaria	Recuento superior a 100 000 bacterias por mL de orina.

- ◆ Cuando el número de colonias sobrepasa el número de 100 000 bacterias por mL de orina, al informar no interesa precisar el número exacto de bacterias, solo debe informarse "**más de 100 000 bacterias por mL de orina**".

HEMOCULTIVOS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Es la prueba más útil y más frecuentemente usada para demostrar la presencia de bacterias en la corriente sanguínea.
- ◆ El método del hemocultivo consiste en obtener sangre con la más rigurosa técnica de asepsia y añadida a un frasco que contiene un medio de cultivo elegido para aislar un determinado microorganismo (bacteria).
- ◆ Las muestras de sangre para hemocultivo deben obtenerse, antes que el paciente reciba terapia antimicrobiana.
- ◆ Es importante obtener la muestra de sangre, en el momento en que la temperatura del paciente se encuentra elevada. Esto da una mayor probabilidad de tener resultados positivos en el hemocultivo.
- ◆ Se requiere de un mínimo de tres hemocultivos seriados por paciente antes de considerar el caso como negativo.



ELECCIÓN DEL MEDIO PARA HEMOCULTIVO

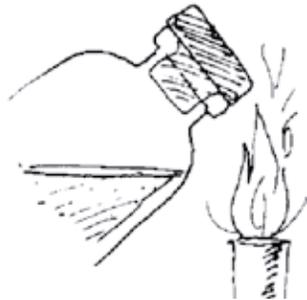
- ◆ La elección del medio depende del microorganismo que se desea aislar.
- ◆ Para la mayor parte de hemocultivos, resultan satisfactorios los medios generales:
 - Infusión corazón-cerebro con agar, este medio permite el desarrollo de bacterias tanto aerobias como anaerobias
 - El caldo de tioglicolato, que se emplea principalmente para cultivar bacterias anaerobias

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

1. Generalmente, se extrae sangre del pliegue del codo, con la más rigurosa técnica de asepsia.



2. Sembrar la mayor cantidad posible de sangre (entre 5 y 10 mL).



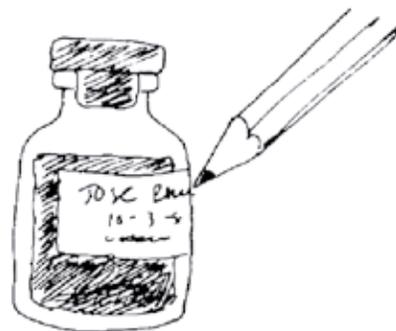
3. El medio de elección se calienta a 37 °C en una estufa de cultivo, y el tapón de caucho del frasco se flamea con alcohol para destruir los microorganismos contaminantes en su superficie.

4. Para llevar el frasco a la cabecera del paciente se cubre el tapón con un algodón mojado de alcohol.

5. Obtenida la muestra de sangre, se retira el algodón del frasco y la aguja de la jeringa se introduce a través del tapón de caucho del frasco, se expulsa la sangre en el medio, se retira la aguja y se mezcla el contenido del frasco.



6. Cada frasco debe rotularse: nombre del paciente, fecha y hora de obtención de la muestra.



LECTURA DEL HEMOCULTIVO

- ◆ Los frascos de hemocultivos inoculados deben inmediatamente incubarse a 35-37 °C.
- ◆ Examinar el frasco diariamente durante la primera semana para detectar la aparición de turbidez en el medio, hemólisis, signos de producción de gas o crecimiento de colonias directamente encima de la sangre.
- ◆ Si los hemocultivos son negativos deben seguir en observación hasta por 21 días antes de informarse como negativos.
- ◆ Los hemocultivos "visualmente positivos" (turbidez del contenido del frasco) deben teñirse por el método de Gram y subcultivarse (resiembras).
- ◆ En los subcultivos (resiembras) se procede de la siguiente manera:
 - Retirar una gota del hemocultivo positivo con todas las precauciones de asepsia, utilizando una jeringa pequeña, con este material se siembra.
 - Sembrar en medios de agar sangre, y otros medios selectivos dependiendo de los resultados de la coloración Gram. Ejemplo: medio de agar Mac-Conkey, para investigar la presencia de microorganismos entéricos gramnegativos. Las placas deben incubarse tanto bajo condiciones aerobias como anaerobias (ver Anexos).



- ◆ Una vez que se han logrado colonias aisladas, debe determinarse su identificación.

- ◆ Los resultados, tanto positivos como negativos, deben comunicarse lo antes posible al médico que lo solicitó.

MICROORGANISMOS QUE SE PUEDEN ENCONTRAR EN LOS HEMOCUL TIVOS

- *Streptococcus viridans*.
- *Streptococcus pyogenes*.
- *Staphylococcus aureus* y *albus*.
- *Diplococcus pneumoniae*.
- *Neisseria meningitidis*.
- *Brucella* sp.
- *Proteus-providence*.
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Enterococos*.
- *Streptococcus anaerobios*.
- *Salmonella* sp.
- *Pasteurella tularensis*.
- *Leptospira* sp.
- *Streptobacillus moniliformis*.
- *Escherichia*.
- *Citrobacter*.
- *Klebsiella*.
- *Haemophilus influenzae*.

ANTIBIOGRAMAS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Es una prueba que se pide cotidianamente al laboratorio, a fin de seleccionar el antibiótico más eficaz en el tratamiento de una infección determinada.
- ◆ Consiste en efectuar un cultivo del microorganismo en el medio más apropiado y después diseminarlo en placa Petri con agar, al que se le colocan discos de papel de filtro impregnados con solución de antibiótico.

MÉTODO

1. Después de preparar las placas Petri con el medio sólido (agar sangre o Muller-Hinton) se distribuye sobre la placa el microorganismo previamente cultivado, en forma uniforme y abundante con un asa de siembra.

Espesor del agar: 4 mm, lo que equivale a:

- 60 mL para las placas de 150 mm de diámetro.
- 25 mL para las placas de 90 mm de diámetro.

2. Colocar los discos sobre este medio sólido con pinzas estériles, dejando 2 cm entre cada uno de ellos.
3. Inmediatamente, llevar a la estufa e incubar a 37 °C durante 12 - 18 horas.

LECTURA

- ◆ Se buscan las **zonas de inhibición (donde no crecen los microorganismos)** alrededor de los discos ("halo claro") que deben ser medidas con una regla en mm, en la parte exterior y reversa de la placa.



- ♦ Una zona de inhibición **indicará sensibilidad o resistencia** del antibiótico correspondiente, según las medidas obtenidas en mm, para lo cual se usará una tabla de medidas, conforme a las instrucciones del fabricante (ver anexo).

¡ATENCIÓN!

- ♦ Los discos deben conservarse a 4 °C
- ♦ La zona de inhibición depende de:
 - El poder de difusión del antibiótico en el medio.
 - El espesor del medio: una placa con espesor grueso permite una difusión vertical mayor del antibiótico, con lo que disminuye la difusión superficial, resultando la zona de inhibición menor.
 - La colocación del disco: un disco colocado verticalmente deja pasar poco antibiótico al medio.
- ♦ Se utilizan discos para determinados microorganismos según sean muestras de:
 - Hemocultivos
 - Urocultivos
 - Coprocultivo
 - Secreciones faríngeas
 - Lesiones de piel
 - Secreciones vaginales
 - Secreciones uretrales, etc

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE GONORREA

PRINCIPIOS GENERALES

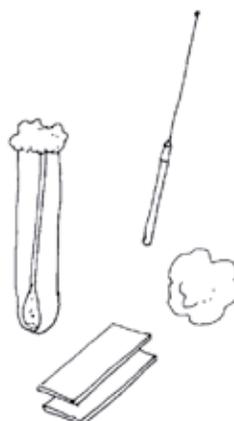
- ◆ Se le denomina *Neisseria gonorrhoeae*, diplococo gram negativo, intracelular, que adopta la forma arriñonada. **Es el agente etiológico de la gonorrea**, enfermedad de transmisión sexual.
- ◆ El período de incubación de la enfermedad es de 4 - 8 días. En el hombre se manifiesta con abundante secreción uretral mucopurulenta. En la mujer, puede no presentar síntomas.
- ◆ Las infecciones más frecuentes causadas por el gonococo son: uretritis cervicitis, proctitis, salpingitis y oftalmía del recién nacido, entre otras.

EXAMEN DIRECTO

- ◆ **El examen directo** es de gran valor para el diagnóstico de la gonorrea en el hombre, en la mujer su utilidad es menor, por tal razón, en este último caso, el cultivo es necesario.

MATERIALES

- Obtención de la muestra: secreción uretral, cervical, faríngea, rectal, ocular.
- Asa bacteriológica estéril.
- Hisopo de algodón estéril.
- Láminas portaobjetos.
- Tinción Gram (ver Anexos).
- Un microscopio.
- Aceite de inmersión.



MÉTODOS

1. De las muestras obtenidas directamente con asa bacteriológica preparar dos frotis tan finos como sea posible que abarque una buena extensión de la lámina portaobjetos.



¡ATENCIÓN!

- ◆ **No debe frotarse vigorosamente**, para evitar alteraciones de la morfología celular.
- ◆ **De las muestras obtenidas por hisopo: este debe rotarse suavemente** sobre la superficie de la lámina portaobjetos, en lugar de frotarla; esto evita que se rompa los leucocitos y así se conserva la morfología típica intracelular.
- ◆ Dejar secar los frotis a temperatura ambiente o con calor suave, para luego realizar la coloración Gram.

LECTURA

- ◆ Con microscopio y objetivo de inmersión (100x), los gonococos se pueden reconocer por las siguientes características:
 - **Son diplococos**, se agrupan en pares, con formas que asemejan riñones.
 - **Son Gram negativos**.
 - **Son intracelulares**, se hallan dentro de los leucocitos.
 - A veces son extracelulares, agrupados en racimos entre leucocitos o cerca de leucocitos rotos.



INFORME

- ◆ **Resultado positivo**
Si se encuentran diplococos intracelulares gramnegativos agrupados en pares, con formas que asemejan riñones.

- ◆ **Resultado sospechoso**
Si solo se observan diplococos gramnegativos extracelulares. Debe confirmarse con cultivo.

- ◆ **Resultado negativo**
No se observa diplococos gramnegativos.

CULTIVOS

- ◆ La *Neisseria gonorrhoeae* se desarrolla en los siguientes medios de cultivo:
 - **Selectivos:** Thayer Martín modificado.
 - **Enriquecidos:** agar chocolate con suplemento de crecimiento.

- ◆ Estos cultivos exigen condiciones especiales de anaerobiosis a pH 7,3 Y con atmósfera de 3 - 10% de CO₂ y 70 - 80% de humedad. Las colonias se desarrollan en 18 - 24 horas.

MATERIALES

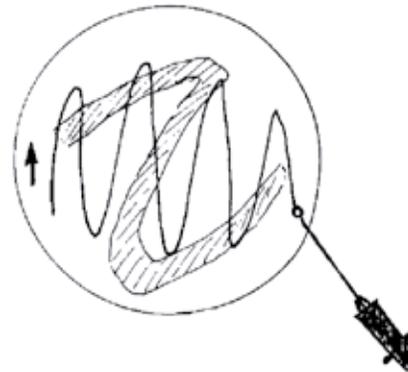
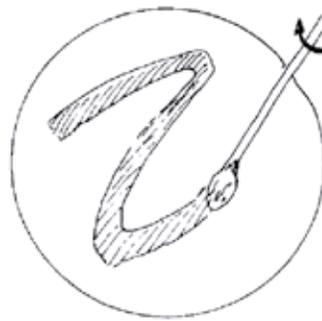
- Obtención de muestra de secreción uretral, cervical, rectal, faríngea, ocular.
- Asa bacteriológica estéril.
- Hisopo de algodón estéril.
- Tubos o placas Petri conteniendo medios de Thayer Martín modificado o agar chocolate con suplemento de crecimiento.
- Estufa a 37 °C.
- Jarra de anaerobiosis o frasco de boca ancha con tapa (tipo lata de café, pintura u otro).

- Vela blanca.
- Gasa o algodón humedecido con agua de caño.

MÉTODO

SI LA MUESTRA HA SIDO TOMADA CON HISOPO

1. Debe sembrarse directamente en la placa conteniendo el medio de Thayer Martin modificado o agar chocolate enriquecido.
2. La siembra se realiza rotando el hisopo sobre el medio, **en forma de "Z"**, procurando depositar toda la muestra y con el mismo hisopo diseminarla en todo el medio, por el método de **dispersión-agotamiento**.



SI LA MUESTRA HA SIDO TOMADA DIRECTAMENTE CON EL ASA

Sembrar sobre el medio de cultivo, en forma de Z y luego con la misma asa se dispersa toda la muestra, por el método de **dispersión agotamiento**.

INCUBACIÓN DE LAS PLACAS SEMBRADAS

- ◆ Debe tener un ambiente que contenga CO₂ y humedad. Este ambiente se logra:
 1. Usando una jarra de anaerobiosis o frasco de boca ancha con tapa (tipo lata de café, pintura u otro), colocar las placas sembradas (en forma invertida) en la jarra de anaerobiosis o frasco de boca ancha con tapa.
 2. En la base de la jarra o en la última placa se coloca sobre una lámina portaobjetos, un pedazo de vela blanca encendida, para proporcionar una atmósfera de 3 - 10% de CO₂; así mismo, se coloca un pedazo de gasa o algodón humedecido con agua de caño para darle una atmósfera de 70 - 80% de humedad (este último paso se repetirá todas las veces que se abra la jarra o frasco).
 3. **Cerrar herméticamente** la tapa de la jarra o frasco e incubar a 37 °C hasta por 72 horas. La vela se apaga cuando se consuma el O₂.

LECTURA

- ◆ Los cultivos deben examinarse cada 18 - 24 horas, hasta por 72 horas.
- ◆ Se informa como resultado negativo si no hay crecimiento de colonias después de 72 horas.
- ◆ Las colonias sospechosas de gonococos, después de 20 horas en medio de agar chocolate son pequeñas (2 - 5 mm), redondas convexas, brillantes, cremosas, mucoides, con bordes uniformes. Luego se vuelven ondeadas.
- ◆ En el medio selectivo de Thayer Martin modificado, las colonias gonocócicas aparecen generalmente como crecimiento selectivo.

IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE *Neisseria gonorrhoeae*

- ◆ De las colonias que aparecen en el medio selectivo Thayer Martin modificado o agar chocolate, se hace la identificación presuntiva realizando todas estas pruebas:
 - **Coloración Gram:** demostrando los diplococos gramnegativos característicos en un frotis de la colonia.
 - **Prueba de oxidasa:** reacción positiva (ver anexos).
 - **Prueba de superoxol:** reacción positiva (ver anexos).

IDENTIFICACIÓN CONFIRMATORIA DE *Neisseria Gonorrhoeae*

- ◆ Se realiza a partir de las colonias con identificación presuntiva, mediante:
 - **La prueba de utilización de carbohidratos**, determinándose la producción de acidez a partir de carbohidratos esterilizados: glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa a la concentración de 1 - 2%, contenidos en base agar cistina tripticasa (ver anexos).

INFORME

◆ RESULTADO POSITIVO

Si hay crecimiento de colonias con **pruebas confirmatorias**.

◆ RESULTADO SOSPECHOSO

Si se ha realizado las **pruebas de identificación presuntiva**.

◆ RESULTADO NEGATIVO

Si no hay crecimiento de colonias después de las 72 horas.

DIAGNÓSTICO DE *Yersinia pestis*

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La peste es una infección bacteriana de animales y humanos causada por *Yersinia pestis*.
- ◆ La *Yersinia pestis* pertenece a la familia enterobacteriaceae y es un bacilo gramnegativo aerobio, que cuenta con gran cantidad de antígenos y toxinas.
- ◆ La forma clínica más frecuente, es la linfangitis regional aguda, llamada **peste bubónica** caracterizada por aumento de tamaño de los nódulos linfáticos con dolor (áreas inguinales o axilares). Algunas formas menos comunes son la septicémica y la neumónica.
- ◆ El éxito de los procedimientos para el diagnóstico depende de una **buena obtención de la muestra y la rapidez con estas lleguen al laboratorio**. Se debe obtener la muestra antes de la administración de antibióticos.
- ◆ **La confirmación absoluta** de un brote de peste, requiere del aislamiento e identificación del agente etiológico.

¡ATENCIÓN!

- ◆ **El material sospechoso deberá manejarse con gran cuidado, usando mandil, guantes y mascarilla por el riesgo de infección.**
- ◆ Se debe evitar que se dispersen en el aire gotas minúsculas que pueden causar la infección de otras personas y la propagación de la peste neumónica.
- ◆ **El personal de laboratorio puede infectarse por diversas vías:** lesión en piel, mucosas y tracto respiratorio.

- ◆ En la fase aguda de la enfermedad, hay una intermitente bacteremia (presencia del microorganismo en el torrente sanguíneo), por lo que **se requiere la obtención de cuatro muestras de sangre** para tener mayor probabilidad de cultivo positivo. Las muestras deben tener aproximadamente 5 mL de sangre en adulto y 2,5 mL en niños.

- ◆ Una vez aisladas por cultivo colonias sospechosas de *Yersinia pestis*, se debe enviar al laboratorio de referencia regional para su confirmación diagnóstica.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

a. Aspirado de bubón

MATERIALES

- Alcohol yodado.
- Alcohol al 70%.
- Algodón.
- Solución salina estéril.
- Una jeringa de 10 mL, aguja N.º 20.
- Medio de transporte Cary y Blair.
- Láminas portaobjetos.
- Fenol al 5%.

MÉTODO PUNCIÓN – ASPIRACIÓN

1. **Ubicar los bubones** (axilar o inguinal) y seleccionar el que aproximadamente mida 3 cm o más de diámetro.

2. Desinfectar dos veces la piel del bubón con alcohol yodado, descartando el algodón cada vez, y una tercera vez con alcohol al 70%. Antes de la punción debe haberse evaporado.

3. Sosteniendo la jeringa entre el índice y el pulgar de la mano derecha introducir la aguja en el bubón.



4. Con la mano izquierda, tirar lentamente del émbolo de la jeringa. Deberá entrar en esta, un líquido que puede ser sanguinolento, proveniente del bubón.



5. En caso de no haber obtenido ninguno en la jeringa, cargar la jeringa con 2 mL de solución salina estéril e inyectar en el bubón, empujar suavemente el émbolo con el pulgar. Imprimir a la aguja introducida en el bubón un movimiento circular, a continuación, tirar lentamente el émbolo, para así obtener el líquido seroso.

6. Retirar la jeringa y limpiar con alcohol al 70% el sitio de la punción.

7. Sostener la jeringa en posición vertical, con la aguja hacia abajo e inocular parte del aspirado del bubón en el medio de transporte Cary y Blair. El resto del aspirado se usará para el frotis. Dejar caer una gota de la muestra contenida en la jeringa y extenderla con la misma aguja sobre una lámina portaobjetos formando una capa delgada. Dejar secar el frotis a temperatura ambiente.



8. Descartar el material usado (jeringa y aguja).

b. *Órganos de pacientes fallecidos*



- ◆ La obtención de órganos de paciente fallecido, **con diagnóstico de sospecha de peste**, es de suma importancia.
- ◆ **En un cuerpo no refrigerado (24 - 48 horas)** realizar autopsia inmediatamente, obtener muestras de hígado, bazo y tejido de nódulo linfático (bubón).
- ◆ Si no se puede procesar inmediatamente, se puede guardar hasta por 6 meses en medio de transporte Cary y Blair o Thioglicolato a 4 °C. Se tiene la posibilidad de recuperar en un **100% por cultivo el agente etiológico**, así como realizar inmunofluorescencia directa.
- ◆ **En un cuerpo no refrigerado (después de 48 horas)** obtener muestras de hígado, bazo y tejido de nódulo linfático (bubón) y procesar inmediatamente.
- ◆ Se tiene la posibilidad de **recuperar en un 20% por cultivo el agente etiológico**, así como realizar inmunofluorescencia directa.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

MÉTODO

MEDIO DE AGAR SANGRE AL 6% (ver Anexos).

- ◆ **El medio de agar sangre al 6%**, es el medio sólido estándar que se usa para el cultivo de *Yersinia pestis*.
- ◆ En caso de muestras de aspirado de bubón, esputo, órganos, sembrar directamente la muestra en el medio, la muestra se **estría en la superficie del medio e incuba por 24 horas a 37 °C**.
- ◆ La *Yersinia pestis* crece como colonias translúcidas blanco grisáceas:

- A las de 24 horas de incubación, se observan colonias pequeñas como cabeza de alfiler.
- Después de una incubación de 48 horas, las colonias miden aproximadamente 1 - 2 mm de diámetro y son blanco grisáceas y más opacas.
- Para su confirmación diagnóstica enviar al **Laboratorio de Referencia Regional**.

CALDO INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN (BHI) (ver Anexos).

- ◆ El caldo de infusión cerebro corazón es el medio estándar usado en el laboratorio para el aislamiento primario, crecimiento y caracterización de *Yersinia pestis*.
- ◆ Antes de proceder a la inoculación de las muestras, el medio debe encontrarse a temperatura ambiente.
- ◆ Realizar con el asa de siembra la inoculación de la muestra en un tubo con tapa rosca que contenga 10 mL de caldo. Incubar a 37 °C durante 24 a 48 horas.
- ◆ Crecen como pequeños cúmulos de células en los lados y fondo del tubo; el resto del caldo permanece claro.
- ◆ Para su confirmación diagnóstica enviar al **Laboratorio de Referencia Regional**.



BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

GLUCOSA EN SANGRE	383	FOSFATASA ALCALINA	393
Principios generales	383	Principios generales	393
Método de la glucosa oxidasa	383	Método.....	393
ÚREA EN SUERO	385	ELECTROLITOS SÉRICOS	395
Principios generales	385	SODIO (Na).....	395
Método de Chaney y Marbach	385	Principios generales	395
Tiras reactivas	387	Método.....	395
CREATININA EN PLASMA O EN SUERO	388	POTASIO (K)	397
Principios generales	388	Principios generales	397
Método.....	388	Método.....	397
TRANSAMINASAS EN SANGRE	390		
Principios generales	390		
Método.....	390		

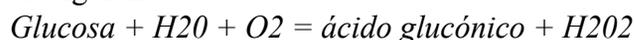


GLUCOSA EN SANGRE

PRINCIPIOS GENERALES

- ♦ La detenninación de la glucosa (azúcar) sanguínea es necesaria para establecer el diagnóstico de la diabetes mellitus y otras enfermedades en que existen alteraciones del metabolismo de los carbohidratos.
- ♦ **En el método de la glucosa oxidasa**, el color formado en el proceso es directamente proporcional a la cantidad de glucosa sanguínea que puede medirse con el espectrofotómetro.
- ♦ La glucosa es oxidada enzimáticamente por la glucosa oxidasa a ácido glucónico y agua oxigenada.

La reacción es la siguiente:



El agua oxigenada formada es separada, y el agua y el oxígeno disminuyen por una peroxidasa en presencia de un aceptor de oxígeno, que es convertido en un componente coloreado, cuya cantidad se lee con el espectrofotómetro.

MÉTODO DE LA GLUCOSA OXIDASA

REACTIVOS (ver Anexos)

- Hidróxido de sodio 0,05 M.
- Sulfato de zinc a 10%.
- Solución de fosfato monosódico p.a. 0,5 M.
- Reactivo enzima-color, que una vez preparado se debe conservar en el refrigerador.
- Solución estándar de glucosa de 200 mg por 100 mL de solución saturada de ácido benzoico.

MÉTODO

- ◆ Preparar tres tubos de ensayo y marcarlos de la siguiente manera:
 - Tubo de la muestra: M
 - Tubo blanco: B
 - Tubo estándar: S

- 1. En el tubo M colocar 0,1 mL de sangre total, suero, plasma o líquido cefalorraquídeo (LCR), agregar 1 mL de hidróxido de sodio 0,05 M y 0,1 mL de sulfato de zinc al 10%.
- 2. Mezclar y centrifugar.
- 3. Del sobrenadante tomar 0,2 mL y agregar 4 mL del reactivo enzima-color.
- 4. En el tubo S colocar 0,1 mL de la solución estándar de glucosa y tratar igual que la muestra del paciente (repetir paso 1,2 y 3).
- 5. En el tubo B colocar 0,2 mL de agua destilada, agregar 4 mL del reactivo de enzima-color.
- 6. Colocar los tubos a 37 °C en baño María durante 10 minutos.
- 7. Leer con el espectrofotómetro la absorbancia entre 430 - 500 nm (nanómetro), poniendo a cero con el tubo B.
- 8. **Calcular usando la siguiente fórmula:**

$$\text{Glucosa (mg / 100 mL)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times 200$$

- 9. **Los valores normales son:**

Glucosa (mg / dL) : 70 - 115 mg / dL

- ◆ El método es lineal hasta 500 mg / dL

ÚREA EN SUERO

PRINCIPIOS GENERALES

- ♦ Una de las funciones del riñón es eliminar los productos de desecho no volátiles del metabolismo, entre ellos la úrea y la creatinina; un aumento de las cifras de estas sustancias en suero es signo de trastorno renal.
- ♦ **En el método de Chaney y Marbach**, la úrea presente en el suero es hidrolizada por la ureasa en CO₂ y NH₃. Este último reacciona luego con el fenol y el hipoclorito de sodio en medio alcalino y se produce un **color azul de indofenol**.

MÉTODO DE CHANEY Y MARBACH

REACTIVOS (ver Anexos)

- Solución ureasa.
- Reactivo de fenol (reactivo 2).
- Reactivo de hipoclorito alcalino (reactivo 3).
- Solución testigo de urea de 60 mg/100 mL

PROCEDIMIENTO

- l. Marcar tres tubos de ensayo de 150 x 16 mm con:
 - Testigo = T
 - Desconocido = D
 - Blanco = B

	Testigo T	Desconocido D	Blanco B
Agua destilada	1 gota	1 gota	1 gota
Testigo úrea 60 mg/ 100ml	0,02 mL	-	-
Suero	-	0,02 mL	-
Solución	1 gota	1 gota	1 gota

2. Incubar los tres tubos durante 5 minutos en baño maría a 50° C

Agregar	Testigo T	Desconocido D	Blanco B
Reactivo 2	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Reactivo 3	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- 3.** Agitar bien después de cada agregado.
- 4.** Volver a incubar los tres tubos a la misma temperatura y durante igual tiempo.
- 5.** Sacar los tubos del baño María y agregar a cada tubo 10 mL de agua destilada, mezclar.
- 6.** Leer en el espectrofotómetro a 525 nm, empleando la solución blanco de reactivos para establecer el nivel cero de absorbancia.
- 7.** Calcular usando la siguiente fórmula:

$$\text{mg de úrea por 100 mL de suero} = \frac{\text{Absorbancia del desconocido}}{\text{Absorbancia del testigo}} \times 60$$



8. Los valores normales son:

Suero: 20 a 40 mg / 100 mL

- 9.** Se observa aumento o falso positivo por ingestión de compuestos mercuriales diuréticos, tiazídicos, gentamicina, kanamicina.
- 10.** Se puede emplear plasma recogido con oxalato, citrato, heparina o EDTA como anticoagulante; pero no debe contener oxalato de amonio.
- 11. No utilizar plasma o suero preservado con fluoruro**, pues esta sal inactiva la enzima.
- 12.** La úrea es estable en suero congelado durante varios meses.

TIRAS REACTIVAS

- ◆ Es una prueba enzimática para determinar la úrea en sangre.
- ◆ Las tiras están compuestas por ureasa purificada y azul de bromotimol, utilizando cromógeno como indicador.
- ◆ El color varía del amarillo verdoso a tonos más oscuros. La comparación del color se efectúa en un cuadro de valores.

CREATININA EN PLASMA O EN SUERO

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ El plasma o suero se diluyen con agua destilada, y se precipitan las proteínas con ácido túngstico.
- ◆ Se agrega a una parte del filtrado libre de proteínas, picrato alcalino con el cual, la creatinina forma un complejo de color rojo que se valora con el espectrofotómetro.

MÉTODO

1. Poner en un tubo de centrifuga limpio y seco lo siguiente:

- | | |
|---|--------|
| - Plasma o suero | 2,0 mL |
| - Agua destilada | 2,0 mL |
| - Solución tungtato de sodio al 10% | 1,0 mL |
| - Ácido sulfúrico 0,66N | 1,0 mL |
| - Solución de creatinina de 1 mg / 100 mL | |

(Ver Anexos).

2. Mezclar cuidadosamente sin sacudir.
3. Centrifugar a 2 500 RPM durante 5 minutos. El líquido sobrenadante se usa en el paso siguiente.
4. Preparar en cuatro tubos de ensayos limpios y secos lo siguiente:



Tubo	Problema	Patrón 1	Patrón 2	Blanco
Líquido sobrenadante	3,0 mL	-	-	-
Solución patrón de creatinina	-	1,0 mL	3,0 mL	-
Agua destilada	-	2,0 mL	-	3,0 mL
Solución alcalina de picrato	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL

5. Mezclar con cuidado y dejar a temperatura ambiente unos 10 minutos.
6. Leer las densidades ópticas del problema y de los patrones en un espectrofotómetro con banda de 520 nm; el cero de densidad óptica se obtiene con el blanco.
7. **Calcular usando la siguiente fórmula**

Utilizar la lectura del patrón más parecido a la del problema.
Utilizando el patrón 1:

$$\text{mg de creatinina por 100 mL} = \frac{\text{Lectura del problema}}{\text{Lectura e patrón 1}} \times 1,0$$

Utilizando el patrón 2:

$$\text{mg de creatinina por 100 mL} = \frac{\text{Lectura del problema}}{\text{Lectura del patrón 2}} \times 3,0$$

8. **Los valores normales son:**

0,4 a 1,2 mg por 100 mL de plasma o suero.

3. Incubar durante 60 minutos para TGO o durante 30 minutos para TGP en baño María a 37 °C.
4. Trascurrido el tiempo necesario, sacar del baño y agregar 1,0 mL del reactivo cromógeno. Mezclar.
5. Dejar reposar a temperatura ambiente por 15 minutos.
6. Añadir 10 mL de NaOH 0,4 N. Mezclar por inversión y dejar en reposo por 20 minutos.
7. Leer en el fotocolorímetro a 505 nm poniendo a cero con agua y con un blanco de 1,0 mL de sustrato, 0,2 mL de suero, 1,0 mL del reactivo cromógeno y 10 mL de NaOH 0,4 N.
8. **Los resultados se calculan sobre la curva de calibración** que se realiza en seis tubos de ensayo, según la tabla siguiente:

Tubo	Solución piruvato(mL)	Sustrato TGO (mL)	Agua destilada (mL)	Equivale TGO	Equivale TGP
1	0	1,0	0,2	0	0
2	0,1	0,9	0,2	20	23
3	0,2	0,8	0,2	55	50
4	0,3	0,7	0,2	95	83
5	0,4	0,6	0,2	148	125
6	0,5	0,5	0,2	216	-

9. En cada uno de los seis tubos añadir 1 mL de reactivo cromógeno, agitar suavemente y dejar 20 minutos en reposo a temperatura ambiente.
10. Agregar 10 mL de NaOH 0,4 N. Mezclar por inversión y dejar reposar 30 minutos.
11. Leer en el fotocolorímetro a 505 nm poniendo a cero con agua destilada.



12. Los valores normales son:

- TGO: de 8 a 40 unidades por mL
- TGP: de 5 a 35 unidades por mL

13. Se puede observar.

Aumento o falso positivo de TGO

Por la ingestión de ácido nalidíxico, anticonceptivos orales, eritromicina, gentamicina, etc.

Aumento o falso positivo de TGP

Por la ingestión de agentes anabólicos, metildopa, salicilatos, etc.



FOSFATASA ALCALINA

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Se basa en las actividades fosfatásica del suero mediante la determinación de la velocidad de hidrólisis enzimática del **paranitrofenilfosfato**, que da lugar a p-nitrofenol y fosfato en condiciones de temperatura y de pH previamente establecidas.
- ◆ El incremento de la concentración sérica de fosfatasa alcalina está asociada básicamente a enfermedades hepáticas u óseas.

MÉTODO

REACTIVOS (ver Anexos)

- | | | | |
|---|-----------------------------|-------|------|
| - | <i>Buffer</i> | pH | 10,5 |
| - | Sustrato | 0,012 | M |
| - | Hidróxido de sodio | 0,02 | N |
| - | Agua destilada | | |
| - | Solución testigo de trabajo | | |

PROCEDIMIENTO

1. Marcar en dos tubos de ensayo: D (desconocido) y B (blanco).
2. Colocar 0,5 mL de *buffer* pH 10,5 y 0,5 de sustrato en los tubos de ensayo marcados.
3. Poner ambos tubos en baño María a 37 °C durante 5 minutos.
4. Añadir 0,10 mL de suero en el tubo D.
5. Añadir 0,10 mL de agua destilada en el tubo B.
6. Mezclar. Colocar ambos tubos en baño de agua a 37 °C durante 30 minutos.

7. Transcurrido el tiempo indicado, agregar en cada tubo 10 mL de hidróxido de sodio 0,02 N.
8. Agregar 0,10 mL de suero en el tubo B. Mezclar bien.
9. Leer en el fotolorímetro a 407 nm ambos tubos, poniendo a cero con agua destilada.
10. Restar los resultados del tubo D del tubo B mediante la tabla de calibración.
11. La obtención de la tabla de calibración, se realiza de acuerdo con lo siguiente:

Tubo	Solución estandar de trabajo(mL)	Hidroxido de sodio 0,02 N (mL)	Fosfata alcalina(U.I./L)
1	0,5	10,6	10
2	1,0	10,1	20
3	2,0	9,1	40
4	4,0	7,1	80
5	6,0	5,1	120
6	8,0	3,1	160

12. Efectuar la lectura en el fotolorímetro a 407 nm poniendo a cero con agua destilada.
13. Se representa en papel semilogarítmico las U.I. (Unidades internacionales) de fosfatasa alcalina.
14. **Los valores normales son:**
 - Fosfatasa Alcalina: 13 - 60 U.I. / L en adultos.
45 - 115 U.I. / L en niños.

ELECTRÓLITOS SÉRICOS

SODIO (Na)

PRINCIPIOS GENERALES

♦ Determinación fotocolorimétrica de sodio

El sodio se precipita en forma de acetato sódico de uracilo y zinc, por lo que se puede medir el color amarillo fotocolorimétricamente.

MÉTODO

REACTIVOS (ver Anexos)

- Reactivo de acetato de uracilo y zinc.
- Alcohol etílico de 95°.
- Ácido tricloroacético al 10%.
- Solución testigo de sodio que equivale a 139 mEq/L

PROCEDIMIENTO

1. En un tubo de ensayo colocar 0,5 mL de suero. Agregar 2 mL de ácido tricloroacético al 10%, dejar reposar 5 minutos y centrifugar. **El sobrenadante** se usa para el siguiente paso.
2. En tres tubos de centrífuga marcados con: D (desconocido), T (testigo) y B (blanco) colocar:

Tubo	Desconocido D	Testigo T	Blanco C
Sobrenadante(1)	0,5 mL	-	-
Solución testigo	-	0,5 mL	
Agua destilada	-	-	0,5 mL
Acetato de uracilo y zinc	1 mL	1 mL	1 mL

3. Mezclar cada tubo y colocarlos en el refrigerador durante una hora.
4. Centrifugar. Decantar cuidadosamente los tubos descartando el líquido sobrenadante y dejando los tubos invertidos durante varios minutos sobre papel de filtro.
5. Lavar las paredes de los tubos con 2 mL de alcohol de 95°agitando suavemente, para resuspender el precipitado (sedimento).
6. Centrifugar de nuevo y descartar el líquido sobrenadante invirtiendo los tubos en papel filtro como en el caso anterior.
7. Disolver el precipitado (sedimento) con 5 mL de agua destilada. Si la solución resulta turbia, se debe centrifugar.
8. Leer en el fotolorímetro a 430 nm poniendo a cero con agua destilada.
9. **Calcular usando la siguiente fórmula:**

$$mEq Na/L = \frac{\text{Densidad óptica del desconocido} - \text{Densidad óptica del blanco}}{\text{Densidad óptica del testigo} - \text{Densidad óptica del blanco}} \times 139$$

10. **Los valores normales son:**

135 a 155 mEq Na/L

POTASIO (K)

PRINCIPIOS GENERALES

◆ Determinación fotocolorimétrica del potasio

El potasio del suero se precipita en forma de cobaltonitrito de sodio y potasio, el que se determina fotocolorimétricamente aprovechando el hecho de que las soluciones alcalinas de cobalto en presencia de glicina reducen el reactivo de los fenoles a un color azul.

MÉTODO

REACTIVOS (ver Anexos)

- Reactivo de cobaltonitrito de sodio.
- Solución semisaturada de acetato de sodio.
- Solución lavadora saturada con cobaltonitrito de sodio y potasio.
- Solución de glicina al 7,5% en agua destilada.
- Carbonato de sodio al 25% en agua destilada.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu.
- Solución testigo de potasio que equivale a 5,1 mEq/L

PROCEDIMIENTO

1. En dos tubos de centrifuga graduados marcados con: D (desconocido) y T (testigo), colocar:
 - Al tubo D: 0,20 mL de suero.
 - Al tubo T: 0,20 mL de solución testigo de potasio.
2. Agregar en cada tubo 0,20 mL de solución semisaturada de acetato de sodio y mezclar.

- 3.** Agregar agitando constantemente, a cada tubo 0,5 mL del reactivo cobaltonitrito sódico recientemente filtrado.
- 4.** Dejar reposar 45 minutos a temperatura ambiente.

- 5.** Agregar a cada tubo 1 mL de agua destilada, mezclar y centrifugar ambos tubos durante 15 minutos.

- 6.** Decantar el líquido sobrenadante e invertir los tubos sobre papel filtro durante 15 minutos.

- 7.** Agregar al precipitado (sedimento) de cada tubo 1 mL de la solución lavadora.

- 8.** Centrifugar los tubos durante 15 minutos, decantar el líquido sobrenadante, invertir los tubos sobre papel de filtro durante 5 minutos.

- 9.** Agregar a cada tubo 1 mL de alcohol etílico de 70°, mezclar empleando una varilla de vidrio.

- 10.** Lavar la varilla con 3 mL de alcohol etílico de 70°, luego verter en el tubo correspondiente.

- 11.** Centrifugar durante 5 minutos, decantar e invertir los tubos sobre papel filtro otros 5 minutos.

- 12.** Repetir nuevamente los pasos 9 y 10.

- 13.** Preparar un tercer tubo marcado B (blanco).

- 14.** Agregar a los tres tubos D, T y B, 2 mL de agua destilada.

- 15.** Sumergir en baño hirviente hasta que el precipitado se haya disuelto por completo (más o menos 15 minutos).
- 16.** Antes que se enfríe, agregar a cada tubo 1 mL de la solución de glicina y luego 1 mL de la solución de carbonato de sodio. Mezclar.



17. Añadir a cada tubo 1 mL del reactivo de Folin - Ciocalteu para uso. Mezclar.
18. Sumergir los tubos en baño de agua a 37 °C durante 15 minutos.
19. Enfriar a temperatura ambiente, agregando a cada tubo cantidad suficiente de agua destilada hasta completar 6 mL. Mezclar bien.
20. Leer al fotolorímetro a 660 nm poniendo a cero con agua destilada.
21. **Calcular usando la siguiente fórmula:**

$$mEq\ K/L = \frac{\text{Densidad óptica del desconocido} - \text{Densidad óptica del blanco} \times 5,1}{\text{Densidad óptica del testigo} - \text{Densidad óptica del blanco}}$$

22. **Los valores normales son:**

3,6 a 5,5 mEq K/L

SEROLOGÍA

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE SÍFILIS.....	403	MÉTODOS SEROLÓGICOS EN EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS	430
Principios generales	403	Principios generales	430
Examen directo.....	404	Materiales para serología de	
Método.....	404	Brucelosis	431
Examen de VDRL (prueba no treponémica).....	406	Métodos serológicos.....	432
Limitaciones del examen de VDRL.....	415	Control de calidad de las pruebas	439
Prueba de reagina plasmática rápida (RPR)(prueba no treponémica).....	415		
DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)	420	MÉTODOS SEROLÓGICOS EN EL DIAGNÓSTICO DE SALMONELOSIS.....	441
Principios generales	420	Principios generales	441
DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B	425	Aglutinación en placa	442
Principios generales	425	Aglutinación en tubo	444
Método.....	426	Control de calidad de ambas pruebas.....	447
DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR HIDATIDOSIS HUMANA.....	428	Limitaciones.....	447
Principios generales	428		
TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN DE LÁTEX (AL) PARA EL DIAGNÓSTICO DE HIDATIDOSIS HUMANA	428		



DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE SÍFILIS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La sífilis es una infección de transmisión sexual causada por una **bacteria espirilar, el *Treponema pallidum***. El período de incubación es de aproximadamente un mes.

- ◆ Las manifestaciones clínicas son variadas, por lo que de acuerdo con los estadios de la enfermedad es importante elegir la prueba de laboratorio adecuada para su confirmación diagnóstica y seguimiento de su evolución, así tenemos:
 - **En la sífilis primaria** se puede observar el **chancro duro** (genital, oral, rectal), cuya secreción contiene gran cantidad de treponemas, los cuales pueden visualizarse por **examen directo** en un microscopio de campo oscuro.

 - **En la sífilis secundaria** se observa lesiones en la piel y se realizan las pruebas **treponémicas y no treponémicas**.

 - **Luego de un período de latencia variado se presenta la sífilis terciaria**, en la que hay compromiso cardiovascular o del sistema nervioso; en este caso, las pruebas treponémicas son las que hacen el diagnóstico.

- ◆ **Son pruebas no treponémicas**
 - **VDRL** Prueba del Laboratorio de Investigaciones en Enfermedades Venéreas.

 - **RPR** Prueba de reagina plasmática rápida.

- ◆ **Son pruebas treponémicas**
 - **FTA-Abs** Anticuerpos de treponema fluorescentes absorbidos.

 - **MHA-TP** Microhemaglutinación para *Treponema pallidum*.

EXAMEN DIRECTO

- ◆ Se requiere un microscopio con condensador para campo oscuro.
- ◆ El examen carece de valor si el paciente ha tratado la lesión (chancro duro) con algún ungüento. En este caso se debe esperar tres días para efectuar el examen.
- ◆ El examen de **frotis secos y teñidos no se recomienda**, ya que en la piel y en las membranas mucosas suelen existir treponemas saprofitos.

MATERIALES

- Gasa estéril.
- Solución estéril de cloruro de sodio al 0,9%.
- Una lanceta estéril.
- Pipeta Pasteur con chupón.
- Portaobjetos de vidrio delgado.
- Un microscopio con condensador para campo oscuro.

MÉTODO

1. Limpiar el chancro con gasa humedecida con una solución estéril de cloruro de sodio al 0,9%. Secar bien.

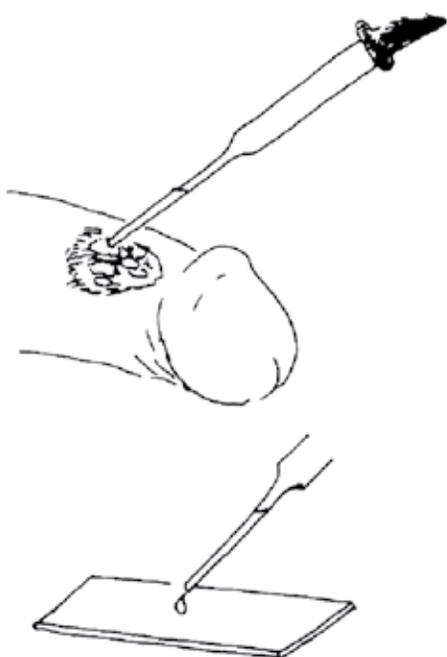


2. Raspar los bordes del chancro varias veces con la hoja de una lanceta estéril colocada en posición plana. Evitar provocar la salida de sangre.

3. Presionar con gasa estéril seca.



4. Retirar la gasa y esperar durante unos minutos a que aparezca un líquido seroso de color rosáceo.



5. Aspirar ese líquido con una pipeta Pasteur provista de un chupón.

6. Depositar una gota en el portaobjetos de vidrio delgado, especialmente fabricado para microscopía en campo oscuro.

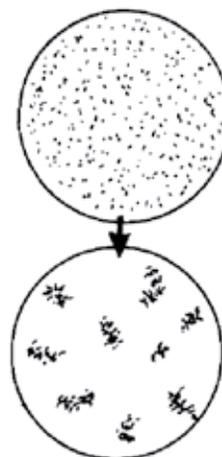
LECTURA

- ◆ Examinar el portaobjetos con el microscopio empleando un condensador para campo oscuro.
- ◆ Los treponemas se distinguen por sus cuerpos sumamente delgados y sus movimientos característicos, rotando alrededor de su eje longitudinal y enroscándose.



EXAMEN DE VDRL (PRUEBA NO TREPONÉMICA)

- ◆ **VDRL** significa "Prueba del Laboratorio de Investigaciones en Enfermedades Venéreas", que es el lugar donde se elaboró por primera vez este examen.
- ◆ Se examina el suero o **líquido cefalorraquídeo (LCR)** en busca de reagentes, anticuerpos que se producen en personas que padecen de sífilis.
- ◆ La existencia de estos anticuerpos se pone de manifiesto por un **antígeno**, que es una suspensión de partículas minúsculas que contiene cardioplipina, lecitina y colesterol
- ◆ La suspensión de antígeno **forma grumos** cuando se enfrenta con anticuerpos presentes en el suero o LCR (**microaglutinación en lámina**) de pacientes con sífilis.



a. Antígeno

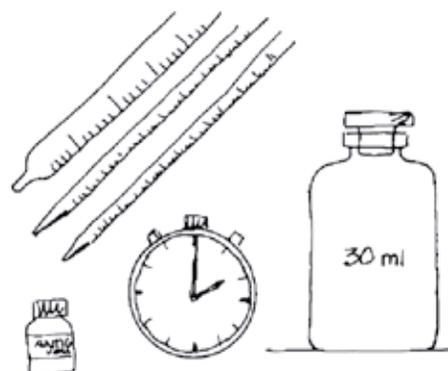
- ◆ El antígeno es una solución alcohólica que contiene cardioplipina al 0,03%, colesterol al 0,9% y lecitina al 0,21 %.
- ◆ El antígeno debe permanecer a una temperatura entre 23 a 29 °C antes de su preparación.
- ◆ Debe examinar el antígeno sosteniéndolo contra la luz. Si contiene partículas o un precipitado no se debe usar.
- ◆ Debe ser preparado el mismo día en que se use.



b. Preparación de la solución antigénica para el examen de VDRL

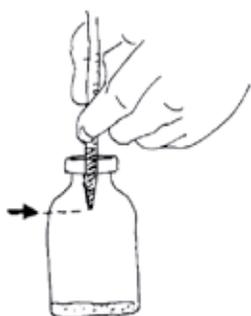
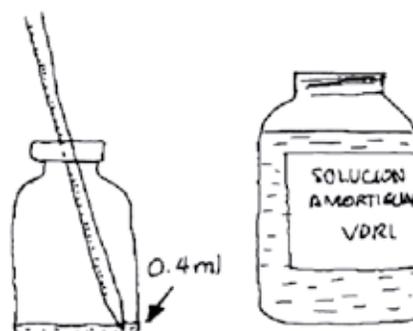
MATERIALES

- Frasco de fondo plano.
- Pipetas graduadas de 1 mL
- Pipetas graduadas de 5 mL
- Un cronómetro.
- Antígeno VDRL.
- Solución amortiguadora para VDRL, que se suministra junto con el antígeno.



MÉTODO

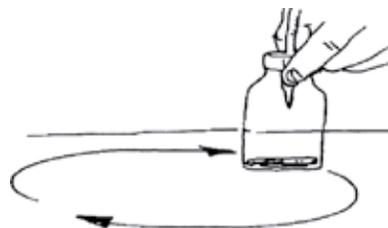
1. Con una pipeta de 1 mL medir 0,4 mL de solución amortiguadora para VDRL y deposítelo en un frasco de fondo plano, de modo que el extremo de la pipeta toque el fondo del frasco.
2. Con la pipeta de 1 mL medir 0,5 mL de antígeno de VDRL.



3. Introducir en el frasco la punta de la pipeta conteniendo el antígeno de VDRL, de modo que llegue hasta el **tercio superior del frasco**.



4. Dar un **movimiento rotatorio al frasco**, sosteniéndolo en posición vertical y deslizándolo en la superficie de la mesa de trabajo.



5. A medida que se efectúa este movimiento rotatorio dejar caer el antígeno contenido en la pipeta **gota a gota**. Este procedimiento debe durar aproximadamente 6 segundos o 18 - 20 movimientos rotatorios del frasco en un círculo de 5 cm de diámetro.

6. Verificar que no quede antígeno en la pipeta.

7. Con la pipeta de 5 mL medir 4,1 mL de solución amortiguadora para VDRL y añadida al frasco con la mezcla anterior.



8. Tapar el frasco y agitar el frasco vigorosamente, 30 veces durante 10 segundos aproximadamente. Así la solución quedará lista, para ser usada por un día, pero debe mantenerse entre 23 - 29 °C (en estufa).

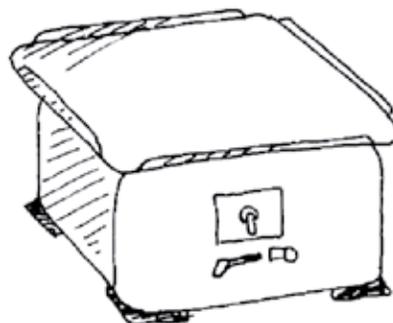
9. Antes de su uso, la solución de antígeno, debe probarse con sueros testigos cuya reacción (resultados) se ha determinado previamente.



c. Examen de VDRL en suero

MATERIALES

- Máquina rotatoria adaptable a 180 RPM (revoluciones por minuto) que describa un círculo de 19 mm de diámetro en un plano horizontal. **Si no cuenta con este equipo hacer rotar completamente la lámina con las dos manos, sobre una superficie plana dando 180 movimientos circulares por minuto, durante 4 minutos.**
- Un microscopio.
- Un baño María a 56 °C.
- Una aguja roma (sin bisel) calibre 18 para reacciones con suero y calibre 21 para LCR.
- Una jeringa de 2 mL
- Láminas serológicas, de 2 x 3 pulgadas con anillos de 14 mm de diámetro.
- Frasco redondo de fondo plano con boca angosta y tapón de vidrio con capacidad de 30 mL
- Micropipeta de un canal graduable, rango 5 - 50 μ L
- Tips (1 - 100 μ L).
- Pipetas de 1 mL, 5 mL, y 10 mL.
- Frasco de vidrio con lejía al 3 - 5%.
- Solución antigénica preparada.
- Solución salina al 0,9%
- Solución salina al 10%
- Sueros control (reactivo y no reactivo).
- Muestra de suero inactivado por calentamiento en baño María a 56 °C por 30 minutos.
- Muestra de LCR centrifugado, pero no debe ser calentado.

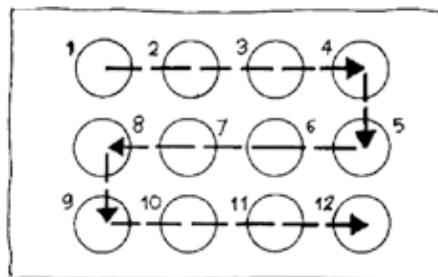


X

MÉTODOS

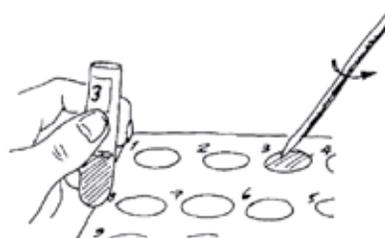
VDRL CUALITATIVA EN SUERO

1. Numerar los anillos de la lámina serológica con un lápiz grueso en el orden en que indica la figura. Tomar nota de que los números de los tubos correspondan a los números de los anillos.



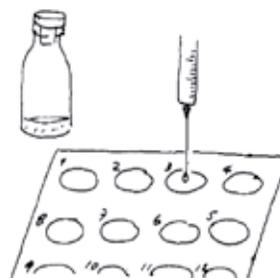
2. Con una micropipeta colocar 50 μL (0,05 mL) del **suero control reactivo** al anillo 1 de la lámina serológica y 50 μL (0,05 mL) del **suero control no reactivo** al anillo 2.

3. A partir del anillo 3, colocar 50 μL (0,05 mL) de los **sueros problemas** en cada uno de los anillos de la lámina serológica.



4. Añadir con una micropipeta 17 μL (0,017 mL) de solución antigénica preparada sobre el suero contenido en cada uno de los anillos de la lámina.

5. De no contar con micropipetas, utilizar una jeringa de 2 mL con aguja calibre 18 (sin bisel) y sosteniéndola en posición vertical deje caer una gota de solución antigénica sobre el suero contenido en cada uno de los anillos de la lámina.

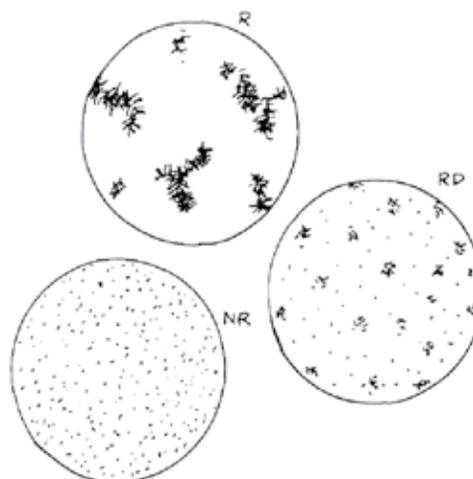


6. Colocar la lámina serológica con las muestras en un rotador a 180 RPM por 4 minutos o rotarlo manualmente (según lo indicado, ver materiales).
7. Terminada la rotación, examinar la lámina inmediatamente usando un microscopio con el objetivo de 10x y ocular de 10x.



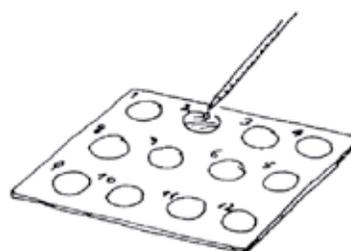
LECTURA E INFORME

- ◆ Grumos medianos o grandes = reactivo (R).
- ◆ Grupos pequeños = reactivo débil (RD).
- ◆ Sin grumos = no reactivo (NR).

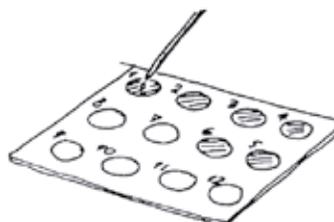


VDRL CUANTITATIVA EN SUERO

1. Colocar 50 μ L (0,05 mL) de solución salina al 0,9% del anillo 2 al anillo 6 de la lámina serológica.
2. Añadir 50 μ L (0,05 mL) de suero problema en el anillo 1 y 2.
3. Mezclar la solución salina y el suero del anillo 2 y transferir de este anillo, 50 μ L (0,05 mL) al anillo 3.



4. Mezclar el contenido del anillo 3 y transferir 50 μL (0,05 mL) al anillo 4
5. Mezclar el contenido del anillo 4 y transferir 50 μL (0,05 mL) al anillo 5 y así sucesivamente hasta el anillo 6.
6. Añadir con una micropipeta 17 μL (0,017 mL) de solución antigénica sobre el contenido de cada anillo de la lámina serológica (del anillo 1 al 6)



7. Colocar la lámina con las muestras en el rotador a 180 RPM por 4 minutos o rotarlo manualmente.

8. Tan pronto como hayan transcurrido los 4 minutos, colocar la lámina serológica en el microscopio y examinar con el objetivo de 10x y ocular de 10x.



9. Si se obtiene reactivo por sobre el título 1/8 continuar con las siguientes diluciones:

- Preparar una dilución 1/8, colocando en un tubo 0,7 mL de solución salina al 0,9% y agregar 0,1 mL del suero problema.
- Colocar 50 μL de solución salina 0,9% en los círculos 2, 3 y 4 de la lámina serológica.
- Añadir 50 μL de la dilución 1/8 en los círculos 1 y 2.
- Seguir el procedimiento repitiendo los pasos 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

LECTURA E INFORMÁTICA

- ◆ Definir como:
 - **Reactivo (R)**
 - **Reactivo debil (RD)**
 - **No reactivo (NR)**

Según las características microscópicas mencionadas anteriormente.

- ◆ Se informa los resultados según el siguiente cuadro de titulación para el **examen cuantitativo de VDRL:**

Anillo 1	Anillo 2	Anillo 3	Anillo 4	Anillo 5	Anillo 6	Resultado
Suero no diluido	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Dilución 1/8	Dilución 1/16	Dilución 1/32	
RD	NR	NR	NR	NR	NR	Reactivo débil 0 dils
R	NR	NR	NR	NR	NR	Reactivo 1 dils(1)
R	R	NR	NR	NR	NR	Reactivo 2 dils (1/2)
R	R	R	NR	NR	NR	Reactivo 4 dils(1/4)
R	R	R	R	NR	NR	Reactivo 8 dils(1/8)
R	R	R	R	R	NR	Reactivo 16 dils(1/16)
R	R	R	R	R	R	Reactivo 32 dils(1/32)

- ◆ Los resultados se notifican en términos de la mayor dilución de suero en que se haya producido la reactividad.



d. Examen de VDRL en líquido cefalorraquídeo (LCR)

PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN ANTIGÉNICA SENSIBILIZADA

1. En un tubo de ensayo mezclar 1 parte de solución salina al 10% con 1 parte de suspensión antigénica preparada para la prueba con suero.
2. Mezclar vigorosamente y dejar reposar por 5 minutos. Así estará lista para ser utilizada.

MÉTODO

1. Colocar 50 μ L (0,05 mL) de LCR problema en una lámina serológica.
2. Añadir 10 μ L (0,01 mL) con micropipeta o de lo contrario una gota de suspensión antigénica sensibilizada utilizando una jeringa con aguja de calibre 21 (sin bisel).
3. Colocar la lámina en el rotador por 8 minutos a 180 RPM o rotarlo manualmente.
4. Terminada la rotación observar al microscopio con objetivo de 10x y ocular de 10x.

LECTURA E INFORME

- | | | |
|-----------------------------|---|---------------------|
| - Grumos medianos o grandes | = | reactivo (R) |
| - Grumos pequeños | = | reactivo débil (RD) |
| - Sin grumos | = | no reactivo (NR) |



LIMITACIONES DEL EXAMEN DE VDRL

- ◆ Puede producirse un fenómeno de **prozona** (exceso de anticuerpos), en el cual la reactividad de un **suero no diluido** se ve inhibida.
- ◆ Este fenómeno de **prozona se sospecha** cuando se produce una reacción **débilmente reactiva**.
- ◆ **Para evitar éste fenómeno de prozona** todo suero que presente algún tipo de reacción **debe ser sometido a una prueba cuantitativa de VDRL**.
- ◆ Puede producirse **falsos positivos** en muestras de persona o pacientes que usan narcóticos, padecen de lupus eritematoso, mononucleosis, malaria, lepra, neumonía viral, o que recientemente han sido inmunizados.

PRUEBA DE REAGINA PLASMÁTICA RÁPIDA (RPR) (PRUEBA NO TREPONÉMICA)

- ◆ La prueba de RPR, es **una prueba serológica no treponémica de floculación macroscópica**.
- ◆ La prueba de RPR **utiliza un antígeno que es una modificación del antígeno de VDRL**, que contiene partículas de carbón para ayudar a visualizar de modo macroscópico la reacción, cloruro de colina para no inactivar los sueros y ácido etildiaminotetraacético (EDTA) para hacer más estable la suspensión.
- ◆ Para la prueba de RPR **se usa dos tipos de muestras: suero y plasma**.
- ◆ Dichas muestras no deben presentar turbidez (contaminado), no deben estar hemolizadas y deben estar a una temperatura de 23 - 29 °C.

MATERIALES

- ◆ Kit de RPR 18 mm prueba en tarjeta. Este kit trae lo siguiente:
 - Tarjeta con círculos marcados.
 - Capilares.
 - Antígeno.
 - Aguja roma (sin bisel) N.º 20.
 - Aplicadores de madera o plástico.
 - Frasco gotero de plástico.

¡ATENCIÓN!

- ◆ **El kit debe conservarse en refrigeración.**
 - Tips (1- 100 μ L).
 - Rotador mecánico adaptable a 100 RPM.
 - Frasco de vidrio de boca ancha con lejía.
 - Sueros control (reactivo y no reactivo).
 - Micropipetas de un canal graduable rango 5 - 5 μ L

a. *Prueba RPR cualitativa*

MÉTODO

1. Colocar la aguja sin bisel en el frasco gotero de plástico.
2. Colocar parte del antígeno (dependiendo del número de muestras a procesar), en el frasco gotero de plástico y verificar que la gota de antígeno salga de forma uniforme a través de la aguja.

3. Colocar sobre cada uno de los círculos de la tarjeta, 50 μ L (0,05 mL) de los sueros a evaluar, o una gota utilizando el aplicador del kit. No olvidar colocar los sueros control.
4. Con ayuda del aplicador extienda la muestra dentro del círculo sin salir del margen.
5. Agregar 17 μ L (0,017 mL) de antígeno, con micropipeta o una gota con el gotero del kit, sobre las muestras a evaluar.
6. Colocar la tarjeta con las muestras sobre el rotador por 8 minutos a 100 RPM.
7. **Si no cuenta con rotador**, hacer rotar completamente la tarjeta con las dos manos, sobre una superficie plana, dando 100 movimientos circulares por minuto, durante 8 minutos.
8. Luego de los 8 minutos, tomar la tarjeta con ambas manos y balancearla para observar los grumos, sobre todo en casos de nínima reactividad.
9. Hacer la lectura bajo una lámpara de luz, de preferencia.

LECTURA E INFORME

Lectura	Informe
Grumos grandes, medianos o pequeños, pero definidos.	Reactivo (R)
Sin grumos.	No reactivo (NR)

- ◆ Si se observan grumos definidos o pequeños, debe realizarse la prueba cuantitativa.

b. Prueba RPR cuantitativa

MÉTODO

1. Colocar 50 μL (0,05 mL) de suero fisiológico al 0,9% del segundo al sexto círculo de la tarjeta.
2. Colocar 50 μL (0,05 mL) del suero problema en el primer círculo y 50 μL (0,05 mL) en el segundo círculo, mezclar bien en el segundo círculo.
3. Transferir 50 μL (0,05 mL) al tercer círculo, mezclar bien y transferir 50 μL (0,05 mL) al cuarto círculo, mezclar bien.
4. Transferir 50 μL (0,05 mL) al quinto círculo y así sucesivamente hasta el sexto círculo.
5. Usando un aplicador, extender la mezcla en cada círculo comenzando en el sexto círculo y terminando en el primer círculo.
6. Agregar 17 μL (0,017 mL) de antígeno, con micropipeta o una gota con el gotero del kit, sobre las muestras a evaluar.
7. Colocar la tarjeta con las muestras sobre el rotador por 8 minutos a 100 RPM. **Si no cuenta con rotador**, hacer rotar completamente la tarjeta con las dos manos, sobre una superficie plana, dando 100 movimientos circulares por minuto, durante 8 minutos.
8. Luego de los 8 minutos, tomar la tarjeta con ambas manos y balancearla para observar los grumos, sobre todo en casos de mínima reactividad.
9. Reportar el título hasta la dilución en que se observe una reacción, inclusive una reacción muy fina, que considerará como **reactivo mínimo**.



CUADRO DE TITULACIÓN Y RESULTADOS

Círculo 1	Círculo 2	Círculo 3	Círculo 4	Anillo 5	Círculo 6	Resultado
Suero no diluido	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Dilución 1/8	Dilución 1/16	Dilución 1/32	
Rm	N	N	N	N	N	Reactivo débil 0 dils
R	Rm	N	N	N	N	Reactivo 1 dils(1)
R	R	N	N	N	N	Reactivo 2 dils (1/2)
R	R	R	N	N	N	Reactivo 4 dils(1/4)
R	R	R	R	N	N	Reactivo 8 dils(1/8)
R	R	R	R	R	N	Reactivo 16 dils(1/16)
R	R	R	R	R	R	Reactivo 32 dils(1/32)

c. Limitaciones de la prueba RPR

- ◆ **Fenómeno de prozona** (exceso de anticuerpos), en el cual la reactividad de un suero no diluido se ve inhibida. Puede sospecharse cuando se produce una reacción mínima, o se aprecian grumos, bastante grandes mezclados con partículas sueltas de antígeno en la prueba cualitativa, **por tanto, todo suero que presente algún tipo de reacción debe ser sometido a una prueba cuantitativa.**
- ◆ Puede producirse **falsos positivos** en muestras de personas que usan narcóticos padecen de lupus eritematoso, mononucleosis, malaria, lepra, neumonía viral o hayan sido recientemente vacunadas.



DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

PRINCIPIOS GENERALES

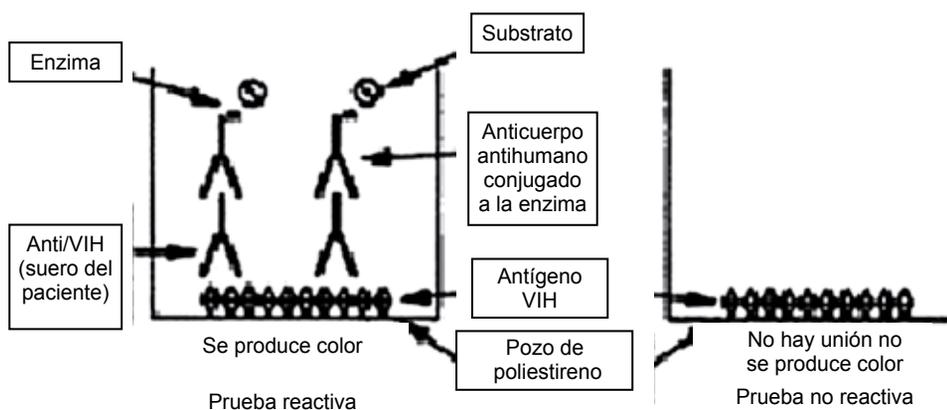
- ◆ Para hacer el diagnóstico de infección por VIH, se emplean pruebas para un **diagnóstico preliminar (tamizaje)** y **confirmatorias**, que detectan anticuerpos en muestras de sueros.
- ◆ **Las pruebas inmunológicas ligadas a enzimas (ELISA) se usan para un diagnóstico preliminar** basado en la detección de los anticuerpos contra VIH.
- ◆ **El suero o plasma son los elementos más comunes usados para la detección de anticuerpos.** Deben guardarse congelados en el caso de que la prueba no pueda realizarse inmediatamente luego de la recolección.
- ◆ Los procedimientos más comúnmente usados se clasifican como pruebas de ELISA indirecto, competitivo y de captura.
- ◆ Los antígenos usados en estas pruebas pueden ser derivados de virus lisados o producidos por recombinación genética o sintéticamente.
- ◆ Los anticuerpos son producidos en animales y pueden ser monoclonales o policlonales.
- ◆ Estos reactivos se incluyen en los paquetes (kits) de las pruebas comerciales, ya sea fijados a fase sólida o empaquetados separadamente junto con otros reactivos.
- ◆ Todos los juegos de las pruebas incluyen especímenes de **control positivo y negativo que deben ser incluidos durante cada examen para asegurar la validez de los resultados de la prueba.**



a. Prueba de ELISA indirecto

FUNDAMENTO

- ♦ La muestra de suero se diluye en el soporte en el que se encuentra inmobilizado el antígeno. Se incuba por un período específico de tiempo y a una temperatura exacta de acuerdo a las instrucciones del fabricante.



- ♦ Si las muestras de suero contienen los anticuerpos específicos, estos **formarán un complejo antígeno - anticuerpo y permanecerán unidos al soporte**. La muestra de suero se elimina por lavado.
- ♦ Luego, agregar **anticuerpos antiimmunoglobulinas totales humanas conjugadas con peroxidasa**. Incubar a la temperatura indicada por el fabricante.
- ♦ Este conjugado se unirá al complejo antígeno-anticuerpo, si esto último se produjo en el paso 2 del proceso.
- ♦ Realizar un nuevo lavado y agregar el **substrato enzimático**.



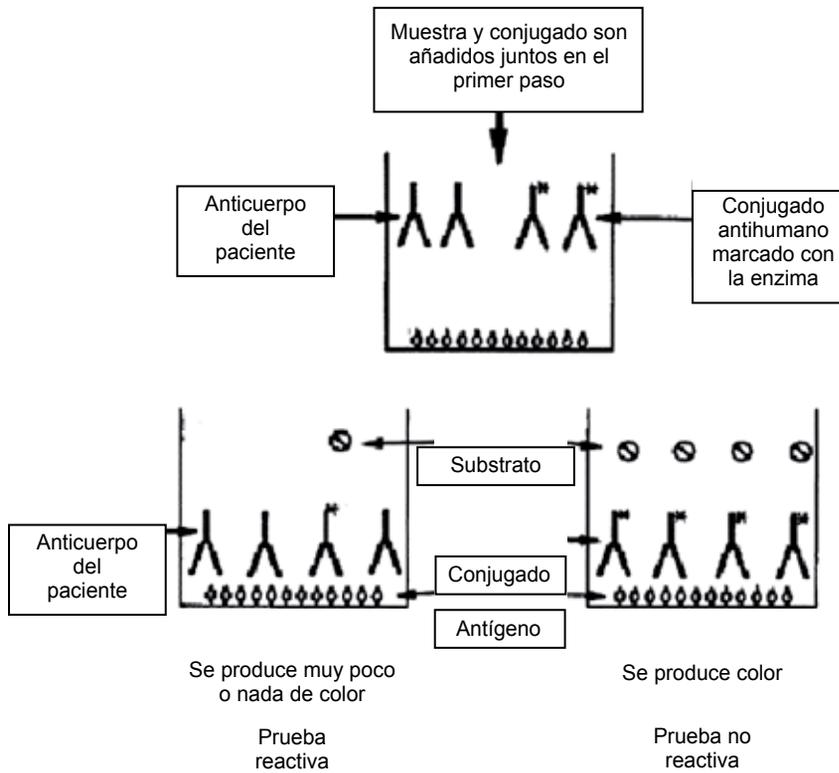
- ◆ En los casos en que se haya unido el conjugado, la reacción genera **un producto coloreado proporcional a la concentración de anticuerpos en la muestra.**
- ◆ La concentración de anticuerpos es detectada por el espectrofotómetro a una longitud de onda determinada según los procedimientos del fabricante.
- ◆ **La lectura de resultados positivos** se basa en la aparición de un color que se puede detectar ya sea visualmente o con un espectrofotómetro.
- ◆ **Es la prueba más usada.**

b. Prueba de ELISA competitivo

FUNDAMENTO

- ◆ Es un método indirecto **modificado** para detectar anticuerpos VIH.
- ◆ El anticuerpo VIH en la muestra positiva compite con el anticuerpo VIH marcado con la enzima por los lugares reactivos en los antígenos ligados al soporte de fase sólida.
- ◆ Por lo tanto, ambos, la muestra y el anticuerpo marcado con la enzima son añadidos al mismo tiempo.
- ◆ El anticuerpo de la muestra positiva se ligará al antígeno, y por lo tanto evitará que los anticuerpos marcados con enzima se junten con el antígeno.



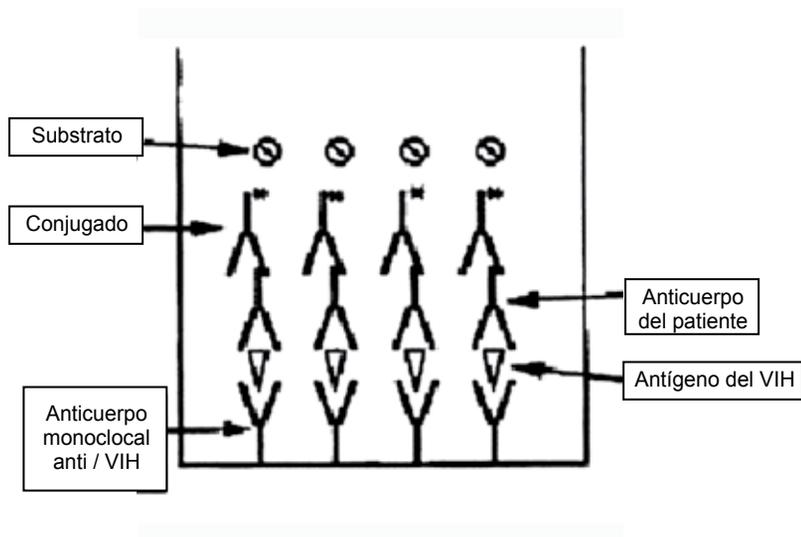


- ◆ Esto limitará la cantidad de enzima disponible para reaccionar con el sustrato y **no se producirá ningún color para casos de muestras positivas con anticuerpos a VIH.**
- ◆ En contraste, **las muestras que son negativas para anticuerpos a VIH** permitirá a la gran mayoría de los anticuerpos marcados con enzima ligarse al antígeno fijado al soporte.
- ◆ Al agregar el sustrato de la enzima **resultará en el desarrollo de un color similar al control negativo.**

c. Prueba de ELISA con antígeno de captura

FUNDAMENTO

- ◆ Esta prueba puede ser realizada como una prueba indirecta o competitiva.
- ◆ Un anticuerpo monoclonal (específico para un determinante antigénico) es ligado a la fase sólida.
- ◆ Un reactivo con el antígeno específico del VIH se añade enseguida a la fase sólida, con el fin de que el antígeno se ligue al anticuerpo monoclonal.



PROCEDIMIENTO

1. Después de un período de incubación y de lavado, el suero que se va a examinar es añadido e incubado.
2. La fase sólida es luego lavada y se añade la inmunoglobulina anti-Ig humana marcada con la enzima, se incuba y se lava.
3. Añadir el sustrato de la enzima, mezclar e incubar.
4. Si es positiva, en la muestra de suero se produce color.

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B

PRINCIPIOS GENERALES

TEST DE LÁTEX DIRECTO PARA LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B (HBsAg)

- ◆ Se basa en una reacción de aglutinación de látex.
- ◆ **Las partículas de látex están sensibilizadas con anticuerpos** monoclonales reactivos frente al antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).
- ◆ En el caso de una reacción positiva pueden obtenerse distintos patrones de aglutinación. En ausencia del antígeno HBsAg no se produce la aglutinación.
- ◆ Los procedimientos del fabricante son incluidos en los paquetes (kits), y es especialmente importante que éstos se entiendan y que todo el equipo, material y condiciones ambientales estén disponibles para la realización de la prueba.
- ◆ Todos los juegos de las pruebas incluyen controles positivos y negativos que deben ser procesados durante cada examen para asegurar la validez de los resultados de la prueba.



¡ATENCIÓN!

- ◆ Los componentes del kit mantenidos a 2- 8 °C, son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. **No se debe congelar.**

X

MÉTODO

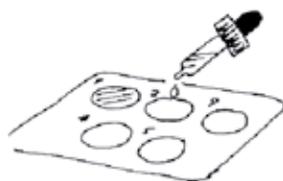
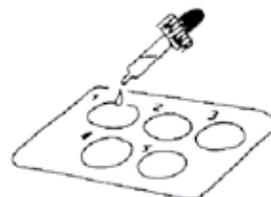
- ♦ Las partículas de látex están sensibilizadas con gamma-globulinas de conejo.

MATERIALES

- Reactivo de látex: 1 x 2,5 mL
- Control positivo: 1 x 0,5 mL Prediluido.
- Control negativo: 1 x 0,5 mL Prediluido.
- Placas de reacción.
- Agitadores desechables.

PROCEDIMIENTO

1. Llevar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
2. Homogenizar completamente el reactivo de látex.
3. Diluir la muestra que se examinará, 1/40 en salina (0,9% NaCl): 1 gota (50 μ L) de suero fresco más 2 mL de salina (0,9% de cloruro de sodio).
4. Colocar una gota de la **muestra diluida** en uno de los círculos de reacción.



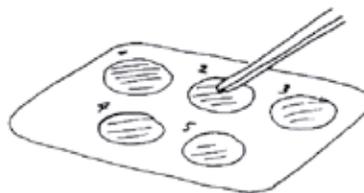
5. Colocar una gota de la **muestra sin diluir** en otro de los círculos.



6. Colocar una gota de cada uno de los controles en los correspondientes círculos de reacción.

7. Añadir una gota de reactivo de látex homogenizado a cada uno de los círculos.

8. Mezclar con **distintos agitadores**, cada uno de los círculos, de modo que el líquido se extienda por toda la superficie.



9. Balancear la placa y observar la presencia de aglutinación a los 5 minutos.

LECTURA

♦ De acuerdo con los siguientes patrones de aglutinación:

- **HBsAg negativo**

No hay aglutinación ni en la muestra diluida ni en la muestra sin diluir.

- **HBsAg positivo (nivel medio o elevado)**

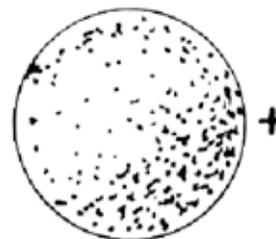
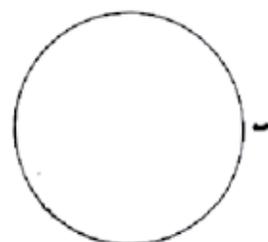
Aglutinación en las muestras diluidas y sin diluir.

- **HBsAg positivo (nivel bajo)**

Aglutinación en la muestra sin diluir. No aglutinación en la muestra diluida.

- **HBsAg positivo (nivel alto)**

Aglutinación en la muestra diluida. No aglutinación en la muestra sin diluir (por fenómeno de zona).



X

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR HIDATIDOSIS HUMANA

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La hidatidosis es una infección parasitaria del hombre y de algunas especies de animales, que tiene como agente etiológico la larva (hidátide) de céstode del género *Echinococcus*.
- ◆ Cuatro especies del género *Echinococcus* pueden infectar al hombre: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* y *E. vogeli*.
- ◆ El *Echinococcus granulosus* es la especie de mayor importancia desde el punto de vista de salud pública y de producción animal.

TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN DE LÁTEX (AL) PARA EL DIAGNÓSTICO DE HIDATIDOSIS HUMANA

- ◆ Se basa en una reacción de aglutinación de látex.
- ◆ **Las partículas de látex (como soporte) están sensibilizadas con antígeno hidatídico**, que al ser enfrentadas con suero que contiene anticuerpos específicos aglutinan evidenciando la reacción antígeno-anticuerpo.
- ◆ El antígeno utilizado para esta prueba se prepara a partir de líquido de quiste hidatídico de *Echinococcus granulosus* liofilizado.
- ◆ La sensibilidad de la prueba es de 98% y especificidad es de 90%.



MATERIALES

- Partículas de látex sensibilizadas.
- Suero control positivo.
- Suero control negativo.
- Suero problema.
- Placas de aglutinación.
- Palito mondadientes.

PROCEDIMIENTO

1. En una placa de aglutinación, colocar en uno de los círculos 20 μ L de partículas de látex sensibilizadas, más 20 μ L de suero problema.
2. En una placa de aglutinación, colocar en uno de los círculos 20 μ L de partículas de látex sensibilizadas, más 20 μ L del suero control positivo.
3. En una placa de aglutinación, colocar en uno de los círculos 20 μ L de partículas de látex sensibilizadas, más 20 μ L del suero control negativo.
4. Mezclar con ayuda de distintos palitos mondadientes cada uno de los círculos.
5. Luego agitar suavemente por rotación, balanceando la placa de aglutinación durante ocho minutos y finalmente realizar la lectura.

LECTURA

- ♦ De acuerdo con los siguientes patrones de aglutinación:
 - La reactividad del suero (positivo), se manifiesta por la aparición de pequeños grumos de aglutinación de las partículas de látex y que representa la formación del complejo antígeno-anticuerpo.
 - La falta de reactividad del suero (negativo), se manifiesta por la permanencia de la suspensión de las partículas al no estar presente anticuerpos específicos en el suero.

MÉTODOS SEROLÓGICOS EN EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La brucelosis es una enfermedad infecciosa, bacteriana, que afecta principalmente a los bovinos, caprinos porcinos y equinos. Es una enfermedad **zoonótica** de importancia mundial por afectar al hombre en ciertas circunstancias especiales.
- ◆ La *Brucella* es un microorganismo cocobacilar, no móvil, no esporulado, Gram negativo de 0,5 x 1,5 µm. Puede agruparse en pares o en cadenas cortas. Existen tres especies principales del género *Brucella*: *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, siendo esta última la que produce mayor severidad clínica en el hombre.
- ◆ **El diagnóstico microbiológico de brucelosis** se basa en la demostración de la presencia de brucelas en el organismo y/o en la presencia de los anticuerpos anti-*Brucella* con títulos demostrativos en la sangre y, ocasionalmente, en otros líquidos como el líquido cefalorraquídeo, exudados, etc.
- ◆ Puesto que no se consigue siempre el aislamiento de la brucela, es obligatorio recurrir para el diagnóstico al empleo de métodos serológicos.
- ◆ Si tomamos en consideración la estructura antigénica del género *Brucella* y la respuesta inmune del paciente, las pruebas serológicas se pueden agrupar según el antígeno o la clase de inmunoglobulina (IgM o IgG) que interviene en la reacción.
- ◆ **Las pruebas que se usan en el diagnóstico serológico de brucelosis son:**
 - Prueba de aglutinación en placa.
 - Prueba de aglutinación en tubo.
 - Prueba de 2- Mercaptoetanol.
 - Rosa de Bengala.
 - Anticuerpos bloqueadores y el fenómeno de zona que se observa en la prueba en tubo.



 **¡ATENCIÓN!**

- ◆ Tanto los antígenos como los sueros deben estar a temperatura ambiente por lo menos una hora antes de realizar la prueba.
- ◆ Los antígenos para diagnóstico deben mantenerse en refrigeración a una temperatura de 4 - 8 °C. Se debe evitar su congelación, porque quedan inutilizados definitivamente.

MATERIALES PARA SEROLOGÍA DE BRUCELOSIS

- Aglutinoscopio.
- Placa o lámina de vidrio dividida en 72 cuadrados de 3,0 a 3,5 cm por lado.
- Pipetas graduadas para medir 0,08, 0,04, 0,02, 0,01, 0,005 mL (puede usarse pipetas de 0,2 mL graduadas al milésimo o al centésimo).
- Gotero calibrado que dé exactamente 0,03 mL por gota.
- Agitadores de metal, de plástico o palitos de dientes.
- Un cronómetro.
- Sueros control positivo y negativo.
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm.
- Pipetas serológicas de 10 y 5 mL
- Jeringas de 2 mL de capacidad con aguja N.º 16 y 21/2 pulgadas de longitud.
- Micropipetas de 5 - 50 µL, de 20 - 200 µL y otra de 200 - 1 000 µL de rango.

X

MÉTODOS SEROLÓGICOS

a. Prueba de aglutinación rápida en placa

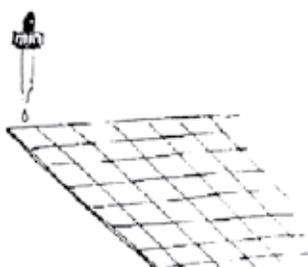
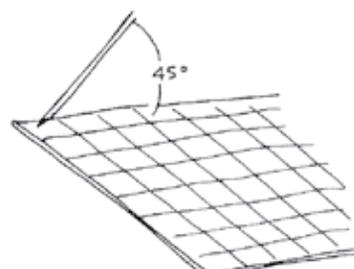
- ◆ Es una prueba de diagnóstico rápida, muy usada; sin embargo, los resultados pueden variar cuando los antígenos empleados son de mala calidad o la técnica no es la correcta.
- ◆ Se utiliza el antígeno preparado con *Brucella abortus*.
- ◆ Con esta prueba se detecta la presencia tanto de inmunoglobulina IgM como de la IgG.
- ◆ Se debe considerar como título presuntivamente positivo 1/100, o positivo cuando aumenta el título por lo menos el **cuádruplo del valor inicial** en una muestra examinada con por lo menos 1 semana de diferencia.

MÉTODO

1. Con la pipeta inclinada a 45° en contacto con la placa, depositar:

- 0,08 mL
- 0,04 mL
- 0,02 mL
- 0,01 mL
- 0,005 mL

de la muestra de suero en una columna de la placa.



2. Agitar suavemente el antígeno y con el gotero en posición vertical dejar caer **una gota del antígeno** sobre cada una de las **muestras del suero**.

3. Con un agitador o un palito de dientes, mezclar cuidadosamente el suero y el antígeno con un movimiento circular, empezando por la dilución más alta. La mancha circular ocupada por cada dilución debe tener los siguientes diámetros:

0,08 = 27 mm.

0,04 = 24 mm.

0,02 = 21 mm.

0,01 = 18 mm.

0,005 = 15 mm.

Si se trata del suero de un mismo paciente, no es necesario enjuagar y secar los agitadores cuando se agita de altas a bajas diluciones.

Cambiar de agitador cuando se trata de sueros de diferentes pacientes.

4. Levantar la placa y agitar con un suave movimiento rotatorio (cuatro veces).



5. Colocar la placa en el aglutinoscopio, se apaga la luz oscureciendo la habitación y se cierra la tapa para evitar la evaporación, y se espera 8 minutos.

6. Al término de los 8 minutos se levanta la tapa, se prenden las luces del aglutinoscopio, se rota nuevamente la placa por cuatro veces y hacer la lectura inmediatamente.

LECTURA

1. La lectura debe hacerse exactamente a los 8 minutos, que es cuando las muestras alcanzan la aglutinación máxima, si se prolonga el tiempo favorece la evaporación excesiva que da apariencia de aglutinación en la periferia de la mezcla suero-antígeno.

REACCIÓN COMPLETA

- ◆ La mezcla suero-antígeno ha sido aglutinada y **el líquido que las rodea es completamente transparente**. El tamaño de la masa aglutinada varía de fino a grandes grumos.

REACCIÓN INCOMPLETA

- ◆ Incluye todos los grados intermedios de reacción que van de trazas de partículas aglutinadas y **el líquido que las rodea no es transparente**. En tal caso, si el porcentaje de aglutinación es **mayor del 50%**, se informa como **reacción completa** en este título y si es **menor del 50%** se informa como **negativa**.

REACCIÓN NEGATIVA

- ◆ Es una mezcla homogénea de suero-antígeno sin ninguna evidencia de aglutinación.

TÍTULO DEL SUERO

Suero (mL)	Título
0,08	1/25
0,04	1/50
0,02	1/100
0,01	1/200
0,005	1/400



b. Prueba de rosa de Bengala

- ◆ Llamada también de la tarjeta o *Card Test*, se basa en la inactivación de las inmunoglobulinas IgM a un pH bajo. Detecta exclusivamente IgG 1.
- ◆ Utiliza el antígeno de rosa de Bengala (cepa de *Brucella abortus*).
- ◆ Se considera positiva cuando se observa aglutinación.
- ◆ En todos los casos de rosa de Bengala positiva se debe someter a una prueba confirmatoria como, por ejemplo, la aglutinación en tubo o la de 2-Mercapto-etanol.
- ◆ La prueba de rosa de Bengala es cualitativa, por lo que el resultado se informa como positivo o negativo.
- ◆ Es muy útil para el diagnóstico inicial de brucelosis aguda; no se recomienda para ver la evolución de los pacientes.

MÉTODO

1. Colocar 0,03 mL de suero problema sobre uno de los cuadrados de la lámina de vidrio (o tarjeta de cartón, lámina de plástico, etc.)
2. Colocar una gota (0,03 mL) de antígeno de rosa de Bengala cerca de la del suero problema.
3. Mezclar bien el suero y el antígeno utilizando un agitador o un palito de dientes distinto para cada muestra. La mancha circular ocupada por la muestra debe tener un diámetro de 23 a 24 mm.
4. Hacer girar la lámina o tarjeta durante 4 minutos a razón de 10 a 12 movimientos por minuto. Esto se puede hacer en forma manual o con rotadores mecánicos.



LECTURA

- ◆ El resultado de la prueba se lee a los 4 minutos sobre un fondo blanco.

REACCIÓN POSITIVA

- Presenta grumos de aglutinación, que pueden ser grandes o pequeños.

c. *Prueba en tubo y del 2-Mercaptoetanol*

- ◆ La prueba en tubo es una prueba confirmatoria (concluyente) de los resultados obtenidos con otras pruebas serológicas (ejemplo, la de placa). Detecta la presencia de inmunoglobulinas IgG e IgM.
- ◆ Los sueros hemolizados no son adecuados para la aglutinación en tubo por la interferencia del fenol con la hemoglobina libre, que puede ocasionar pseudoaglutinaciones.
- ◆ La prueba del 2-Mercaptoetanol (2ME) es una prueba selectiva que detecta presencia de IgG y se debe efectuar simultáneamente con la prueba en tubo.
- ◆ El 2ME es sensible a la luz y al calor y se deteriora rápidamente por exposición al aire. Se debe conservar en frascos de color ámbar herméticamente cerrados y en refrigeración.
- ◆ El título positivo del 2ME es considerado 1/25, es una buena prueba para el seguimiento del paciente.

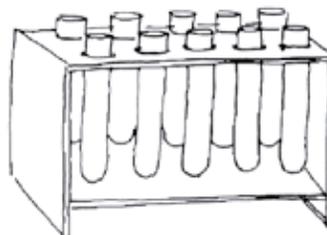
MATERIALES

- Antígeno para la prueba en tubo: 1 mL de antígeno más 99 mL de solución salina al 0,85% fenolada al 0,5%.
- Antígeno para la prueba 2ME: 1 mL de antígeno más 49 mL de solución salina al 0,85%.
- Solución de 2ME 0,1 molar: 0,39 mL de 2-Mercaptoetanol Q.P. más 49,61 mL de solución de cloruro de sodio al 0,85% (no utilizar salina fenolada).



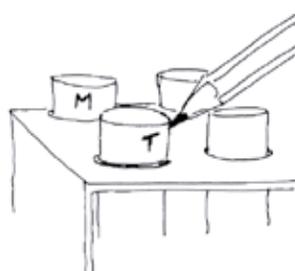
MÉTODO

1. Colocar dos hileras de 5 tubos de 13 x 100 mm en una gradilla por cada muestra de suero.

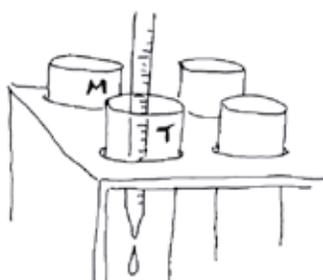


2. Identificar el primer tubo de cada hilera con el número correspondiente al suero problema.

3. Destinar una de las hileras a la prueba de tubo y marcarla con una T. Marcar con una M la otra hilera en la que se hará la prueba de 2ME.



4. Con una pipeta de 0,2 mL se mide 0,08 mL de suero (primera dilución) manteniendo la pipeta en posición vertical sobre la pared interna del tubo, depositar en el fondo del mismo los 0,08 mL.

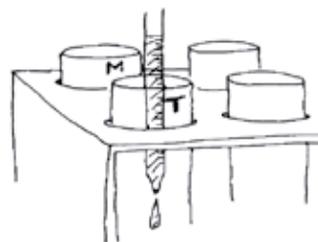


Utilizando el mismo procedimiento, echar 0,04 mL de suero en el segundo tubo, 0,02 mL en el tercero, 0,01 mL en el cuarto y 0,005 mL en el quinto tubo.

5. **Repetir el procedimiento** descrito para depositar las mismas cantidades de suero **en la segunda hilera de tubos.**
6. **Agregar 1 mL de solución de 2-ME a cada tubo de las hileras marcadas con M** (prueba de 2ME), agitar y dejar a temperatura ambiente por 30 minutos.

X

7. Agregar 2 mL de antígeno fenolado a cada tubo de las hileras marcadas con T (prueba de tubo); agitar.



8. Añadir 1 mL de antígeno para 2-ME a los tubos marcados con M, agitar.
9. Incubar los tubos por 48 horas a 37 °C en estufa.

LECTURA

- ◆ Las muestras deben ser observadas en el aglutinoscopio, con luz indirecta y fondo opaco:
 - **Reacción positiva**
La mezcla suero-antígeno **es clara** y se presentan grumos que no se rompen con una agitación suave.
 - **Reacción incompleta**
La mezcla suero-antígeno **es parcialmente clara** y la agitación suave no rompe los grumos, **si la aglutinación es mayor del 50%** se reporta como **positiva**.
 - **Reacción negativa**
La mezcla suero-antígeno **no es clara** y la agitación suave no revela grumos.
- ◆ Se reporta como título aquella dilución más alta en que se haya producido una reacción completa, tanto para la prueba en tubo como la de 2ME.



- ◆ Si se quiere conocer el título final del suero por el método de tubo se prepara una dilución 1/16:
 - 0,1 mL suero problema más 1,5 mL de suero fisiológico o suero negativo.
 - A continuación, se procede como el método anteriormente descrito.
 - La lectura será:

ml	No diluida	Diluida 1/ 16
0,08	1 / 25	1 / 400
0,04	1/50	1/ 800
0,02	1/100	1 / 1 600
0,01	1/200	1 / 3 200
0,005	1/400	1 / 6 400

FENÓMENO DE ZONA O PROZONA

- ◆ El fenómeno de zona se observa en la prueba en tubo.
- ◆ El fenómeno de zona es la **ausencia de aglutinación o presencia de aglutinación parcial** en las diluciones **bajas** y aglutinación **completa** en las diluciones **altas**.
- ◆ Está usualmente asociado con sueros que contienen un alto título de aglutininas.
- ◆ Con este tipo de reacción se debe reportar la dilución positiva más alta como título final, e indicar las diluciones en las cuales ocurre el fenómeno de zona.

CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS

- ◆ Uno de los mayores problemas que existe en el diagnóstico serológico es la **calidad de los antígenos** que se usan en la prueba.
- ◆ En el control de antígenos de *Brucella* se debe tener en cuenta los siguientes datos:



DATOS GENERALES

- ◆ **Anotar en una ficha:**
 - El laboratorio productor del antígeno.
 - El tipo de antígeno.
 - La cepa utilizada.
 - La fecha de expiración.
 - El volumen de antígeno por frasco.
 - El número de frascos y si viene con gotero o no.

ASPECTO DEL ANTÍGENO

- ◆ Anotar el color del antígeno comparándolo con el antígeno de referencia, si tiene presencia de grumos o si cuando se deja reposar el antígeno se depositan impurezas en el fondo del frasco.

PUREZA

- ◆ Hacer una coloración de Gram debiendo observarse solo la presencia de cocobacilos gramnegativos.

ESTERILIDAD

- ◆ Sembrar una gota del antígeno en:
 - Un tubo de agar tripticase soya.
 - Un tubo de caldo dextrosado con indicador de Andrade.
 - Un tubo con agar Saboraoud.
- ◆ Observar por 7 días. No deben crecer gérmenes en ninguno de los medios.

CONTROL DE pH

- ◆ Medir el pH, tanto del antígeno de prueba como del antígeno estándar, utilizando un potenciómetro o papeles indicadores de pH, debiendo estar dentro de un rango adecuado para el antígeno que se prueba.



MÉTODOS SEROLÓGICOS EN EL DIAGNÓSTICO DE SALMONELOSIS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La serología del género *Salmonella* constituye el complemento necesario para el diagnóstico de la fiebre tifoidea.
- ◆ El género *Salmonella* tiene principalmente dos clases de antígenos:
 - **El antígeno "O"** o antígeno somático termoestable.
 - **El antígeno "H"** o antígeno flagelar termolábil.
- ◆ A partir de la segunda semana, el paciente que sufre de fiebre tifoidea, contiene **anticuerpos** en la sangre, que pueden ser identificados probando el suero del paciente contra **antígenos** de salmonelas, los cuales pueden ser demostrados por la reacción de Widal.
- ◆ La reacción de Widal incluye:
 - **Aglutinación en placa**
Procedimiento ampliamente utilizado por su simplicidad.
 - **Aglutinación en tubo**
Debe utilizarse para confirmar la presencia de anticuerpos demostrados por la prueba en placa y para cuantificar su título.

AGLUTINACIÓN EN PLACA

- ◆ Se encuentra en el comercio antígeno de O y H de *Salmonella* para realizar la prueba. Este método es rápido y exacto.
- ◆ Es preciso agitar bien el vial de antígeno, antes de usarlo, para garantizar una suspensión uniforme y lisa. No deben congelarse.
- ◆ Almacenar los viales con antígeno a 2 - 8 °C.

MATERIALES

- Antígeno de *Salmonella typhi* H Y O.
- Materiales para obtención de suero del paciente.
- Pipetas serológicas de 0,2 mL
- Placa de vidrio grande (20 x 20 cm) dividida con lápiz de cera y regla en cuadrados (2,5 - 1,27 cm) de preferencia, cinco hileras de seis cuadrados.
- Un aplicador o un palito de dientes.

MÉTODO

1. Depositar en los cuadrados de cada hilera o en cada lámina, las siguientes medidas del suero del paciente: 0,08, 0,04, 0,02, 0,01 y 0,005 mL.
2. Añadir a cada medida del suero 0,03 mL de suspensión de antígeno.
3. Mezclar cada compuesto antígeno-suero con un aplicador o un palito de dientes, comenzar con la dilución de suero de 0,005 mL y continuar hasta la dilución de 0,08 mL.
4. Rotar (oscilar) la placa de vidrio suavemente 15 - 20 veces (durante 2 minutos). Proceder a la lectura inmediatamente.



LECTURA E INFORME

1. Observar la presencia de grumos, indicativo de aglutinación.
2. Los **grados de aglutinación** se interpretan con la siguiente escala:

4+	Aglutinación completa
3+	El 75% de las partículas, están aglutinadas
2+	El 50% de las partículas, están aglutinadas
1+	El 25% de las partículas, están aglutinadas
Negativo	Ninguna aglutinación

3. Las diluciones de suero sobre la placa corresponden a las siguientes diluciones en tubo (aglutinación en tubo):

- 0,08 mL de suero 1/20
- 0,04 mL de suero 1/40
- 0,02 mL de suero 1/80
- 0,01 mL de suero 1/160
- 0,005 mL de suero 1/320

4. Título del suero

El título del suero que se informa **corresponde a la última dilución del suero en que se produce una aglutinación de por lo menos 2+ (50%)**.

5. Ejemplo de cálculos.

Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	Resultados
Dilución 0,08 mL	Dilución 0,04mL	Dilución 0,02 mL	Dilución 0,01 mL	Dilución 0,005 mL	
2 +	1 +	-	-	-	Positivo 1/20
3 +	2 +	1 +	-	-	Positivo 1/40
4+	3 +	2 +	1 +	-	Positivo 1/80
4 +	4 +	3 +	2 +	1 +	Positivo 1/160
4 +	4 +	4 +	3 +	2 +	Positivo 1/320

X

AGLUTINACIÓN EN TUBO

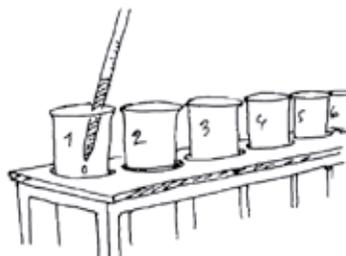
- ◆ En esta prueba, el suero del paciente se diluye de manera seriada en tubos de ensayo.

MATERIALES

- Obtención del suero del paciente.
- Cloruro de sodio al 0,85% formalizado (0,5 mL de formaldehído por 100 mL de solución salina).
- Antígeno de Salmonella O o H.
- Tubos 12 x 75 mm de fondo redondo.
- Gradillas.
- Pipetas serológicas de 1 mL y 5 mL.
- Baño MWaría.
- Fuente de luz adecuada.

MÉTODO

1. Colocar ocho tubos enumerados en una gradilla para cada suero a probar.
2. Con la pipeta medir 0,9 mL de cloruro de sodio al 0,85% y depositarlo en el tubo 1 de cada hilera.
3. Con la pipeta medir 0,5 mL de cloruro de sodio al 0,85% y depositarlo en cada uno de los tubos restantes (tubo 2 al tubo 8).
4. Agregar 0,1 mL del suero del paciente al tubo 1.



5. Mezclar bien el tubo 1.
6. Transferir 0,5 mL del tubo 1 al tubo 2. Mezclar a fondo.
7. Seguir llevando 0,5 mL del tubo 2 al tubo 3 y así sucesivamente hasta el tubo 7. Desechar los 0,5 mL del tubo 7 después de mezclar a fondo.
8. El tubo 8 es el tubo de control del antígeno.
9. Añadir 0,5 mL del antígeno (Salmonella O o H) a cada uno de los ocho tubos.
10. Agitar cada uno de los tubos para mezclar el antígeno y el suero.
11. Poner los tubos en un baño maría de acuerdo con lo siguiente:
 - **Antígeno de Salmonella O**, de 16 - 18 horas a 50 °C.
 - **Antígeno de Salmonella H**, 1 hora a 50 °C.

Es importante en esta prueba usar el tiempo y la temperatura recomendada y asegurarse que el baño María está en un lugar libre de vibraciones mecánicas.

12. Las diluciones resultantes van desde 1/ 20 hasta 1/1 280, respectivamente.

LECTURA E INFORME

- i. Utilizando una lámpara fluorescente contra un fondo negro, registrar el grado de aglutinación de la siguiente forma:

4-	El 100% de las partículas están aglutinadas y el líquido sobrenadante es transparente.
3+	El 75% de las partículas, están aglutinadas y el líquido sobrenadante está ligeramente turbio.
2+	El 50% de las partículas, están aglutinadas y el líquido sobrenadante está moderadamente turbio.
1+	El 25% de las partículas, están aglutinadas y el líquido sobrenadante está turbio.
Negativo	No es visible ninguna aglutinación y las partículas permanecen como una suspensión turbia. Esta reacción debe observarse en el tubo 8.



2. La aglutinación de los antígenos ("O", "H") tiene las siguientes características:

- **Antígeno somático "O"**
Se caracteriza por una aglutinación compacta, gruesa, la cual tiende a ser difícil de dispersar.
- **Antígeno flagelar "H"**
Tiene una aglutinación floculante y fina. Debe tenerse cuidado de no agitar una reacción de antígeno "H" demasiado, mientras se examina.

3. **Título del suero**

El título del suero que se informa **corresponde a la última dilución del suero en que se produce una aglutinación de por lo menos 2+ (50%)**.

4. Se considera que 1/160 de título para el antígeno "O" es diagnóstico de fiebre tifoidea, pero es todavía más importante demostrar que este título va aumentando en pruebas sucesivas 1 - 2 semanas después.

5. Ejemplo de cálculos

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Resultados
Dilución 1/20	Dilución 1/40	Dilución 1/80	Dilución 1/160	Dilución 1/320	Dilución 1/640	Dilución 1/1280	
2 +	1 +	-	-	-	-	-	Positivo 1/20
3 +	2 +	1 +	-	-	-	-	Positivo 1/40
4+	3 +	2 +	1 +	-	-	-	Positivo 1/80
4 +	4 +	3 +	2 +	1 +	-	-	Positivo 1/160
4 +	4 +	4 +	3 +	2 +	1 +	-	Positivo 1/320
4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	2 +	1 +	Positivo 1/640
4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +	2 +	Positivo 1/1280



CONTROL DE CALIDAD DE AMBAS PRUEBAS

- ◆ Para una mejor interpretación de las pruebas en placa y en tubo, siempre incluir un suero de control positivo y negativo.
- ◆ Tanto los sueros controles positivos como los negativos se diluyen en la misma proporción que el suero del paciente y se procesan exactamente de la misma forma siguiendo el procedimiento anteriormente descrito para la prueba en placa y en tubo.
- ◆ Un antígeno se considera que es de buena calidad si no aglutina con el suero control negativo y reacciona a un título de 1/80 o más con el suero control positivo.

LIMITACIONES

- ◆ La principal limitación es su interpretación. El diagnóstico definitivo no se hace sólo con el resultado del laboratorio; tiene que ser hecho por un médico, tomando en cuenta la historia clínica y el estado físico del paciente.
- ◆ La aglutinación en placa solamente es para descarte rápido de la enfermedad, cualquier cuantificación y confirmación del diagnóstico se hace con la prueba de aglutinación en tubo.
- ◆ Presentan aglutinaciones falsas positivas los pacientes con enfermedad hepática activa crónica y en individuos vacunados contra la tifoidea.

X

RED DE LABORATORIOS

RED DE LABORATORIOS	451	PROCEDIMIENTOS PARA ENVÍO DE HECES PARA EXAMEN BACTERIOLÓGICO	473
OBJETIVOS	451	Siembra y envío de muestras.....	473
UBICACIÓN DE LOS LABORATORIOS DE LA RED SEGÚN NIVEL DE COMPLEJIDAD	452	PROCEDIMIENTOS PARA ENVÍO DE SECRECIÓN URETRAL	474
Unidades tomadoras de muestra	452	Materiales	474
Laboratorios locales	452	Siembra y envío de muestras.....	474
Laboratorios intermedios	453	REGISTRO DE LAS MUESTRAS, REGISTRO DEL LABORATORIO E INFORMES DIARIOS Y MENSUALES	477
Laboratorio de referencia regional.....	453	Principios generales	477
Laboratorio de referencia nacional	454	Numeración de muestras	477
CONTROL DE CALIDAD EXTERNO	455	Los registros del laboratorio	478
Principios generales	455	Los informes diario y mensual.....	478
Control de calidad externo para enfermedades de importancia epidemiológica	463	ENVÍO DE MUESTRAS	463
ENVÍO DE MUESTRAS	463	Principios generales	463
Principios generales	463	Tipos de muestras que se envían.....	464
Tipos de muestras que se envían.....	464	Procedimiento de envío de muestras.....	464
Procedimiento de envío de muestras.....	464	PROCEDIMIENTOS PARA ENVÍO DE MUESTRAS DE SUERO	467
PROCEDIMIENTOS PARA ENVÍO DE MUESTRAS DE SUERO	467	Materiales	467
Materiales	467	Obtención y envío del suero.....	449
Obtención y envío del suero.....	449	PROCEDIMIENTOS PARA ENVÍO DE HECES PARA LA DETECCIÓN DE PARÁSITOS	470
PROCEDIMIENTOS PARA ENVÍO DE HECES PARA LA DETECCIÓN DE PARÁSITOS	470	Métodos.....	471
Métodos.....	471		

RED DE LABORATORIOS

- ◆ **La Red de laboratorios** se define como el conjunto de laboratorios de salud pública agrupados por niveles de complejidad de acuerdo con los servicios que prestan, su infraestructura, equipamiento, etc., en:
 - Unidades tomadoras de muestras.
 - Laboratorio local.
 - Laboratorio intermedio.
 - Laboratorio de referencia regional.
 - Laboratorio de referencia nacional.
- ◆ En este contexto, la concepción de red de laboratorios sirve para la **descentralización** de pruebas ya estandarizadas hacia los laboratorios de referencia regionales, a fin de lograr el **fortalecimiento de los servicios de salud** y mejorar la calidad de atención a la población.
- ◆ Su organización es responsabilidad de las subregiones de salud y del MINSA.
- ◆ Administrativamente los laboratorios regionales dependen de la Región de Salud.

OBJETIVOS

1. Establecer normas de las acciones de los laboratorios de la Red en:
 - Servicios.
 - Transferencia tecnológica.
 - Bioseguridad.
 - Control de calidad.
2. Coordinar y promover actividades de capacitación y transferencia tecnológica en los laboratorios de la Red de acuerdo al nivel de complejidad.
3. Desarrollar los laboratorios de la Red para que contribuyan a mejorar la vigilancia de las enfermedades transmisibles y no transmisibles para evaluar los programas de prevención y control de las mismas.

UBICACIÓN DE LOS LABORATORIOS DE LA RED SEGÚN NIVEL DE COMPLEJIDAD

UNIDADES TOMADORAS DE MUESTRAS

- ◆ Lo constituyen los laboratorios de los establecimientos de categoría I – 2 y I - 1, que son unidades tomadoras de muestras e información.
- ◆ Participa en la Red remitiendo al laboratorio local información, las muestras para ser procesadas y para acciones de control de calidad de la recolección.
- ◆ Los procedimientos de laboratorio que realiza incluye la obtención de muestras.

LABORATORIOS LOCALES

- ◆ Agrupa a los laboratorios de los establecimientos de categoría II – 1, I – 4 y I – 3.
- ◆ Cuenta con infraestructura física, equipos, materiales y reactivos, así como profesionales de salud para el trabajo en laboratorio de procedimientos según nivel de complejidad (ver Anexos).
- ◆ Efectúa las pruebas de muestras recolectadas o remitidas por los laboratorios de los establecimientos de categoría I – 2 y I - 1
- ◆ Remite muestras para pruebas especiales a ser efectuadas por el Laboratorio Intermedio.
- ◆ Además, realiza la capacitación, supervisión, evaluación y control de calidad de los procedimientos de obtención de muestras de las unidades tomadoras de muestras.



- ◆ Participa en la Red elevando al Laboratorio Intermedio la información para fines de vigilancia y partes de las muestras para acciones de control de calidad.

LABORATORIOS INTERMEDIOS

- ◆ Agrupa a los laboratorios de los establecimientos de categoría III – 2, III – 1 y II - 2.
- ◆ Cuenta con estructura física, equipos, materiales y reactivos así como profesionales de salud para el trabajo en laboratorio de los procedimientos, adicionalmente a los efectuados por los laboratorios locales, según nivel de complejidad (ver Anexos).
- ◆ Efectúa las pruebas de muestras recolectadas o remitidas por los laboratorios de los establecimientos de categoría II – 1, I – 4 y I – 3.
- ◆ Remite muestras para pruebas especiales a ser efectuadas por el Laboratorio de Referencia Regional.
- ◆ Ejerce la capacitación, supervisión, evaluación y control de calidad de los laboratorios locales.
- ◆ Participa en la Red elevando al Laboratorio de Referencia Regional información para fines de vigilancia y partes de las muestras para acciones de control de calidad.

LABORATORIO DE REFERENCIA REGIONAL

- ◆ Es el más complejo a nivel regional.
- ◆ Produce información y ofrece servicios confirmatorios de apoyo a la vigilancia epidemiológica.

- ◆ Cuenta con infraestructura física, equipos, material, reactivos y recursos humanos para el diagnóstico de bacterias, virus, hongos y parásitos de las muestras remitidas por el nivel intermedio.
- ◆ Ejerce la capacitación, supervisión evaluación y control de calidad al laboratorio intermedio.
- ◆ Remite muestras para pruebas especiales a ser efectuadas por el Laboratorio de Referencia Nacional.

LABORATORIO DE REFERENCIA NACIONAL

- ◆ El Laboratorio de Referencia Nacional es coordinado por el Instituto Nacional de Salud (INS).
- ◆ Cuenta con infraestructura y tecnología avanzada para la investigación, control de calidad y diagnóstico definitivo de muestras enviadas por el Laboratorio de Referencia Regional.
- ◆ **Promociona**, organiza y supervisa la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, en coordinación con los gobiernos regionales.
- ◆ **Capacita** en las nuevas tecnologías desarrolladas en los laboratorios de referencia nacional para que sean difundidas periódicamente a los laboratorios de referencia regional, y de este a los demás integrantes de la Red.
- ◆ **Descentraliza** funciones y transfiere atribuciones del nivel central hacia las Regiones para mejorar la capacidad de respuesta al usuario, con inmediata toma de decisión en su propio ámbito. Pero al mismo tiempo la información obtenida debe ser **centralizada** en el Laboratorio de Referencia Nacional a fin de tomar decisiones a nivel nacional.



CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ El control de calidad externo a cargo de la Red de laboratorios según el nivel de complejidad, se debe realizar en forma permanente para comprobar que la técnica empleada en un procedimiento de laboratorio sea la adecuada.
- ◆ El control de calidad externo, proporciona una mayor confiabilidad del producto asegurando la calidad de los materiales, reactivos y equipos empleados, mejorando la autoconfianza del personal y detectando fallas que pueden reflejarse en el rendimiento general.
- ◆ Asimismo, el realizar el control de calidad externo ayuda a detectar laboratorios de la Red que deben ser capacitados, para uniformizar procedimientos de técnicas de laboratorio y de notificación de resultados.

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO PARA ENFERMEDADES DE IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA

a. *Control de calidad externo de la baciloscopía*

- ◆ Es un proceso sistemático, para comparar retrospectiva y objetivamente los resultados de diastintos laboratorios mediante programas organizados por un laboratorio de referencia. Se denomina también prueba de competencia. Hay tres métodos de controles de calidad que deben combinarse para evaluar el desempeño del laboratorio.

1. EVALUACIÓN DIRECTA

- ◆ Se realizan a través de visitas técnicas como parte del proceso permanente de garantía de calidad externa, según los recursos disponibles y la capacidad de desempeño del laboratorio que se visita.

- ◆ El laboratorio supervisor debe realizar una visita semestral o anual al laboratorio supervisado por personal experimentado o formar equipos de supervisión con personal del laboratorio intermedio y el supervisor regional con listas de comprobación y de instrucciones para la recolección de una muestra de baciloscopías seleccionada al azar para el control de calidad externo.

2. EVALUACIÓN DE PANELES DE LÁMINAS DE BACILOSCOPIÁS (CENTRO A LA PERIFERIA)

- ◆ El panel es un conjunto de láminas teñidas en el laboratorio de referencia nacional o regional que se envían a los laboratorios supervisados, para lectura y notificación de resultados.
- ◆ Este método comprueba el desempeño del personal que realiza la lectura, no del laboratorio en su conjunto. Determina si el laboratorista puede realizar adecuadamente las lecturas de las baciloscopías.
- ◆ El control con paneles es útil para:
 - ✓ Proveer datos preliminares de las capacidades de los laboratorios periféricos, previamente al programa de relectura.
 - ✓ Detectar rápidamente los problemas asociados con la baja calidad de lectura de los resultados.
 - ✓ Evaluar la capacitación de los técnicos de laboratorio.
 - ✓ Evaluar la calidad de los resultados cuando no hay recursos disponibles para implementar la relectura.
- ◆ Criterios para la implementación del control externo de calidad con paneles:
 - ✓ Correcta preparación de los paneles de frotis.
 - ✓ Número de frotis a incluir en el panel.
 - ✓ Tipos de frotis a incluir (coloreados, positivos débiles, frotis espesos o muy finos).



- ✓ Condiciones de transporte de los frotis a los laboratorios (correo, servicio de transporte).
 - ✓ Tiempo acordado a los técnicos de los laboratorios para la lectura e informe de los resultados.
 - ◆ Criterios para la evaluación del control externo de calidad con paneles:
 - ✓ Entrega de los informes de los resultados a los laboratorios evaluados.
 - ✓ La implementación de las eventuales acciones correctivas.
 - ✓ Mecanismos para resolver los resultados discrepantes.
3. RELECTURA “DOBLE CIEGO” DE UNA MUESTRA DE LÁMINA DE BACILOSCOPIA (PERIFERIA AL CENTRO)
- ◆ Este método consiste en volver a leer una cantidad de láminas para evaluar si el laboratorio supervisado tiene un nivel aceptable de desempeño.
 - ◆ La muestra debe haber sido seleccionada al azar y la relectura debe hacerse a “doble ciego”, es decir el evaluador desconoce los resultados obtenidos por el laboratorio evaluado.
 - ◆ El método de la relectura a ciegas recomienda lo siguiente:
 - ✓ El muestreo realizado con 10% de los negativos y el 100% de los positivos no debe ser más recomendado.
 - ✓ Los errores mayores y menores son incluidos para obtener el tamaño de la muestra más pequeño posible.
 - ✓ Los frotis positivos y negativos no son más clasificados y conservados separadamente.
 - ✓ En caso de resultados discrepantes, se volverá a releer la lámina por el mismo evaluador, si persiste la discrepancia, se optará por un segundo evaluador.

- ✓ La calidad del laboratorio es evaluado en función al número y al tipo de errores que superan el umbral limite predeterminado y no calculando el porcentaje de errores.

b. Control de calidad externo de medios de cultivo para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis

Evalúa y documenta el desempeño de todos los aspectos del procedimiento de preparación de medios de cultivo Ogawa y Lowestein Jensen, realizados en los diferentes laboratorios de la red nacional para aislamiento de las micobacterias.

1. MUESTRA

- ◆ El laboratorio evaluado debe enviar una muestra de 12 tubos de medio recién preparado (no más de una semana)

2. TRANSPORTE

- ◆ El envío de los medios deberá realizarse en un contenedor de caja de cartón u otro material resistente e indicando la posición de los tubos durante el transporte.
- ◆ Los paquetes deberán estar correctamente etiquetados con la dirección exacta del Instituto Nacional de Salud, acompañados de la documentación respectiva.

3. METODOLOGÍA

- ◆ Los tubos con medio de cultivo de cada lote serán identificados y enumerados de acuerdo a los números aleatorios asignados.
- ◆ **La inspección** tomará en cuenta los siguientes criterios:
 - ✓ De los tubos: medida de los tubos, tipo de tapas, hermeticidad de la tapa.
 - ✓ Del medio de cultivo: volumen dispensado, presencia de burbujas en el



medio, consistencia (seca o húmeda), pH (color), inclinación del medio, esterilidad.

- ◆ **El Control microbiológico** se efectúa con la siembra en los tubos con medio de cultivo (Ogawa y Lowestein Jensen) de una suspensión bacteriana de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv (1 mg/mL).
- ◆ **La Lectura** se realiza a las cuatro semanas a partir de la siembra y se anota el número de tubo y el número de colonias observadas, por cada lote.
- ◆ **El análisis estadístico de los resultados** determina para cada lote de diez tubos los siguientes valores: 1) La suma de los recuentos de colonias observadas en cada tubo, 2) El promedio de recuento de colonias de cada lote de tubos del medio patrón y del medio en estudio y 3) La suma de las medias de los recuentos de cada lote al cuadrado.
- ◆ **Resultados e interpretación**, la evaluación de la calidad del medio en estudio se realizará por comparación de los resultados entre los lotes sembrados en una misma experiencia de control.
El límite inferior (LI) para considerar la calidad del medio será la media menos dos veces la desviación estándar (DS). Los lotes cuyo recuento promedio se encuentran por debajo de ese valor serán considerados de baja calidad.
- ◆ **Informe**, el laboratorio de referencia nacional tendrá un máximo de un mes para emitir el informe sobre el desempeño general de los laboratorios. Los laboratorios que obtengan resultados de baja calidad, se les realizará una supervisión directa por parte del laboratorio evaluador con el fin de tomar las respectivas medidas correctivas.

c. **Control de calidad externo de gota gruesa y frotis**

El procesamiento y la lectura de estos exámenes requieren capacitación previa y permanente. Para determinar las necesidades de capacitación y asegurar la calidad del diagnóstico existe el sistema de control de calidad de gota gruesa y frotis.

LÁMINAS PARA CONTROL

- ◆ Todos los laboratorios locales que realicen diagnóstico de malaria, enviarán para control de calidad, a su nivel inmediato superior el 100% de sus láminas positivas y los números pares de las negativas.
- ◆ Para el control de calidad de la lectura de láminas de gota gruesa el laboratorio supervisor tendrá en cuenta los siguientes criterios:
 - Cuando se reciben menos de 200 láminas al mes, se leerá 100% de positivas y 100% de negativas
 - Cuando el total de láminas recibidas sea igual o mayor de 200 al mes, se seleccionará para lectura de control 50% de positivas de una cruz a cuatro cruces; 100% de láminas positivas menores de media cruz y 50% de láminas negativas.
 - La selección del 50% de láminas será mediante el método de muestreo aleatorio simple, seleccionando las láminas hasta alcanzar el porcentaje indicado.

RECOMENDACIONES PARA EL ENVÍO DE LÁMINAS

- ◆ Separar los grupos de láminas positivas de las negativas.
- ◆ Acompañarlas de su ficha correspondiente.
- ◆ Las láminas deben estar limpias, eliminando todo residuo de aceite de inmersión. Para ello se debe eliminar todo resto de aceite mediante absorción al contacto con papel toalla o papel higiénico.
- ◆ El embalaje se hará con cartón corrugado y asegurado con pabilo, a fin de evitar su deterioro o rotura.
- ◆ Es aceptable para su revisión, el envío de láminas hasta con un retraso de una semana.



FRECUENCIA DE CONTROL

- ◆ El envío se realizará con frecuencia mensual.

PROCEDIMIENTO DE LECTURA POR EL LABORATORISTA SUPERVISOR

- ◆ El Laboratorio supervisor evalúa la reproducibilidad de lectura y la calidad técnica de la lámina.
- ◆ En la reproducibilidad de lectura se evalúa si el resultado es positivo, negativo y el tipo de especie.
- ◆ En la calidad técnica de la lámina se considera la calidad técnica de la gota gruesa y la calidad técnica del frotis.
- ◆ En la **calidad técnica de la gota gruesa**
 - Ubicación: 1 a 1,5 cm del tercio externo de la lámina.
 - Tamaño: 1 cm de diámetro.
 - Calidad: 10 a 20 leucocitos por campo
 - Deshemoglobinizado: el fondo de la lámina debe estar limpio de todo resto de glóbulos rojos, artefactos o resto de colorante.
 - Tonalidad: la tonalidad del parásito debe ser de un núcleo color rojo grosella, el citoplasma azul cielo y el pigmento de tonalidad amarillo sin brillo.
 - Precipitado: ausencia de precipitado.
- ◆ En la **calidad técnica del frotis**
 - Tamaño: 3 cm

- Ubicación: del centro al borde externo.
- Extendido: fino, con cabeza, cuerpo y cola.

INFORME DE LA EVALUACIÓN

- ◆ Los laboratorios intermedios remiten sus resultados de control de calidad, a sus niveles locales, en forma mensual.
- ◆ De la calidad técnica de la lámina: si las láminas cumplen con las características de calidad técnica de la gota gruesa y frotis se colocará “Sí”, lo cual significa que tiene calidad para la característica que se esté calificando; si las láminas no tienen estas características se colocará “No”, que significa que no tiene la característica evaluada. Luego se halla el porcentaje para cada característica evaluada, considerando sólo los calificativos como “Sí” con una regla de tres simple. Una vez hallado el porcentaje, este se compara con la escala de calificación:

- **Calidad Técnica de la lámina**

80%-100%	Bueno
70%- <79%	Regular
<70%	Deficiente

- ◆ De la reproducibilidad de lectura: para la reproducibilidad y concordancia de resultado, se determinará la concordancia y discordancia del total de láminas evaluadas expresadas en porcentaje y este se compara con la escala de calificación:

- **Reproducibilidad de lectura**

98%-100% de concordancia califica como	Bueno
95%-<98% de concordancia califica como	Regular
<95% de concordancia califica como	Deficiente

- ◆ El porcentaje máximo de discordancia aceptable es de 2%. Cuando sea mayor deberá realizarse una supervisión directa para detectar las causas de la discordancia y corregirlas, dando sugerencias y pautas para ello.



ENVÍO DE MUESTRAS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ En el sistema de la Red de Laboratorios se **suelen enviar muestras** de los laboratorios, según su nivel de complejidad, a otros más especializados, con el fin de que efectúen exámenes que ellos no están en condiciones de realizar.
- ◆ **El objetivo es transportar las muestras** y no a los pacientes, **para efectuar las pruebas**, cuando estas no se efectúan en el establecimiento de salud en que se está atendiendo y de esta manera facilitar la atención de los usuarios de los establecimientos.
- ◆ La remisión de muestras dependerá de la demanda y de la urgencia de las pruebas.
- ◆ Los **laboratorios intermedios** remitirán a los laboratorios locales, previa programación, los medios o material de transporte necesarios para el envío de muestras.
- ◆ **El laboratorio local** seguirá este mismo criterio con las unidades tomadoras de muestra.
- ◆ **Las unidades tomadoras** de muestra sin profesional de salud remitirán para su respectiva lectura, láminas de baciloscopías y malaria, por lo que la frecuencia de remisión puede ser semanal.
- ◆ **Las unidades tomadoras** de muestras que cuenten con profesional de salud pueden recolectar muestras para otros exámenes que se realizan en los laboratorios locales, en tal caso se debe tener días fijos coordinados, con el laboratorio local para la toma y envío de muestras.

TIPOS DE MUESTRAS QUE SE ENVÍAN

a. *Sustancias infecciosas*

- ◆ Son aquellas sustancias que contienen microorganismos vivos o viables transportados en medios de cultivo para diagnóstico microbiológico de bacterias, virus, rickettsias, parásitos, hongos, que pueden causar enfermedades tanto en el hombre como en los animales.

b. *Muestras para diagnóstico*

- ◆ Son todos los materiales de origen humano o animal que pueden contener sustancias infecciosas, consistentes en secreciones, excretas, sangre, tejidos y líquidos tisulares, enviados con fines de diagnóstico.

c. *Productos biológicos*

- ◆ Son productos biológicos terminados para uso humano o veterinario, por ejemplo, vacunas que se envían para control de calidad.

PROCEDIMIENTO DE ENVÍO DE MUESTRAS

- l. Las sustancias infecciosas y las muestras para diagnóstico que contengan probablemente sustancias infecciosas:
 - ◆ Requieren un **triple envase** conforme a las **recomendaciones de las Naciones Unidas**:
 - Un recipiente primario en el que se coloca la muestra.
 - Un recipiente secundario que contiene material absorbente entre él y el recipiente primario en cantidad suficiente para absorber todo el líquido de la muestra en caso de fuga.



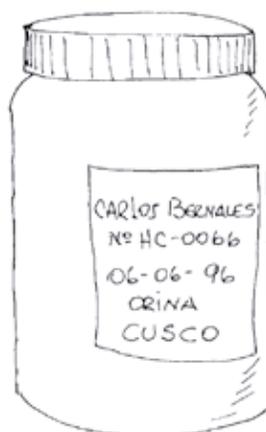
- Una envoltura exterior para proteger el recipiente secundario de las influencias exteriores durante el transporte (por ejemplo: deterioro físico y agua). **De no contar con este envase** se puede adaptar envases de plástico de cierre hermético, cajas de cartón, etc.

¡ATENCIÓN!

- ◆ **Nunca enviar** muestras en tubos tapados con tapones de algodón, ya que permiten el escape de la muestra.

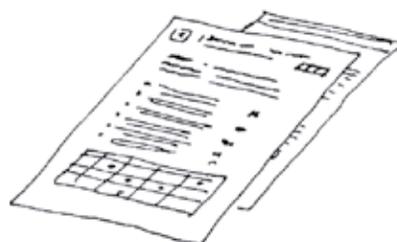
2. Para su identificación el recipiente de envío debe estar correctamente rotulado con:

- El nombre o código que identifique al paciente.
- Fecha de toma de muestra.
- Tipo de muestra.
- Examen solicitado.
- Procedencia.



Nunca rotular la tapa.

3. Debe estar acompañado de las fichas o formularios, de ese modo el laboratorio receptor podrá identificar la muestra y decidir como debe manipularla y examinarla.



4. Se debe establecer por anticipado arreglos con el transportista y el receptor para tener la seguridad que las muestras se reciban y analicen rápidamente, esto puede hacerse por teléfono o correo electrónico, radio, etc.

5. **No debe** enviarse ninguna sustancia infecciosa sin acuerdo previo entre el que lo envía, el que lo transporta y el que lo recibe.

6. APERTURA DE PAQUETES CON MUESTRAS

Las muestras se deben desembalar en bandejas.

Toda muestra que lleve etiqueta "**Peligro de infección**" o que se reciba por flete o correo aéreo será abierto en una cámara de seguridad biológica.



PROCEDIMIENTOS PARA ENVÍO DE MUESTRAS DE SUERO

- ◆ Los exámenes serológicos que requieren de suero tienen por finalidad determinar si éste contiene anticuerpos o antígenos de diversas enfermedades infecciosas.

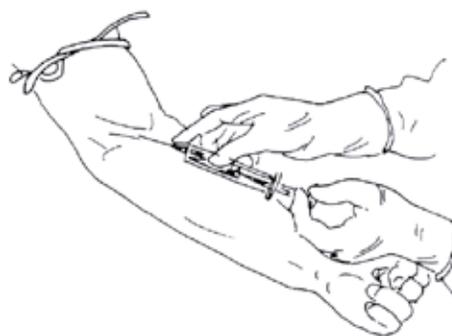
MATERIALES

- Materiales para la extracción de sangre.
- Una centrífuga.
- Un tubo para centrifugación, de 10 mL, de fondo redondo con tapa rosca o tapón de goma, o un tubo de "vacuntainer" estéril, o una jeringa estéril y seca.
- Pipetas de Pasteur estériles.
- Chupón.
- Un frasco estéril de 10 mL, con tapa hermética.



OBTENCIÓN Y ENVÍO DEL SUERO

- i. Extraer 10 mL de sangre de una vena del brazo. Una vez localizada la vena, asegúrese que haya una buena canalización que garantice un fluido rápido y fácil de la sangre; una punción incorrecta aumenta la posibilidad de hemólisis.



2. Sacar la aguja de la jeringa con ayuda de una pinza y eliminarla en un recipiente con desinfectante. Depositar la sangre en el tubo para la centrifugación; para evitar la hemólisis presione lentamente el émbolo de modo que la sangre fluya por la pared interna del tubo. Tapar éste inmediatamente.



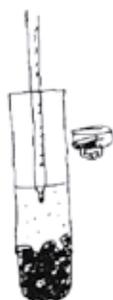
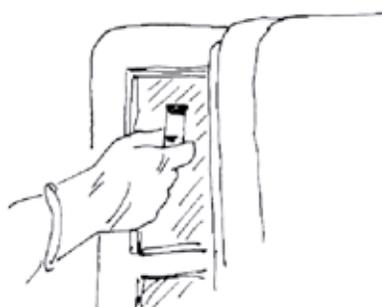
30min - 2 h



10 min

3. Dejar que la sangre coagule a la temperatura ambiente. Después de un lapso de 30 minutos a 2 horas, pero no más, centrifugar la sangre a 2 500 revoluciones por minuto durante 10 minutos.

4. Si no tiene centrífuga, la sangre se puede dejar varias horas en la refrigeradora; el coágulo se separará del suero.



5. Destapar el tubo. Aspirar el suero con una pipeta Pasteur y su respectivo chupón.



6. Depositar el suero en el frasco estéril de 10 mL. Colocar inmediatamente la tapa rosca en el frasco. Los tubos no deben llenarse totalmente, con el fin de evitar que se destape el tubo.



7. Debe poner posteriormente en práctica los principios generales para envío de muestras.
8. Asegurarse que el tiempo de transporte no sea mayor de 3 días.
9. La mayor parte de sueros se pueden conservar en el congelador de la refrigeradora a -2°C o temperaturas inferiores, por lo menos durante 1 mes.

PROCEDIMIENTOS PARA ENVÍO DE HECES PARA LA DETECCIÓN DE PARÁSITOS

- ◆ Cuando fuera necesario enviar al laboratorio de referencia muestras de heces para que se identifiquen parásitos que son difíciles de reconocer, se utilizan los preservantes siguientes:
 - Solución de formaldehído al 10% para hacer preparaciones líquidas.
 - MIF (merthiolate-iodine-formol) para hacer preparaciones líquidas.
 - Alcohol polivinílico (APV), para hacer tinciones permanentes.

MÉTODOS

a. *Uso de la solución de formaldehído al 10%*

1. Preparar una mezcla de 1 parte de heces y 3 partes de solución de formaldehído.



2. Con un agitador de vidrio disgregar completamente las heces.



3. Las muestras se preservan por tiempo indefinido si el frasco se cierra herméticamente.

4. Se preservan **huevos y quistes de parásitos**.



b. Uso de MIF

1. Mezclar en un tubo o frasco pequeño: 4,4 mL de solución de MIF con 0,3 mL de solución yodada de Lugol.



2. Agregar una porción de heces aproximadamente 2 mL.



3. Con un agitador de vidrio disgregar completamente las heces.

4. Se preservan **todas las formas de parásitos**, incluso las **formas vegetativas de amebas**. Las muestras se preservan por tiempo indefinido.

c. Uso de alcohol polivinílico (APV)

EN UN FRASCO

1. Vierta en un frasco, aproximadamente 30 mL de fijador APV hasta que llene las tres cuartas partes de su capacidad. Añadir heces hasta llenar la última cuarta parte de la capacidad del frasco.



2. Disgregar completamente las heces con un agitador de vidrio.



3. Se preservan **todas las formas de parásitos**, por tiempo indefinido.

EN UN PORTAOBJETO

1. Para observar amebas y flagelados colocar una pequeña porción de la muestra de heces en un extremo del portaobjetos. Agregar a esta porción tres gotas de APV.



2. Con un agitador de vidrio extender con cuidado esta mezcla hasta la mitad del portaobjeto.
3. Dejarlo secar durante 12 horas. (preferible a 37 °C).
4. Se preservan, así preparados hasta por tres meses. La tinción se aplicará al recibirlos en el laboratorio de referencia.



PROCEDIMIENTOS PARA ENVÍO DE HECES PARA EXAMEN BACTERIOLÓGICO

- ◆ A veces es necesario enviar muestras de heces al laboratorio de referencia con el fin de realizar un cultivo para:
 - Detectar vibriones de cólera.
 - Identificar otras bacterias (salmonella, shigella, etc.).

- ◆ Para ambos casos se puede usar la misma forma de transporte, en el medio de Cary y Blair (ver página 468).

SIEMBRA Y ENVÍO DE MUESTRAS

EN EL MEDIO DE TRANSPORTE CARY Y BLAIR

- ◆ **Se conservan hasta 4 semanas numerosos tipos de bacterias entéricas.**

- ◆ Mientras no se use este medio de transporte se deberá guardar a la temperatura ambiente durante 8 - 12 semanas, en frascos o tubos herméticamente cerrados.
 1. Una vez obtenida la muestra de heces depositar el hisopo con la muestra en un frasco que contenga medio de Cary y Blair (hasta 3/4 partes de su capacidad).

 2. En estas condiciones de transporte, el microorganismo patógeno permanece viable hasta por 4 semanas a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTOS PARA ENVÍO DE SECRECIÓN URETRAL

- ◆ Cuando fuera necesario enviar muestras de secreción uretral para diagnosticar enfermedades de transmisión sexual a un laboratorio de referencia se usará un medio de transporte.
 - El medio de Transgrow- Tg.
 - El medio de transporte de Stuart.

MATERIALES

- Medio de transporte y crecimiento de Transgrow - Tg o de Stuart.
- Asa bacteriológica o hisopo con la muestra.



SIEMBRA Y ENVÍO DE MUESTRAS

a. *El medio de transporte Transgrow - Tg*

- ◆ Un frasco de 30 mL, contiene 8 mL del medio sólido (en un lado del frasco) y está lleno con una mezcla de aire (90%) y bióxido carbónico (10%). Cada frasco deberá permanecer abierto el menor tiempo posible para evitar que escape el gas.
 1. Colocar el frasco en posición vertical. Desenroscar la tapa del frasco.
 2. Sosteniendo el frasco tan verticalmente como sea posible (para evitar que escape el gas) frotar el hisopo con la muestra en toda la superficie del medio sólido, de un extremo del frasco al otro, comenzando por el fondo. Colocar la tapa en el frasco inmediatamente.

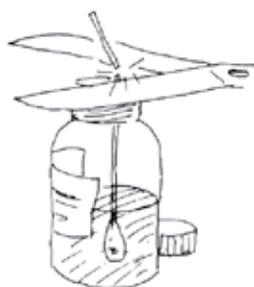
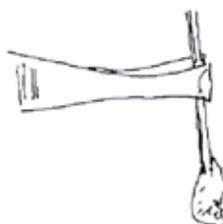


3. Enviar el frasco a temperatura ambiente.
4. Esta preparación se conserva hasta 3 días, sin embargo, es conveniente que se envíe cuanto antes.
5. Este medio de transporte también es adecuado para **meningococos**.

b. El medio de transporte semisólido de Stuart

- ◆ **El medio de transporte semisólido de Stuart** se almacena en frascos de 5 mL con tapa.

1. Sostener el hisopo con la muestra con una pinza estéril (flameada).



2. Introducir el hisopo en el frasco que contiene el medio de transporte. Cortar la porción excedente de la varilla del hisopo con tijeras estériles (flameadas).



3. Enroscar la tapa en el frasco inmediatamente.
4. El tiempo de conservación a temperatura ambiente es de 6 horas.

c. Medio de transporte en pipeta Pasteur

1. Aspirar la muestra de secreción al interior de una pipeta de Pasteur estéril taponada con algodón.

2. Colocar la pipeta dentro de un tubo vacío estéril protegiendo los extremos de la pipeta con algodón.



3. El tiempo de conservación a temperatura ambiente es de 6 horas.



REGISTRO DE LAS MUESTRAS, REGISTRO DEL LABORATORIO E INFORMES DIARIOS Y MENSUALES

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ Se debe hacer una relación numerada de todas las muestras y resultados del laboratorio.

De esta manera:

- Se evita el riesgo de confundir muestras.
 - Se puede localizar fácilmente los resultados.
-
- ◆ El laboratorio debe contar con:
 - Fichas impresas de exámenes de laboratorio que acompañen a las muestras.
 - Un registro donde se anoten los detalles concernientes a las muestras y los resultados obtenidos.
 - Planillas para elaborar informes mensuales.

NUMERACIÓN DE MUESTRAS

- ◆ A cada muestra, tan pronto como se reciba, se le asignará el número que le corresponda al anotarlo en el registro.
- ◆ Ese mismo número debe anotarlo inmediatamente en:
 - La ficha de la solicitud.
 - El recipiente de la muestra.
 - Cada tubo de ensayo que se emplee con la muestra.
 - Cada portaobjetos que se utilice con la muestra.
- ◆ De esta manera se evitarán las confusiones.

LOS REGISTROS DEL LABORATORIO

REGISTRO DE PRUEBAS EFECTUADAS Y REMITIDAS

- ◆ Los registros comprenden cuadernos de notas con páginas numeradas y cubiertas resistentes. Se anotará a cada muestra el número correspondiente en el registro para ese tipo de muestra.
- ◆ Asimismo, se colocará datos específicos como nombre y apellidos del solicitante, fecha de recepción de muestra y remisión de resultados, etc.
- ◆ Es preferible contar con registros separados para los diferentes análisis. Por ejemplo:
 - Registro de hematología.
 - Registro de orina.
 - Registro de parasitología.
 - Registro de bacteriología, etc.

LOS INFORMES DIARIO Y MENSUAL

- ◆ Ayudan a llevar la cuenta de las actividades de los laboratorios y es útil para:
 - Solicitar insumos.
 - Elaborar presupuesto.
 - Conocer la ganancia y demanda mensual de los laboratorios, así como el nivel de exoneración de pago.
- ◆ Toda esta información es útil para el responsable del laboratorio, para su administración.
- ◆ Es de gran ayuda para el Sistema de Red de Laboratorios ya que notifica el número de resultados positivos referente a diversas enfermedades transmisibles.



ANTICOAGULANTES	481	RECOMENDACIONES SOBRE LA CONDUCTA ANTE LA EXPOSICIÓN LABORAL A LA SANGRE U OTRAS SUSTANCIAS O MATERIALES	509
EDTA	481	POTENCIALMENTE CONTAMINADOS	509
Heparina	481	ALMACENAMIENTO DE SUSTANCIAS QUÍMICAS	511
Anticoagulante de Wintrobe	482	Principios generales	511
Citrato de sodio	482	Incompatibilidades de almacenamiento de sustancias peligrosas	513
Precauciones al usar anticoagulantes	482	ESQUEMA DE INOCULACIÓN Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS QUE PROVOCAN DIARREA	515
REACTIVOS Y SOLUCIONES	483	ESQUEMA DE CONIDIOS	516
Agar sangre al 6%	483	IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO SHIGELLA	517
Agua amortiguada	483	IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i>	517
APV (alcohol polivinílico)	483	USO DE DISCOS PARA ANTIBIOGRAMAS	518
Caldo infusión cerebro corazón (BHI)	484	RED DE LABORATORIOS FLUXOGRAMA DE MUESTRAS	519
Cary y Blair, medio de transporte	484	RED DE LABORATORIOS FLUXOGRAMA DE RESULTADOS	520
Drabkin, para dilución	485	REGISTROS DE LOS CONTROLES POR ENVIÓ DE PANELES DE FROTIS	521
Fenol acuoso al 5%	486	REGISTRO DE EVALUACIÓN DE LA RELECTURA DOBLE CIEGO	522
Formaldehído, solución al 10%	486	FORMATO DE RELACIÓN TOTAL DE LAMINAS ENVIADAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DEL DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE MALARIA	523
Formol	486	REGISTRO DE LA CALIDAD TECNICA DE GOTTA GRUESA Y FROTIS DE LAS LÁMINAS EVALUADAS	524
Hidróxido de potasio 10%	486	HOJA DE INFORME MENSUAL DE LABORATORIO	525
Giemsa, colorante	486	BIBLIOGRAFÍA	527
Giemsa diluido, colorante	487	GLOSARIO	534
Bluffer fosfato	487	INDICE ALFABÉTICO	536
Leishman, colorante	487	ILUSTRACIONES EN COLOR	543
Lugol (solución yodo - yodurada)	488	Glóbulos rojos o eritrocitos	543
Medio bifásico Usmaru (NNN modificado)	488	Glóbulos blancos o leucocitos	544
MIF (mertholate - iodine - formol)	489	<i>Plasmodium vivax</i> (frotis)	545
NNN, medio de cultivo	490	<i>Plasmodium ovale</i> (frotis)	545
Preparación de los reactivos para la tinción Gram	490	<i>Plasmodium falciparum</i> (frotis)	546
Preparación de los reactivos para la tinción Ziehl y Neelsen	491	<i>Plasmodium malariae</i> (frotis)	546
Prueba de identificación de carbohidratos para <i>neisseria gonorrhoeae</i>	492	<i>Plasmodium vivax</i> (gota gruesa)	547
Prueba de la oxidasa	493	<i>Plasmodium falciparum</i> (gota gruesa)	547
Prueba de superóxido	493	<i>Preparación de heces en fresco</i>	548
Reactivos usados para el método de la glucosa oxidasa	494	<i>Entamoeba histolytica</i>	548
Reactivos usados para medir creatinina en plasma o suero	494	<i>Entamoeba coli</i>	549
Reactivos usados para medir fosfatasa alcalina	495	<i>Endollmax nana</i>	549
Reactivos usados para medir potasio en sangre	496	<i>Giardia lamblia</i>	550
Reactivos usados para medir sodio en sangre	499	Frotis de heces - hematocina	550
Reactivos usados para medir transaminasas en sangre	500	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	551
Reactivos usados para medir úrea en sangre	501	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	551
Solución amortiguadora para VDRL	502	Helminfos	552
Solución amortiguadora tamponada	503	Huevos de fasciola hepática	552
Solución de citrato trisódico (38 g/L) (3,8%)	503	Huevos de helmintos	553
Solución de citrato y formaldehído	503	Huevos de áscaris lumbricoides	553
Solución de cloruro de sodio (0,85%) (solución salina isotónica)	503	Estructuras que se confunden con huevos y/o larvas de parásitos	554
Solución de sulfato de zinc (Faust)	504		
Solución salina al 0,9%	504		
Solución salina al 10%	504		
Solución salina más antibióticos (antibiótico concentrado)	504		
Solución yodurada de Lugol al 1 %	505		
Wright, colorante	505		
FICHA ÚNICA DE AVISO DE ACCIDENTE DE TRABAJO	506		

ANTICOAGULANTES

EDTA

- ◆ Son sales sódicas y potásicas del ácido etilendiaminotetracético (EDTA).
- ◆ Se utiliza 0,2 mL de esta solución en frascos de 2 mL o una gota para 5 mL de sangre. Poner a secar en estufa a 37 °C hasta que se observe un polvo blanco.
- ◆ Se utiliza para:
 - Recuento de plaquetas en cámara.
 - Efectuar dosaje de hemoglobina, hematocrito.
 - Efectuar recuento de glóbulos rojos y blancos.
 - Identificación de grupos sanguíneos.
- ◆ Sus ventajas son:
 - Impide la formación de "artefactos" incluso después de un reposo prolongado.
 - Conserva la sangre hasta 2 - 3 horas a temperatura ambiente y hasta 24 horas si es refrigerada a 4 °C.

HEPARINA

- ◆ Los tubos con heparina se pueden obtener en el comercio.
- ◆ Se utiliza 0,1 - 0,2 mg para 1 mL de sangre.
- ◆ Es el mejor anticoagulante para prevenir la hemólisis y para las pruebas de fragilidad osmótica.
- ◆ No se usa para el recuento de leucocitos, ni para extensión de sangre porque produce un fondo azul en las preparaciones de Wright.

ANTICOAGULANTE DE WINTROBE

- ◆ Se prepara disolviendo 1,2 g de oxalato de amonio y 0,8 g de oxalato de potasio en agua destilada diluyendo con 100 mL.
- ◆ Se utiliza 0,1 mL de esta solución por 1 mL de sangre. Poner a secar en estufa a 37 °C hasta que se observe un polvo blanco.
- ◆ Se usa para el recuento plaquetario porque permite la formación de agregados plaquetarios.

CITRATO DE SODIO

- ◆ Se prepara disolviendo 3,8 g de citrato de sodio en agua destilada diluyendo hasta 100 mL.
- ◆ Se usa para el estudio de la velocidad de sedimentación (1 parte de citrato para 4 partes de sangre), para efectuar pruebas de tiempo de protrombina, de trombina, de tromboplastina determinación de fibrinógeno (combina 1 parte de citrato para 9 partes de sangre).

PRECAUCIONES AL USAR ANTICOAGULANTES

- ◆ Mezclar inmediatamente después de depositar la sangre en el tubo con anticoagulante, invirtiendo el tubo o frasco varias veces con suavidad y uniformidad. **No agitar el contenido.**
- ◆ Usar recipientes limpios y secos antes de añadir el anticoagulante. **Los residuos de detergente disuelven los glóbulos rojos.**
- ◆ Las EDTA son estables a temperatura ambiente, pero el citrato de sodio y la heparina se deben conservar en la refrigeradora, son poco estables en climas cálidos.
- ◆ Usar las proporciones correctas. Utilizar recipientes y tubos graduados o colocar etiquetas en ellos de modo que el borde superior de estas quede al nivel de la cantidad de sangre que se requiera.



REACTIVOS Y SOLUCIONES

AGAR SANGRE AL 6%

- Medio agar base de sangre (comercial)	40	g
- Agua destilada	1 000	mL
- Sangre de cordero desfibrinada	60	mL
- pH final	6,8+/-0,2	

1. Mezclar bien el medio base en el agua destilada y calentar agitando frecuentemente hasta que hierva durante un minuto para disolver completamente el medio.
2. Usar la autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.
3. Cuando el medio se encuentre a una temperatura entre 45 - 50 °C, añadir la sangre desfibrinada de cordero, agitar para obtener una mezcla uniforme y repartir 20 mL en placas Petri estériles.
4. Controlar su esterilidad durante 24 horas a 37 °C.

AGUA AMORTIGUADA

- Ortofosfato disódico anhidro (Na ₂ HPO ₄)	4	g
- Ortofosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	5	g

Mezclar bien, disolver 1 g de la mezcla en 1 L de agua destilada y ajustar al pH 7,2

APV (ALCOHOL POLIVINÍLICO)

SOLUCIÓN 1

- Ácido acético glacial	5,0	mL
- Glicerol	1,5	mL
- Bicloruro de mercurio al 6% 2V	60,0	mL
- Ácido acético glacial al 5 %	4,5	mL
- Alcohol etílico al 95% 1V	30,0	mL

SOLUCIÓN SCHAUDINN

- Solución Schaudinn 93,5 mL

SOLUCIÓN 2

- Alcohol polivinílico (APV) 5,0 g

Preparar la solución 1 y agregar caliente la solución Schaudinn a 75 °C. Agregar el APV, mientras se agitan las soluciones en forma constante.

CALDO INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN (BHI)

- Infusión de cerebro de ternera 200 g
- Infusión de corazón de vacuno 250 g
- Peptona proteosa 10 g
- Dextrosa 2 g
- Cloruro de sodio 5 g
- Fosfato de sodio dibásico 2,5 g
- Agua destilada 1000 mL
- pH final 7,4 +/-0,2

1. Mezclar los ingredientes en agua destilada y calentar agitando frecuentemente hasta que hierva durante un minuto para que se disuelva por completo.
2. Distribuir 8 mL del medio en tubos tapa rosca de 16 x 125.
3. Usar el autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
4. Controlar la esterilidad del medio durante 24 horas a 37 °C.

CARY Y BLAIR, MEDIO DE TRANSPORTE

- Fosfato disódico 1,1 g
- Cloruro de sodio 5,0 g
- Tioglicolato de sodio 1,5 g
- Agar 5,0 g
- Agua destilada 991,0 mL
- pH final 8,4



1. Colocar todos los ingredientes en un balón con el agua destilada.
2. Se calientan en baño maría hasta que la solución esté clara (no se permite que hierva).
3. Enfriar hasta 50 °C.
4. Agregar 9 mL de solución de cloruro de calcio al 1% recién preparado y se ajusta el pH a 8,4 con hidróxido de sodio (NaOH) ION.
5. Colocar cantidades de 5 a 7 mL del medio de transporte preparado en tubos de 13 x 100 mm, estériles, con tapa de rosca (aflojado).
6. Colocar los tubos conteniendo el medio de transporte a 100 °C en baño maría, hirviendo durante 15 minutos. Enfriar y apretar las tapas después de la esterilización a vapor.

¡ATENCIÓN!

- ◆ El medio es bastante estable si se almacena en un lugar fresco, oscuro y no se permite que se seque.
- ◆ Este medio se puede utilizar mientras no presente pérdida de volumen, contaminación, ni cambio de color.

DRABKIN, PARA DILUCIÓN

- ◆ El líquido de Drabkin para dilución se puede preparar con tabletas reactivas que se adquieren directamente del fabricante, que se acompañan de las instrucciones pertinentes.

FENOL ACUOSO AL 5%

- | | | | |
|---|--------------------------|-----|----|
| - | Ácido fénico (cristales) | 1 | kg |
| - | Agua destilada | 100 | mL |

SOLUCIÓN *STOCK*

- ◆ Al ácido fénico, agregar 100 mL de agua destilada y calentarlo en baño maría, obteniendo 1 100 mL de fenol acuoso.

SOLUCIÓN DE TRABAJO

Tomar 55 mL de la solución *stock* y completar con 945 mL de agua destilada, obteniendo 1 000 mL de fenol acuoso al 5%.

- ◆ Conservar en un frasco de color ámbar.

FORMALDEHÍDO, SOLUCIÓN AL 10 %

- Solución comercial de formaldehído, por lo menos al 37% ("formalina") 100 mL
- Agua destilada 300 mL

- ◆ El formaldehído es corrosivo y tóxico.

FORMOL

- ◆ El formol comercial contiene aproximadamente 40% de peso de formaldehído. Se le considera como formalina al 100% Y partiendo de él se hacen las diluciones que se requieran.

HIDRÓXIDO DE POTASIO 10%

- Hidróxido de potasio 10 g
- Agua destilada 100 mL

1. Una vez pesados los ingredientes, mezclar bien y agitar para disolver.
2. Filtrar en el caso de observar precipitados.
3. Almacenar en un frasco ambar o evitar contacto con luz y a temperatura ambiente.



GIEMSA, COLORANTE

SOLUCIÓN *STOCK* (SOLUCIÓN MADRE)

-	Colorante Giemsa en polvo	0,75	g
-	Alcohol metílico	65,	mL
-	Glicerina	35,0	mL

1. Disolver el colorante Giemsa en un frasco oscuro con perlas de vidrio, agregar el alcohol metílico y la glicerina.
2. Agitar el frasco hasta lograr una mezcla homogénea.
3. Mantener el frasco tapado por 3 días.
4. Usar después del tercer día, previa filtración del preparado.

GIEMSA DILUIDO, COLORANTE

-	Solución <i>stock</i> (Giemsa, colorante)	1	mL
-	Agua destilada o <i>buffer</i> fosfato (PBS)	9	mL

Mezclar antes de usar.

BUFFER FOSFATO (PBS)

-	Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ HP04)	6	g
-	Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ P04)	5	g

1. Mezclar las sales, pesar 1 g de la mezcla y distribuir en tubos.
2. Disolver el contenido de cada uno de los tubos en un litro de agua destilada.
 - El pH final es de 7,2.

LEISHMAN, COLORANTE

- Colorante de Leishman 1,5 g
- Metanol c.s.p. 1000 mL

Enjuagar con metanol un frasco limpio. Colocar en su interior perlas de vidrio limpias y secas. Añadir el colorante y el metanol, hasta disolver bien. Así el colorante estará listo para su uso.

- ◆ Es importante impedir la humedad durante su elaboración y su posterior conservación.

LUGOL (SOLUCIÓN YODO - YODURADA)

- Yodo metálico 5 g
- Yoduro de potasio 10 g
- Agua destilada 100 mL

1. Preparar de la misma manera que la solución yodurada de lugol.
2. Conservar en un frasco oscuro.

MEDIO BIFÁSICO USMARU (NNN MODIFICADO)

- Agua destilada c.s.p. 100 mL
- Agar sangre base 4 g
- Antibiótico concentrado 1 mL
- Sangre de conejo desfibrinada estéril 15 mL

1. Diluir el agar sangre en 100 mL de agua destilada y usar el autoclave.
2. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
3. Sacar 15 mL de agar y agregar 15 mL de sangre desfibrinada, cuando el medio esté a 56 °C.
4. Agregar 1 mL de antibiótico concentrado.



5. Homogenizar y repartir aproximadamente 1 mL del medio en tubos de 13 x 100.
6. Colocar los tubos en plano inclinado y dejar enfriar.
7. Controlar a 37 °C por 24 horas.
8. Guardar los tubos a 4 °C hasta el momento de su uso.
 - ◆ Se recomienda usar tubos conservados en refrigeración hasta por 15 días. Pasados los 15 días preparar nuevos medios de cultivo.

MIF (MERTHIOLATE - IODINE – FORMOL)

SOLUCIÓN MADRE

- Tintura de tiomersal, 1: 1000 (Merthiolate)	200	mL
- Solución de formaldehído (N.º 1)	25	mL
- Glicerol	5	mL
- Agua destilada	250	mL

1. Mezclar y conservar en un frasco oscuro hasta 3 meses.
2. Preparar solución yodurada de lugol, 50 g/l (5%)

- Yodo	5	g
- Yoduro de potasio (KL)	10	g
- Agua destilada c.s.p.	100	mL

Preparar de la misma manera que la solución yodurada de Lugol (N.º 2). Guardar en un frasco oscuro por un mes.

3. Cuando se vaya a usar, mezclar:

- Solución madre de tiomersal	9,4	mL
- Solución yodurada de lugol (5%) 50 g/L	0,6	mL

NNN, MEDIO DE CULTIVO

- Bacto agar	1,4	g
- Cloruro de sodio	0,6	g
- Agua destilada	90	mL
- Sangre desfibrinada de conejo	13,5	mL
- Solución <i>stock</i> de antibióticos	1	mL

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS PARA LA TINCIÓN GRAM

VIOLETA CRISTAL

Solución A

- Violeta cristal (certificada)	2	g
- Alcohol de 95°	20	mL

Solución B

- Oxalato de amonio	0,8	g
- Agua destilada	80	mL

1. Mezclar las dos soluciones A y B. Guardar la mezcla por 24 horas antes de usar.
 2. Filtrar en un frasco para tinción con un filtro de papel.
- ♦ Esta solución puede durar 2 o 3 años.

SOLUCIÓN DE LUGOL PARA TINCIÓN GRAM

- Yodo	1	g
- Yoduro de potasio (KI)	2	g
- Agua destilada	300	mL

1. Pulverizar en un mortero el yodo y el yoduro de potasio secos.
2. Añadir el agua destilada poco a poco, algunos mililitros cada vez, y mover hasta que el yodo y el yoduro se disuelvan.



3. Verter esta solución en un frasco de vidrio oscuro y mezclado con el resto de agua destilada.

SOLUCIÓN DE SAFRANINA

Solución madre

- | | | |
|-----------------------------|-----|----|
| - Safranina O (certificada) | 2,5 | g |
| - Alcohol de 95° c.s.p. | 100 | mL |

Solución de trabajo

- | | | |
|------------------|----|----|
| - Solución madre | 10 | mL |
| - Agua destilada | 90 | mL |

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS PARA LA TINCIÓN ZIEHL Y NEELSEN

FENOL ACUOSO

- | | | |
|----------------------|-----|----|
| - Fenol cristalizado | 100 | g |
| - Agua destilada | 10 | mL |

1. Agregar al fenol cristalizado el agua destilada. Calentar en baño María hasta la completa disolución y enfriar.

◆ El fenol acuoso se mantiene líquido.

FUCSINA FENICADA

- | | | |
|-------------------------|------|----|
| - Fucsina básica | 3 | g |
| - Alcohol de 95° | 100 | mL |
| - Fenol acuoso | 55 | mL |
| - Agua destilada c.s.p. | 1000 | mL |

1. Disolver por agitación la fucsina básica en alcohol de 95°. Agregar el fenol acuoso, agitar y agregar agua destilada hasta completar 1 litro.

2. Dejar reposar por 24 horas y luego filtrar.

AZUL DE METILENO

- Azul de metileno	1	g
- Alcohol de 95°	100	mL
- Agua destilada c.s.p.	1000	mL

1. Disolver por agitación el azul de metileno con el alcohol de 95°. Agregar agua destilada hasta completar 1 litro.
2. Dejar reposar por 24 horas. Filtrar antes de usar.

SOLUCIÓN DECOLORANTE

- Ácido clorhídrico	30	mL
- Alcohol de 95°	970	mL

Con la pipeta dejar escurrir el ácido clorhídrico por las paredes del matraz, que contiene el alcohol, agitar suavemente hasta completar la mezcla.

- ◆ Los reactivos deben conservarse en un frasco de color ámbar.
- ◆ Se recomienda preparar los colorantes para un consumo no mayor de un mes.
- ◆ Todos los reactivos deben filtrarse cada vez que sean transferidos a los pequeños frascos cuentagotas que se emplean para la tinción. Esto es especialmente necesario para la fucsina fenicada.

PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS PARA *Neisseria gonorrhoeae*

MEDIO BASE AGAR CISTINA TRIPTICASA

El medio base agar cistina tripticasa contiene (Difco o BBL):

- Triptosa	20	g
- Cistina - L	0,5	g
- Cloruro de sodio	5	g
- Sulfito sódico	0,5	g
- Agar	2,5	g
- Rojo de fenol	0,017	g
- ph final	7,3 +/0,2	a 25 °C
- Agua destilada	1 000	mL



- Carbohidratos (0,5 o 1 %): glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa y fructosa. Esterilizados por filtración.
1. Disolver el medio en el agua destilada.
 2. Añadir los carbohidratos al medio base.
 3. Repartir en tubos pequeños.
 4. Inocular las colonias del agar chocolate a los tubos con carbohidratos, por puntura profunda.
 5. Incubar 18 - 24 horas a 37 °C en aerobiosis (sin CO₂).
 6. Realizar la lectura mediante el cambio de color del indicador rojo de fenol.
- ♦ Se considera positiva la producción de ácido cuando el indicador rojo de fenol ha cambiado de rojo a amarillo.

PRUEBA DE LA OXIDASA

1. Preparar el reactivo N, N, N, N, tetrametil-p-fenilendiamine al 1%, en un tubo o en un frasco color ámbar.
 2. Humedecer un pedazo de papel filtro con el reactivo preparado.
 3. Tomar una porción de la colonia sospechosa con un palito de madera o un alambre de platino.
 4. Colocarlo haciendo una estría sobre el papel de filtro, esperar la reacción 30 segundos.
- ♦ Si la reacción es positiva el papel tomará un color azul violáceo, y si es negativa no habrá cambio de color en el papel.

PRUEBA DE SUPEROXOL

PRUEBA DE LA CATALASA USANDO PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 30%

1. Depositar una gota del peróxido de hidrógeno en una lámina portaobjeto.
2. Con el asa de siembra colocar una porción de la colonia sobre la gota.

3. Observar inmediatamente.
- ◆ La presencia de burbujas indicará que la prueba es positiva.

REACTIVOS USADOS PARA EL MÉTODO DE LA GLUCOSA OXIDASA

SOLUCIÓN DE FOSFATO MONOSÓDICO 0,5 M

- | | | | |
|---|-----------------------------------|------|------------------------------------|
| - | NaH ₂ P ₀ 3 | 76 | g |
| - | Agua destilada | 1000 | mL |
| - | pH final | 7,0 | ajustar
con hidróxido de sodio. |

REACTIVO ENZIMA-COLOR

- | | | | |
|---|--|-----|----|
| - | Glucosa oxidasa | 125 | mg |
| - | Peroxidasa | 5 | mg |
| - | O-dianisidina en alcohol de 95° (al 1 %) | 0,5 | mL |

- ◆ Preparado para 100 mL de solución de fosfato.
- ◆ Una vez preparado debe conservarse en el refrigerador.

REACTIVOS USADOS PARA MEDIR CREATININA EN PLASMA O SUERO

SOLUCIÓN ALCALINA DE PICRATO

- | | | | |
|---|--------------------------------------|----|----|
| - | Hidróxido de sodio al 10 por 100 p/v | 2 | mL |
| - | Solución saturada de ácido pícrico | 10 | mL |

Mezclar la solución de hidróxido de sodio con la solución saturada de ácido pícrico. El color del picrato alcalino no debe ser más de dos veces intenso que el de la solución de ácido pícrico.



SOLUCIÓN PATRÓN CONCENTRADA DE CREATININA

- | | | |
|---------------------------------|------|----|
| - Creatinina pura | 1 | g |
| - Ácido clorhídrico N/10 c.s.p. | 1000 | mL |

Disolver ambos ingredientes y completar 1 litro con el mismo solvente.

SOLUCIÓN PATRÓN DE CREATININA

- | | | |
|---|-----|----|
| - Solución patrón concentrada de creatinina | 1 | mL |
| - Agua destilada | 100 | mL |

- ◆ Esta solución debe prepararse cada semana.

REACTIVOS USADOS PARA MEDIR FOSFATASA ALCALINA***BUFFER* pH 10,5**

- | | | |
|-------------------------|-------|----|
| - Glicocola | 7,5 | g |
| - Cloruro de magnesio | 95 | mg |
| - NaOH 0,1 N | 85 | mL |
| - Agua destilada c.s.p. | 1 000 | mL |

- l. Mezclar los dos primeros ingredientes; luego añadir el NaOH 0,1 N Y completar a 1 000 mL con agua destilada.
- ◆ En caso necesario ajustar el pH con NaOH 0,1 N o con HCl 0,1 N. Como conservador se agrega unas gotas de cloroformo.
 - ◆ Es estable un año en el refrigerador.

SUSTRATO 0,012 M

- l. Disolver 400 mg de p-nitrofenilfosfato disódico tetrahidratado en agua destilada y completar hasta 100 mL.
- ◆ Es estable 8 semanas en el congelador.

HIDRÓXIDO DE SODIO 0,02 N

Disolver 800 mg de NaOH y completar con agua destilada hasta 1000 mL.

SOLUCIÓN TESTIGO DE P-NITROFENOL

- p-nitrofenol	0,0835 g
- NaOH 0,1 N	6 mL
- Agua destilada c.s.p.	100 mL

1. Mezclar el p-nitrofenol con el NaOH 0,1 N.
 2. Diluir en matraz de 100 mL hasta 90 mL con agua destilada y añadir gota a gota HCl 1 N hasta que la solución adquiera un tinte amarillo pálido.
 3. Completar a 100 mL con agua destilada.
- ◆ Es estable un año en el refrigerador.

SOLUCIÓN TESTIGO DE TRABAJO 0,06 mM/mL

1. Diluir 1 mL de la solución testigo de p-nitrofenol con NaOH 0,02 N hasta 100 mL.
- ◆ Esta solución debe prepararse antes de su uso.

REACTIVOS USADOS PARA MEDIR POTASIO EN SANGRE

REACTIVO DE COBALTONITRITO DE SODIO

Solución A

- Nitrato de cobalto	25 g
- Ácido acético glacial	12,5 mL
- Agua destilada	50 mL

Solución B

- Nitrato de sodio	120 g
- Agua destilada	180 mL



1. Para la solución A, disolver el nitrato de cobalto en agua destilada, luego se agrega el ácido acético glacial.
 2. Para la solución B, disolver en otro matraz el nitrato de sodio en agua destilada.
 3. Agregar 210 mL de la solución B a la totalidad de la solución A. Agitar bajo campana hasta que se ha eliminado el óxido nitroso y filtrar.
- ♦ Este reactivo se conserva en el refrigerador y dura aproximadamente un mes.

SOLUCIÓN SEMISATURADA DE ACETATO DE SODIO

- | | | |
|----------------------------------|-----|----|
| - Acetato de sodio trihidratado | 130 | g |
| - Agua destilada calentada 45 °C | 100 | mL |
1. Agregar al acetato de sodio trihidratado al agua destilada calentada previamente a 45 °C. Agitar bien y colocar la mezcla en la estufa a 37 °C durante la noche.
 2. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente dejando que sedimente el precipitado. Diluir con otros 100 mL de agua destilada.

SOLUCIÓN LAVADORA SATURADA CON COBALTONITRITO DE SODIO Y POTASIO

- | | | |
|---|------|----|
| - K ₂ S ₀₄ | 70 | mg |
| - Agua destilada | 100 | mL |
| - Solución semisaturada de acetato de sodio | 25 | mL |
| - Reactivo de cobaltonitrito de sodio | 12,5 | mL |
1. Disolver K₂S₀₄ en el agua destilada. Agregar lentamente la solución semisaturada de acetato de sodio y el reactivo de cobaltonitrito de sodio. Mezclar bien.
 2. Dejar reposar por 30 minutos.
 3. Filtrar lavando el precipitado dos veces con alcohol etílico de 70° y una vez más con alcohol de 95°, saturando luego con alcohol etílico de 10° con el precipitado, y dejar el resto de este en el fondo del frasco sin descartarlo.
- ♦ Para su uso tomar una pequeña porción del líquido sobrenadante de ese frasco y filtrar antes de utilizarlo.

REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU

- Tungsteno de sodio	100	g
- Molibdato de sodio	25	g
- Ácido fosfórico al 85%	50	mL
- Ácido clorhídrico concentrado	100	mL
- Sulfato de litio	150	g
- Bromo	2 ó 3	gotas
- Agua destilada	750	mL

1. Usar un erlenmeyer de 2 L.
 2. Colocar el tungsteno de sodio y el molibdato de sodio con 700 mL de agua destilada. Agitar y, una vez disuelto el contenido, agregar el ácido fosfórico al 85% y el ácido clorhídrico concentrado. Hervir esta mezcla durante 10 minutos.
 3. Añadir el sulfato de litio, 50 mL de agua destilada y 2 o 3 gotas de bromo; se hierve la mezcla durante 15 minutos para separar el exceso de bromo, se enfría, se diluye hasta 1 L.
 4. Filtrar. El reactivo debe tener color amarillo, sin tinte verdoso.
- ♦ Se conservará en el refrigerador. Si durante su conservación adquiere un color verdoso, hay que tratarlo nuevamente con bromo.

REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU PARA EL USO

- ♦ Se debe preparar antes de su uso diluyendo un volumen de la solución anterior con 2 volúmenes de agua destilada.

SOLUCIÓN TESTIGO DE POTASIO 0,2 mg/mL

Disolver 446 mg de K₂S₀4 en 1000 mL de agua destilada.



REACTIVOS USADOS PARA MEDIR SODIO EN SANGRE

REACTIVO DE ACETATO DE URACILO Y ZINC

Solución A

- Acetato de uracilo	5	g
- Ácido acético glacial	1	mL
- Agua destilada	25	mL

Solución B

- Acetato de zinc	15	g
- Ácido acético glacial	0,5	mL
- Agua destilada	25	mL

1. Para la solución A, disolver el acetato de uracilo en el agua destilada hirviendo que a la que se agregó el ácido acético glacial.
 2. Para la solución B, disolver en otro matraz el acetato de zinc en agua destilada hirviendo, a la que se agregó el ácido acético glacial.
 3. Mezclar ambas soluciones mientras hiervan y calentar nuevamente hasta el punto de ebullición. Dejar en reposo durante una noche y luego filtrarla.
 4. Mezclar la solución filtrada con igual volumen de alcohol de 95°, dejarlo durante 2 días en el refrigerador, al cabo de los cuales se filtra.
- ◆ El reactivo así preparado es estable a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN TESTIGO DE SODIO CON 0,64 mg de Na/mL

Disolver 162 mg de NaCl en un matraz de 100 mL y completar a volumen con agua destilada.

REACTIVOS USADOS PARA MEDIR TRANSAMINASAS EN SANGRE

BUFFER DE FOSFATOS 0,1 M pH 7,4

- Fosfato disódico	210	mL
- Fosfato monopotásico	40	mL
- pH final	7,4	

Mezclar ambas soluciones. Ajustar el pH con NaOH o HCL y añadir algunas gotas de cloroformo como conservador.

SOLUCIÓN PIRUVATO DE SODIO 2 m/L PARA CALIBRACIÓN

Disolver 22 mg de piruvato en c.s.p. 100 mL de *buffer* de fosfatos.

- ◆ Preparar el mismo día de su utilización.

SOLUCIÓN NaOH 0,4N

Disolver 16 g de NaOH en lentejas en 1 L de agua destilada.

SUSTRATO PARA TGO (TRANSAMINASA GLUTÁMICO OXALACÉTICA)

- Acido d-l-aspartico	2,66	g
- Acido alfa-cetoglutarico	30	mg
- NaOH 1N	20,5	mL
- Solución <i>buffer</i> de fosfatos de pH 7,4 c.s.p	100	mL

1. Disolver ambos ácidos en un erlenmeyer con NaOH 1N hasta su disolución completa.
2. Transferir la solución a un matraz de 100 mL lavando el erlenmeyer y completando a volumen con solución *buffer* de fosfatos de pH 7,4.
3. Añadir una gota de cloroformo como conservador y guardar a 4 °C.



SUSTRATO PARA TGP (TRANSAMINASA GLUTÁMICO PIRÚVICA)

- d-1-alanina	78	g
- Ácido alfa-cetoglutarico	30	mg
- NaOH 1N	0,5	mL
- Solución buffer de fosfatos de pH 7,4 c.s.p	100	mL

1. Disolver los primeros ingredientes en un erlenmeyer con NaOH 1N hasta su disolución completa.
2. Transferir la solución a un matraz de 100 mL lavando el erlenmeyer y completando a volumen con solución *buffer* de fosfatos de pH 7,4.
3. Añadir una gota de cloroformo como conservador y guardar a 4 °C.

REACTIVO CROMÓGENO

1. Disolver 20 mg de 2-4 dinitrofenilhidrazina en HCl 1N y completar a 100 mL.
2. Conservar en un frasco oscuro a 4 °C.

REACTIVOS USADOS PARA MEDIR ÚREA EN SANGRE**REACTIVO DE FENOL (Reactivo 2)**

- Fenol cristalizado	50	g
- Nitroprusiato de sodio	0,25	g
- Agua destilada c.s.p.	1000	mL

- ◆ Una vez preparado se guarda en un frasco oscuro en el refrigerador.

REACTIVO DE HIPOCLORITO ALCALINO (Reactivo 3)

- NaOH	25	g
- Hipoclorito de sodio	26,5	mL
- Agua destilada c.s.p.	1 000	mL

- ◆ Guardar en un frasco oscuro en el refrigerador.

SOLUCIÓN TESTIGO DE ÚREA

- Úrea	1	g
- H ₂ S ₀₄ concentrado	0,14	mL
- Agua destilada	500	mL

1. Disolver la úrea en 250 mL de agua destilada, agregar el H₂S₀₄ concentrado.
2. Completar a 500 mL con agua destilada.
3. Guardar en el refrigerador. Es estable durante un año.

SOLUCIÓN TESTIGO DE ÚREA DE 60 mg/100 mL

1. Diluir la solución stock con agua destilada acidificada, a fin de obtener una solución de 60 mg/100 mL de úrea.
2. Guardar en el refrigerador. Es estable varios meses.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PARA VDRL

- Formaldehído neutro de calidad analítica	0,5	mL
- Fosfato disódico (Na ₂ HP ₀₄) anhidro	0,093	g
- Fosfato monopotásico (KH ₂ P ₀₄)	0,170	g
- Cloruro de sodio	10	g
- Agua destilada	1000	mL
- pH final	6,0+/-0,1	

1. Disolver las sales en agua destilada, primero el disódico, a continuación el fosfato monopotásico y por último el cloruro de sodio.
2. Agregar la solución de formaldehído.
3. Conservar en un frasco con tapa de rosca o tapón de vidrio.



SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TAMPONADA

- Hidrofosfato disódico (Na ₂ HP042H ₂ O)	3,76	g
- Fosfato de potasio dihidrogenado (KH ₂ P04)	2,10	g
- Agua destilada	1000	mL
- pH final	7,2	

- ◆ Para coloraciones de Giemsa, Leishman.

SOLUCIÓN DE CITRATO TRISÓDICO (38 g/l) (3,8%)

- Citrato trisódico anhidro (behidrato o pentahidrato)	3,8	g
- Agua destilada c.s.p.	100	mL

1. Usar 1 mL de la solución para 4 mL de sangre.
2. Conservar la solución en una refrigeradora.

SOLUCIÓN DE CITRATO y FORMALDEHÍDO

- Citrato de sodio	3,0	g
- Solución comercial de formaldehído, por lo menos al 37% (formalina)	1,0	mL
- Agua destilada	00,0	mL

- ◆ El formaldehído es corrosivo y tóxico.

SOLUCIÓN DE CLORURO DE SODIO (0,85%) (SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA)

- Cloruro de sodio	8,5	g
- Agua destilada c.s.p.	1000	mL

SOLUCIÓN DE SULFATO DE ZINC (FAUST)

- ◆ Densidad 1 180.
 1. Disolver 300 g de sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en c.s.p. para 900 mL de agua destilada.
 2. Comprobar la densidad en un densímetro.

SOLUCIÓN SALINA AL 0,9%

Añadir 900 mg de cloruro de sodio a 100 mL de agua destilada.

SOLUCIÓN SALINA AL 10%

Añadir 10 g de cloruro de sodio a 100 mL de agua destilada.

SOLUCIÓN SALINA MÁS ANTIBIÓTICOS (ANTIBIÓTICO CONCENTRADO)

- | | | |
|-----------------------------|-----|----|
| - Sulfato de estreptomicina | 0,5 | g |
| - Penicilina sódica | 0,5 | g |
| - Agua destilada. | 10 | mL |

1. Mezclar y agitar hasta lograr una total dilución.
2. Filtrar con membrana 0,22 μm .
3. Usar 1 mL de solución para 100 mL de solución salina.



SOLUCIÓN YODURADA DE LUGOL AL 1 %

- Yodo	1	g
- Yoduro de potasio	2	g
- Agua destilada c.s.p	100	mL

1. Disolver el yoduro de potasio en unos 30 mL de agua destilada.
2. Agregar el yodo y mezclar hasta disolverlo. Añadir el resto de agua destilada (70 mL) y mezclar bien.
3. Conservar la preparación en un frasco oscuro.

WRIGHT, COLORANTE

- Colorante de Wright	0,3	g
- Glicerol	3,0	mL
- Metanol	97,0	mL

- ◆ Tener igual cuidado que con el colorante Leishman.

FICHA ÚNICA DE AVISO DE ACCIDENTE DE TRABAJO

Fuente: D.S.007-2007-TR

							CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN DEL ACCIDENTE				
1. DATOS DEL TRABAJADOR											
APELLIDOS Y NOMBRES:											
DOMICILIO:					N.º DE SEGURO (si lo tiene)						
DOCUMENTO DE IDENTIDAD (DNI):		CATEGORIA DEL TRABAJADOR (TABLA 1#)		ANTIGÜEDAD EN EL PUESTO TRABAJO							
		DÍAS	MESES	AÑOS	EDAD	SEXO					
						M			F		
2. DATOS DEL EMPLEADOR											
RAZÓN SOCIAL:											
DOMICILIO PRINCIPAL:											
RUC:											
3. DATOS DE LA EMPRESA USUARIA (DONDE OCURRIÓ EL ACCIDENTE)											
RAZÓN SOCIAL											
DOMICILIO PRINCIPAL											
RUC		CUI (TABLA2+)			TELEF(S)						
4. DATOS DEL ACCIDENTE DE TRABAJO											
FECHA (DD/MM/AA)				HORA		TURNO	DE	A			
LUGAR DEL ACCIDENTE											
LABOR QUE REALIZABA AL MOMENTO DEL ACCIDENTE											
DESCRIPCIÓN DEL ACCIDENTE:											
TESTIGO DEL ACCIDENTE							DNI				
FORMA DEL ACCIDENTE (TABLA 3=)					AGENTE CAUSANTE (TABLA 4)						
Apellidos y nombres de la persona que condujo al accidentado			Firma		Fecha de Recepción		Firma y sello de recepción				
5. CERTIFICACIÓN MÉDICA											
FECHA DE INGRESO (DD/MM/AA):					HORA DE INGRESO:						
PARTE DEL CUERPO AFECTADO: (TABLA 5•)					TIPO DE LESIÓN: (TABLA 6°)						
a)			a)								
b)			b)								
c)			c)								
APELLIDOS Y NOMBRES DEL MÉDICO TRATANTE				N.º DE CMP:			CÓDIGO CIE-10				
							Firma del médico tratante				



TABLA 1(#)		Otros factores externos e internos al ambiente de trabajo	TABLA 6(°) NATURALEZA DE LA LESIÓN
933	Servicios médicos y odontológicos, otros servicios de sanidad veterinaria	70 Animales	01 Escoriaciones
000	Otras actividades no especificadas Por ejemplo Agrícolas	77 Factores climáticos	02 Heridas punzantes
		79 Arma blanca	04 Heridas contusas (por golpes o de bordes Irregulares
		80 Arma de fuego	05 Herida de bala
		81 Sustancias químicas – plaguicidas	06 Perdida de tejidos
		00 Otros	07 Contusiones
			08 Traumatismos internos
			09 Torceduras y esguinces
			10 Luxaciones
			11 Fracturas
			12 Amputaciones
			13 Gangrenas
			14 Quemaduras
			15 Cuerpo extraño en ojos
			16 Enucreacion (perdida ocular)
			17 Intoxicaciones por otras sustancias químicas
			18 Intoxicaciones por plaguicidas
			19 Asfixia
			20 Efectos de electricidad
			21 Efectos de las radiaciones
			22 Disfunciones orgánicas
			00 Otros
TABLA 3(=) FORMA DE ACCIDENTE		TABLA 5(°) PARTE DEL CUERPO LESIONADO	
01	Caída de personas a nivel	001	Región craneana (cráneo, cuero cabelludo)
02	Caída de personas de altura	002	Ojos (con inclusión de los párpados, la órbita y el nervio óptico)
03	Caída de persona al agua	008	Boca (con inclusión de labios, dientes y lengua)
04	Caída de objetos		
05	Derrumbes o desplomes de instalaciones		
06	Pisadas sobre objetos		
07	Choque 007 Choque contra objeto		
08	Golpes 008 Golpes por objetos (excepto caídas)		
09	Aprisionamiento o atrapamiento		
10	Esfuerzos físicos o falsos movimientos		
11	Exposición al frío		
12	Exposición al calor		
13	Exposición a radiaciones ionizantes		
14	Exposición a radiaciones no ionizantes		
15	Exposición a productos químicos		
16	Contacto con electricidad		
17	Contacto con productos químicos		
18	Contacto con plaguicidas		
19	Contacto con fuego		



RECOMENDACIONES SOBRE LA CONDUCTA ANTE LA EXPOSICIÓN LABORAL A LA SANGRE U OTRAS SUSTANCIAS O MATERIALES POTENCIALMENTE CONTAMINADOS

Fuente: Revista Panamericana de Salud Publica / Pan Am J Public Health 2002. 11(2): 132-141

1. Cuidado inmediato de la zona expuesta

- Lavar las heridas con agua y jabón.
- Lavar las membranas mucosas con agua.

2. Determinar el riesgo asociado a la exposición, en función del:

- Tipo de líquido corporal implicado (sangre, líquidos corporales visiblemente sanguinolentos, otros líquidos corporales o tejidos potencialmente infecciosos, concentrados de virus).
- Tipo de exposición (lesión percutánea, exposición de membrana mucosa o piel no intacta, mordeduras causantes de exposición a sangre).

3. Investigar la fuente de la exposición

- Evaluar el riesgo de infección con base en la información disponible.
- Investigar la presencia de HBsAg y anticuerpos anti-VHC y anti-VIH.
- Evaluar el riesgo de exposición a las infecciones por VHB, VHC y VIH en fuentes desconocidas.
- No analizar la presencia de virus en agujas y jeringuillas desechadas.

4. Investigar al individuo expuesto

- Evaluar su inmunidad frente a la hepatitis B (antecedentes de vacunación y respuesta a la misma).

5. Administrar profilaxis tras las exposiciones que suponen riesgo de transmisión de VHB, VHC y VIH

- Iniciar la profilaxis cuanto antes (a ser posible, en un plazo de horas).
- Realizar prueba de embarazo en toda mujer en edad fértil que no se sepa embarazada.
- Buscar asesoramiento de un experto si se sospecha resistencia a los antivíricos.
- Administrar la profilaxis durante 4 semanas, siempre que sea tolerada.

6. Realizar pruebas de seguimiento y proporcionar asesoramiento

- Aconsejar la búsqueda de atención médica ante cualquier enfermedad aguda durante el seguimiento.

Exposiciones al VHB

- ✓ Determinar los anticuerpos anti-HBs* 1 a 2 meses después de la última dosis de la vacuna.
- ✓ La respuesta de anticuerpos no es valorable si se administraron HBIG** en los 3 a 4 meses anteriores.
- ✓ En el caso de que la fuente de exposición sea positiva y el trabajador expuesto sea VHB negativo, se debería aplicar gamaglobulina hiperinmune a las 24 – 48 horas post exposición. Aplicar primera dosis de la vacuna contra V HB; la segunda y tercera dosis serán aplicadas a los 30 y 90 días después de la primera dosis.
- ✓ Si la fuente de exposición es negativa y el trabajador expuesto no esta vacunado, entonces se debe de aplicar esquema completo de vacunación.
- ✓ Si no se logra identificar la fuente de exposición y el trabajador expuesto tiene antecedentes de hepatitis o antecedentes de vacunación, entonces se debe de aplicar esquema completo de vacunación.
- ✓ Si el trabajador expuesto tiene anticore o antígeno de superficie positivo, no aplicar vacuna.



Exposiciones al VHC

- ✓ Determinar los anticuerpos anti-VHC y la ALT*** tras la exposición y 4 a 6 meses más tarde.
- ✓ Determinar el RNA del VHC a las 4 a 6 semanas si se desea un diagnóstico más temprano de la infección.
- ✓ Confirmar con otras pruebas los inmunoensayos enzimáticos repetidamente positivos para anticuerpos anti-VHC.

Exposiciones al VIH

- ✓ Determinar anticuerpos anti-VIH al menos durante 6 meses tras la exposición (p.e.: 6 semanas y 3 y 6 meses).
- ✓ Determinar anticuerpos anti-VIH ante la aparición de enfermedad compatible con síndrome retrovítico agudo.
- ✓ Aconsejar precauciones para evitar la transmisión secundaria durante el período de seguimiento.

Examinar a los receptores de profilaxis pasadas 72 h y vigilar la toxicidad de los fármacos al menos 2 semanas

*Anti-HBs: anticuerpos frente al antígeno de superficie de la hepatitis B. **HBIg: inmunoglobulinas anti-hepatitis B. ***ALT: alanina aminotransferasa.

ALMACENAMIENTO DE SUSTANCIAS QUÍMICAS

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ El área de almacén debe ceñirse a los criterios técnicos establecidos para este tipo de productos.
- ◆ Los productos se almacenan, de ser posible, en envases y embalajes originales, en estanterías metálicas.
- ◆ Cada nivel del estante debe contar con barandas que impidan la caída de los envases con reactivos químicos.

- ◆ Se debe tener como norma general, no guardar grandes cantidades de sustancias químicas de alto riesgo en los lugares de trabajo.
- ◆ Todo producto químico almacenado o en uso debe contar con tapas de cierre hermético y con rótulos que permitan identificar fácilmente su riesgo.
- ◆ **El almacenaje de diferentes productos químicos, debe realizarse según sus características de peligrosidad. Nunca organizar los productos químicos por orden alfabético o por número de artículo ascendente.**
- ◆ La colocación en las estanterías, se efectúa de modo que cada peligrosidad de las consideradas “compatibles”, ocupe una estantería en toda su carga vertical. Se pretende con ello que la posible caída y rotura de un envase, solo afecte a otros productos de igual peligrosidad (véase Incompatibilidades de almacenamiento de sustancias peligrosas).
- ◆ No se deben almacenar por tiempo indefinido los productos químicos ya que pueden sufrir cambios por influencias externas como luz, aire y calor, generando peligros que no se esperaban de estos materiales en su estado original.
- ◆ En caso de sustancias inflamables estas deben ser refrigeradas en armarios frigoríficos especiales, no siendo recomendables los de uso doméstico, ejemplos: formación de peróxido en éteres y cetonas, inflamación espontánea de metales en polvo (cadmio, hierro, níquel, etc.), rotura de envases por incremento de la presión interna al formarse CO y CO₂ (ácido fórmico, urea, agua oxigenada, ácido oxálico, etc.), formación de gases reactivos y explosión por polimerización espontánea o por golpe.
- ◆ La manipulación de sustancias que desprenden vapores, gases irritantes o mal olor, o la incineración y calcinación de combustibles y/o inflamables, deben realizarse solo bajo una campana de seguridad química.
- ◆ Se debe mantener neutralizantes disponibles para cualquier emergencia como: bicarbonato de sodio para los ácidos, ácido acético diluido para los álcalis.
- ◆ Toda sustancia química debe ser catalogada y cada laboratorio debe mantener un inventario visible actualizado de todas las sustancias químicas que almacena y /o utiliza.
- ◆ Los productos cancerígenos, productos inflamables, así como reactivos controlados, requieren un almacenamiento especial en armarios específicos, convenientemente rotulados y bajo llave.
- ◆ Las duchas de urgencia y las duchas de ojos han de ser examinadas mensualmente con relación a su funcionamiento por el personal de laboratorio.



INCOMPATIBILIDADES DE ALMACENAMIENTO DE SUSTANCIAS PELIGROSAS

						
	+	-	-	-	-	+
	-	+	-	-	-	-
	-	-	+	-	-	+
	-	-	-	+	-	-
	-	-	-	-	+	O
	+	-	+	-	O	+

+: se pueden almacenar conjuntamente; O: solamente pueden almacenarse juntas, si se adoptan ciertas medidas específicas de prevención; - : no deben almacenarse juntas.

AGENTES INCOMPATIBLES

- Oxidantes con: inflamables, carburos, nitruros, hidruros, sulfuros, alquilmetales.
- Reductores con: nitratos, cloratos, bromatos, óxidos, peróxidos, flúor, ácidos fuertes con bases fuertes, ácido sulfúrico con: celulosa, ácido perclórico, permanganato potásico, cloratos.

AGENTES INESTABLES

- Productos cuyo almacenamiento prolongado entraña la posibilidad de descomposición: amiduros alcalinos, ciertas sales de diazonio.
- Sustancias fácilmente peroxidables: compuestos alílicos, compuestos vinílicos, estireno.
- Compuestos que reaccionan violentamente en contacto con el aire: fosfuros, hidruros, monómeros que polimerizan rápidamente: acetato de vinilo, estireno, acrilonitrilo.

AGENTES QUE REACCIONAN PELIGROSAMENTE

- Con el agua: metales alcalinos, peróxidos inorgánicos, carburos, fosfuros.
- Con ácido clorhídrico: sulfuros, hipocloritos, cianuros.
- Con ácido nítrico: algunos metales.
- Con ácido sulfúrico: ácido fórmico, ácido oxálico, alcohol etílico



ESQUEMA DE INOCULACIÓN Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS QUE PRODUCEN DIARREA

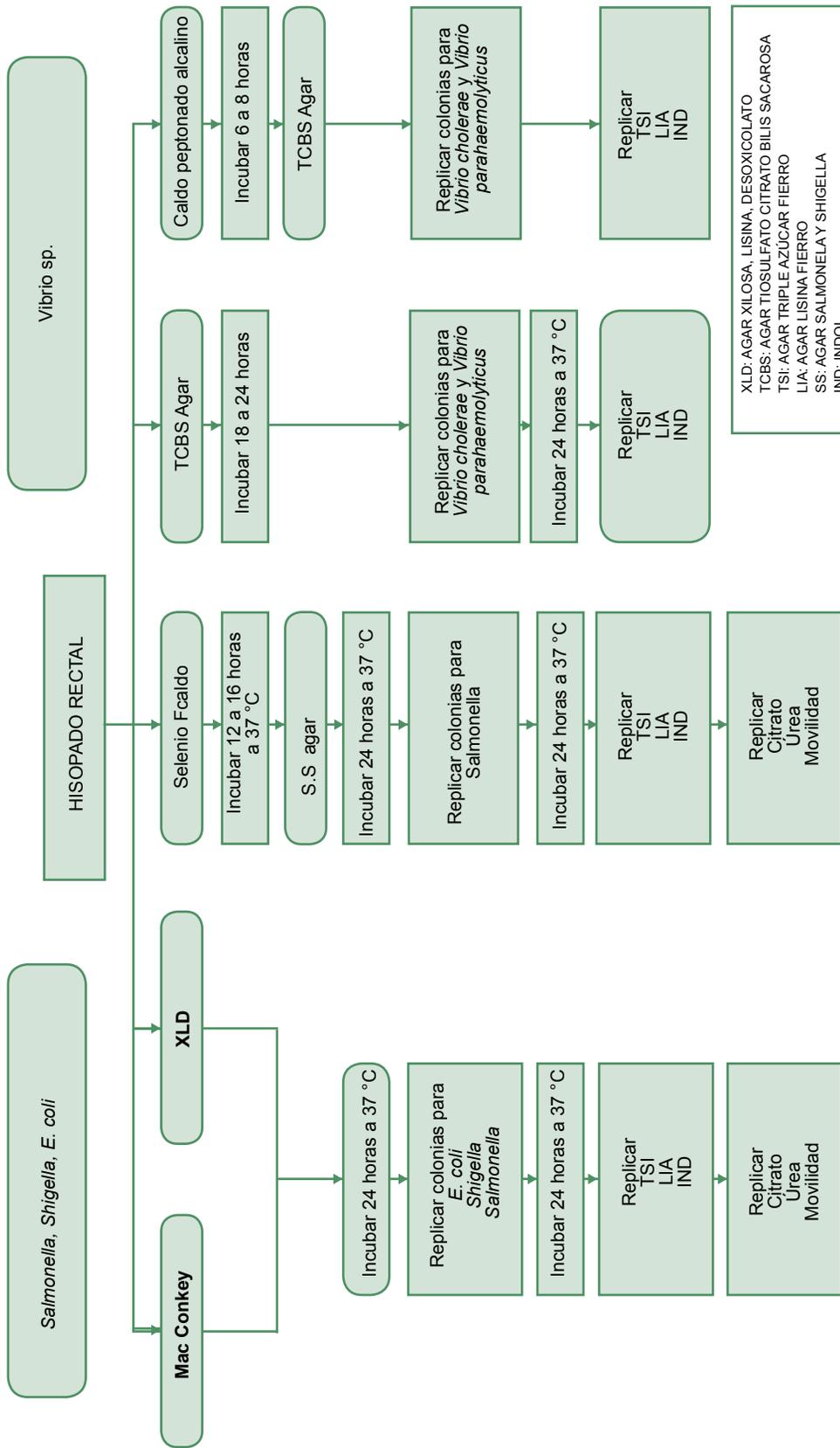
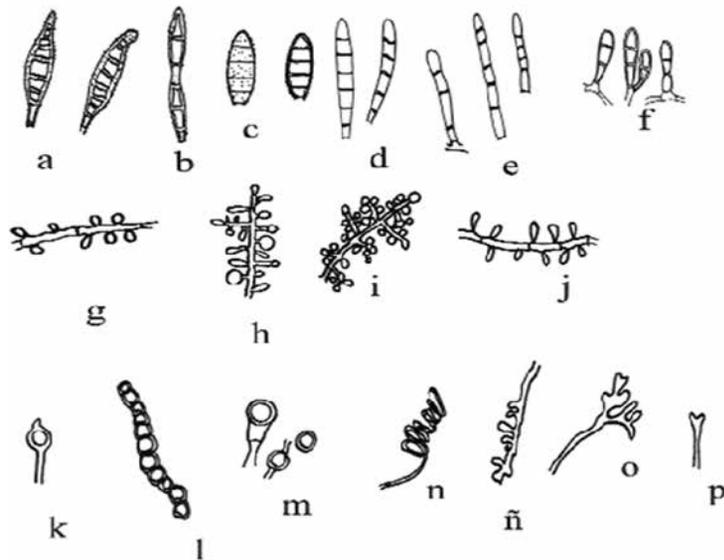


Figura 1.3: ESQUEMA DE CONIDIOS

Diferentes tipos de macroconidios (a-f), microconidios (g-j), clamidosporas (k-m) e hifas (n-p) (consultar clave taxonómica).



IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO *Shigella*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	RESULTADO
Indol	Variable
Hidrógeno sulfurado	Negativo
Úrea	Negativo
Citrato	Negativo
Movilidad	Negativo
Rojo de metilo	Negativo
Voges Proskauer	Negativo
Fermentación de glucosa(ácido)	Positivo
Fermentación de glucosa(lactosa)	Negativo
Lactosa	Variable

IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	RESULTADO
Indol	Positivo
Hidrógeno sulfurado	Negativo
Úrea	Negativo
Citrato	Negativo
Movilidad	Variable
Rojo de metilo	Positivo
Voges Proskauer	Negativo
Gelatina	Negativo
Fermentación de glucosa(ácido)	Positivo
Fermentación de glucosa(lactosa)	Positivo
Lactosa	Variable

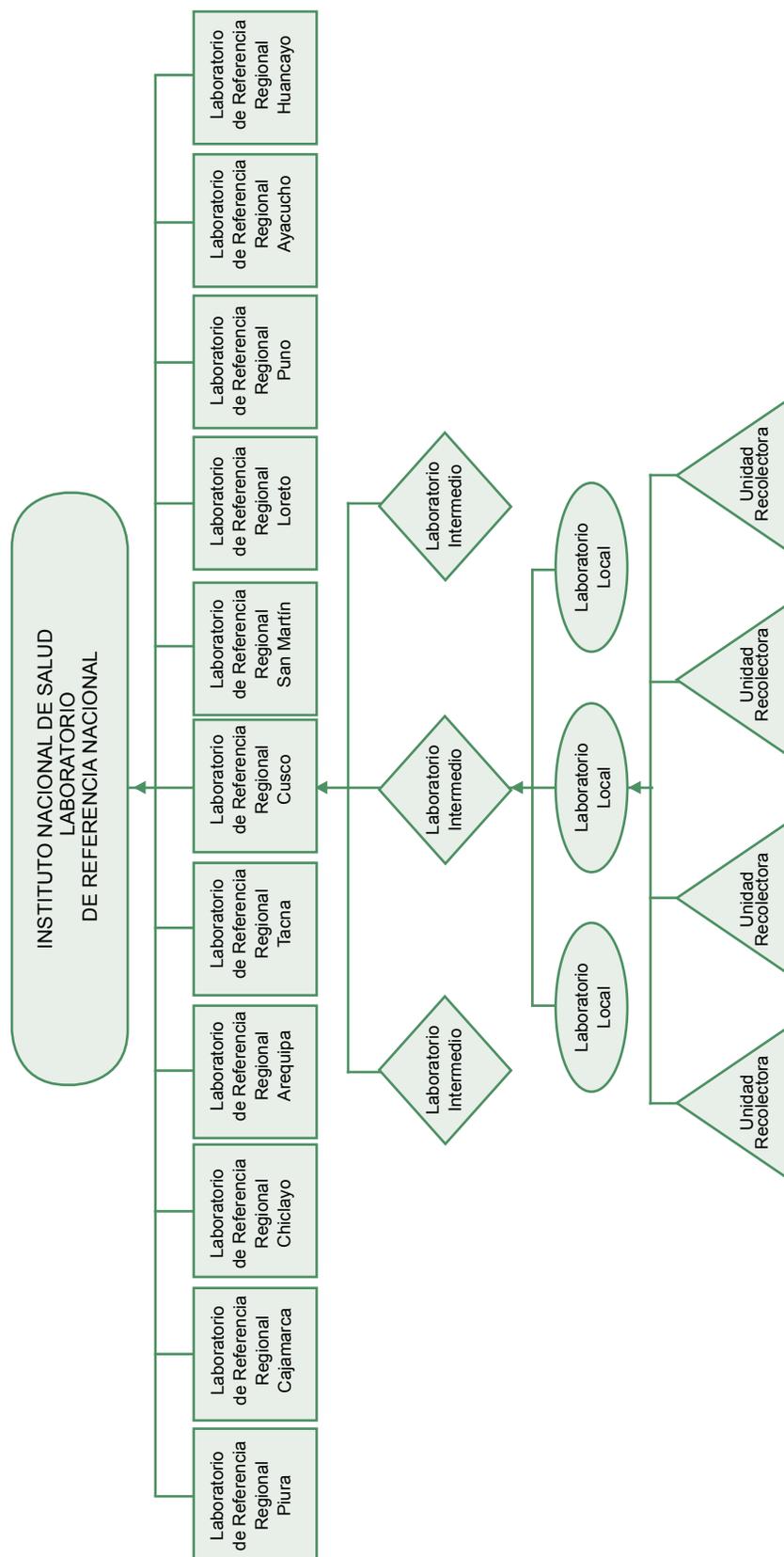
USO DE DISCOS PARA ANTIBIOGRAMAS

ANTIBIÓTICOS PARA BACTERIAS GRAMNEGATIVAS				
	Símbolo del disco	Resistente (mm)	Intermedio (mm)	Suceptible (mm)
Amikacina	AN	14	15 - 16	17
Carbencilina (solo para pseudomonas)	CB	13	14 - 16	17
Cloramfenicol	C	12	13 - 17	18
Clindamicina(también anaerobios)	CM	14	15 - 16	17
Gentamicina	GM	12	13 - 14	15
Kanamicina	K	13	14 - 17	18
Nitrofurantoina	FD	14	15 - 16	17
Ciprofloxacina	CIP	15	16 - 20	21
Norfloxacina	NOR	12	13 - 16	17

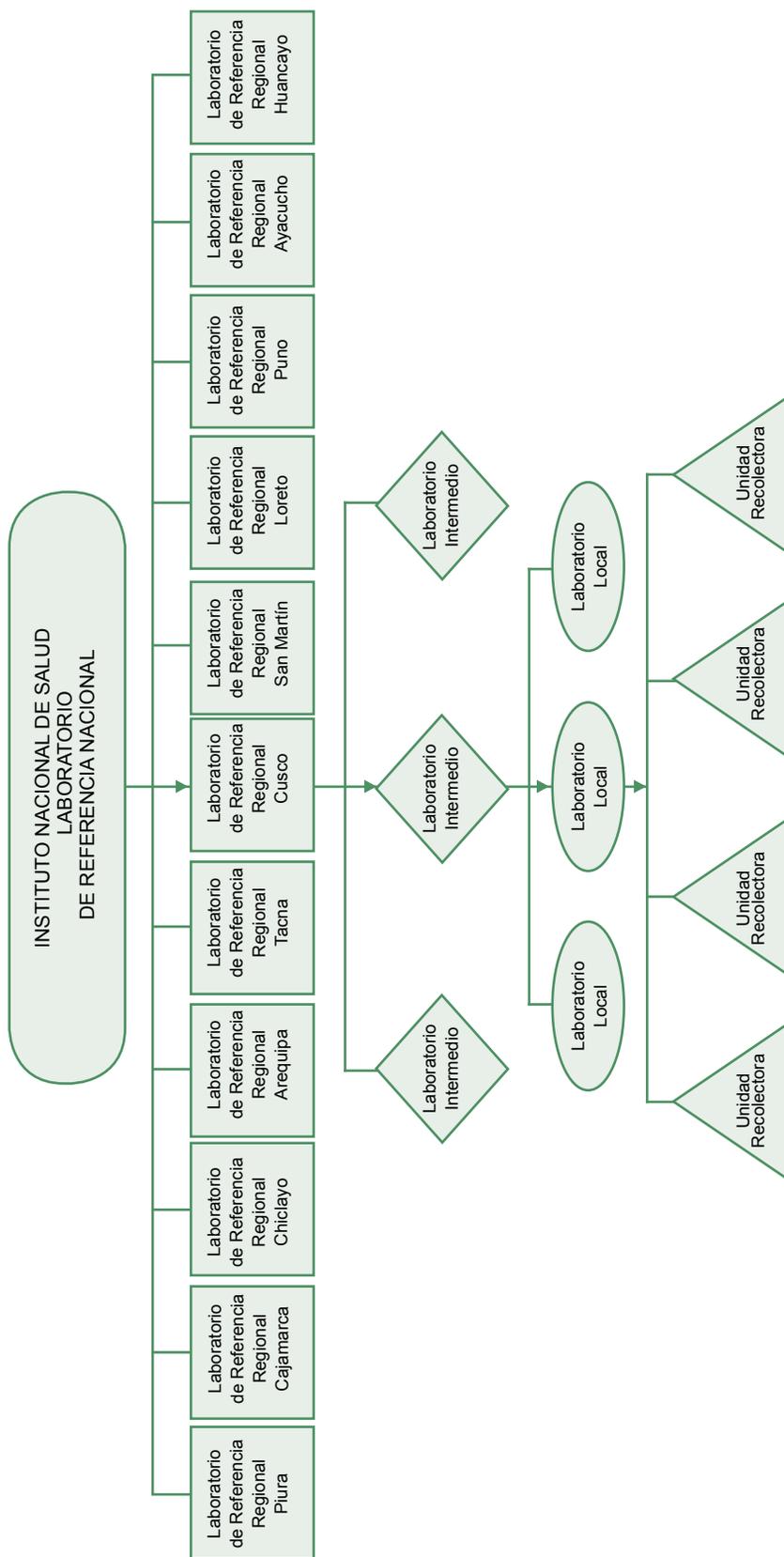
ANTIBIÓTICOS PARA BACTERIAS GRAMPOSITIVAS				
	Símbolo del disco	Resistente (mm)	Intermedio (mm)	Suceptible (mm)
Cefalotina	CL	14	15 - 17	18
Dicloxacilina	DCX	9	10 - 14	15
Eritromicina	E	13	14 - 17	18
Tetraciclina	TE	14	15 - 18	19
Rifampicina(*)	RA	16	17 - 19	20
Penicilina	P	20	21 - 28	29
Oxacilina	SO	10	11 - 12	13
Amoxicilina(*)	AMX		menor a 18	mayor o igual a 18
Ampicilina (*)	AM	11	12 - 13	14
Trimetropin / Sulfametoxazole (*)	SXT	10	11 - 15	16



RED DE LABORATORIOS FLUXOGRAMA DE MUESTRAS



RED DE LABORATORIOS FLUXOGRAMA DE RESULTADOS



PROCEDIMIENTOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DE BACILOSCOPIA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

REGISTRO DE LOS CONTROLES POR ENVIO DE PANELES DE FROTIS

Laboratorio central responsable del control:

Lote de frotis N°:

Fecha de envío de los paneles a los laboratorios locales, intermedios o regionales:

FROTIS N°	LOTE N°	RESULTADO ESPERADO	RESULTADOS DE LOS LABORATORIOS LOCALES, INTERMEDIOS O REGIONALES										OBSERVACIONES			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																



HOJA DE INFORME MENSUAL DE LABORATORIO

Establecimiento:	Mes/Periodo												Responsable de Laboratorio	Pág. 1						
	Código:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			12	13	14	15	16	N° Acumulado
Pruebas de Laboratorio	Costo Unitario																			
1 Hemograma Completo																				
2 Hemoglobina																				
3 Hematocrito																				
4 Tiempo de coagulación																				
5 Tiempo de sangría																				
6 Grupos sanguíneos y Rh																				
7 Compatibilidad sanguínea																				
8 Diagnóstico de embarazo																				
9 VDR / RPR																				
10 Aglutinaciones para Salmonella																				
11 Aglutinaciones para Brucella																				
12 Orina completa																				
13 Sedimento urinario																				
14 Examen directo de secreciones																				
15 Gram de secreciones																				
16 Bk en esputo																				
17 Bk en orina																				
18 Parasitológico (por concentración)																				
19 Examen directo de heces																				
20 Graham																				
21 Gota gruesa																				
22 Benedict en heces																				
23 Velocidad de Sedimentación Eritrocitaria																				
24 Test de HIV Elisa																				
25 Test de Hepatitis B																				
26 Identificación de Leishmania																				
27 Hemocultivo																				
28 Urocultivo																				
29 Cultivo de Secreciones																				
30 Cultivo de Bk																				
31 Proteínas séricas																				
32 Bilirrubinas																				
33 Fosfatasa Alcalina																				
34 Glicemia																				
35 Urea sérica																				
36 Creatinina sérica																				
37 Transaminasas séricas																				
38 Electrolitos séricos																				
39 Proteínas en orina																				
40 Papanicolaou																				
Total Exonerado																				
Total Ingreso																				



HOJA DE INFORME MENSUAL DE LABORATORIO

Establecimiento:	Código:		Mes/ Período												Responsable de Laboratorio					Pág. 2	
	Costo Unitario	N° Acum.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	N° Total Mes		Costo Mes
Pruebas de Laboratorio																					
1 Hemograma Completo																					
2 Hemoglobina																					
3 Hematocrito																					
4 Tiempo de coagulación																					
5 Tiempo de sangría																					
6 Grupos sanguíneos y Rh																					
7 Compatibilidad sanguínea																					
8 Diagnóstico de embarazo																					
9 VDR / RPR																					
10 Aglutinaciones para Salmonella																					
11 Aglutinaciones para Brucella																					
12 Orina completa																					
13 Sedimento urinario																					
14 Examen directo de secreciones																					
15 Gram de secreciones																					
16 Bk en esputo																					
17 Bk en orina																					
18 Parasitológico (por concentración)																					
19 Examen directo de heces																					
20 Graham																					
21 Gota Gruesa																					
22 Benedict en heces																					
23 Velocidad de Sedimentación Eritrocitaria																					
24 Test de HIV Elisa																					
25 Test de Hepatitis B																					
26 Identificación de Leishmania																					
27 Hemocultivo																					
28 Urocultivo																					
29 Cultivo de Secreciones																					
30 Cultivo de Bk																					
31 Proteínas séricas																					
32 Bilirrubinas																					
33 Fosfatasa Alcalina																					
34 Glicemia																					
35 Urea sérica																					
36 Creatinina sérica																					
37 Transaminasas séricas																					
38 Electrolitos séricos																					
39 Proteínas en orina																					
40 Papanicolaou																					
Total Exonerado																					
Total Ingreso																					Costo Total

BIBLIOGRAFÍA

1. ***NORMA TÉCNICA DE SALUD PARA EL CONTROL DE CALIDAD DEL DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE MALARIA***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N° 082 - Lima, 2012, Punto y Grafía S.A.C.
2. ***MANUAL PARA EL CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Lima, 2012, AGL gráfica color SRL.
3. ***PROCEDIMIENTOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DE BACILOSCOPIA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Lima, 2012, AGL gráfica color SRL.
4. ***MANUAL DE NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN LOS LABORATORIOS***
Universidad Peruana Cayetano Heredia. Facultad de Ciencias y Filosofía Alberto Cazorla Talleri. Lima, mayo 2011.
5. ***MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LAS ZOONOSIS PARASITARIAS***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N° 32 - Lima, 2010, Punto y Grafía S.A.C.
6. ***NORMA TÉCNICA DE SALUD DE LA UNIDAD PRODUCTORA DE SERVICIOS DE PATOLOGÍA CLÍNICA***
Ministerio de Salud – Dirección General de Salud de las Personas. Dirección de Servicios de Salud. Lima, diciembre 2009, Súper Gráfica E.I.R.L.

7. ***MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS***
Oficina Regional de la Organización Panamericana de la Salud. 2008.

8. ***MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PRINCIPALES HONGOS OPORTUNISTAS CAUSANTES DE MICOSIS HUMANAS***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 44 - Lima, 2007.

9. ***NORMA TÉCNICA DE SALUD PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS***
Ministerio de Salud - Dirección General de Salud de las Personas. Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis. Lima, abril 2006.

10. ***MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO EN TÉCNICAS BÁSICAS DE HEMATOLOGÍA***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 40. Lima, 2005.

11. ***MANUAL DE PROCEDIMIENTOS BACTERIOLÓGICOS EN INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 28. Lima, 2005.

12. ***BIOSEGURIDAD EN LABORATORIOS DE ENSAYOS, BIOMÉDICOS Y CLÍNICOS***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 18. Lima, 2005.

13. ***MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LOS PARÁSITOS INTESTINALES DEL HOMBRE***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de

Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 37. Lima, 2003.

14. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA

Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 39. Lima, 2003.

15. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN

Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 30. Lima, 2002.

16. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE GONORREA

Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 33. Lima, 2002.

17. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE IDENTIFICACIÓN DE VECTORES DE LEISHMANIOSIS Y ENFERMEDAD DE CARRIÓN

Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 36. Lima, 2002.

18. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE GONORREA

Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública. Serie de Normas Técnicas N.º 19 - Lima, 1997.

19. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE MICOSIS OPORTUNISTAS Y PROFUNDA

Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 23- Lima, 1997.

20. ***GUÍA: DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO PARA EDAs Y CÓLERA***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Laboratorio de Enteropatógenos - Lima, setiembre 1996.
21. ***MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE SÍFILIS***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 17. Lima, enero 1996, Art. Lautrec.
22. ***MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 14 - Lima, diciembre 1995, Art. Lautrec.
23. ***MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA LA OBTENCIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS (I)***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 15 - Lima, diciembre 1995, Art. Lautrec.
24. ***MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE PESTE***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 12 - Lima, diciembre 1995, Art. Lautrec.
25. ***ACTUALIZACIÓN DE LA DOCTRINA, NORMAS Y PROCEDIMIENTOS PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS EN EL PERÚ***
Ministerio de Salud - Programa Nacional de Control de Enfermedades Transmisibles - Control de Tuberculosis. Lima, diciembre 1995.
26. ***MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 13 - Lima, diciembre 1995, Art. Lautrec.

-
27. ***ANEMIA DURANTE EL EMBARAZO***
Ministerio de Salud - Agencia para el Desarrollo de los Estados Unidos - Instituto de Investigación Nutricional. Noviembre 1995.
28. ***GUÍA: PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y SEROLÓGICO DE BRUCELOSIS***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Laboratorio de Bacteriología Especial- Lima, agosto 1995.
29. ***MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS EN BACTERIOLOGÍA DE TUBERCULOSIS***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 10 - Lima, mayo 1995, Art. Lautrec.
30. ***MANUAL DE NORMAS DE BIOSEGURIDAD PARA LOS LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS Regionales, Intermedios y Locales*** - Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 8 - Lima, marzo 1995, Art. Lautrec.
31. ***MANUAL DE NORMAS DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS BACILOSCOPIAS***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Serie de Normas Técnicas N.º 7 - Lima, marzo 1995, Art. Lautrec.
32. ***MANUAL DE NORMAS DE BIOSEGURIDAD DEL CENTRO NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA***
Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Red Nacional de Laboratorios de Salud. Lima, enero 1995.
33. ***MANUAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO***
Organización Mundial de la Salud - Segunda edición, Ginebra, 1994.

34. GUÍA: PROCEDIMIENTOS EN EL DIAGNÓSTICO DE ENTEROPARÁSITOS

Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública - Laboratorio de Enteroparásitos - Lima, 1993.

35. MANUAL PARA LA TOMA, TRANSPORTE Y REMISIÓN DE MUESTRAS AL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA

Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Santafe de Bogotá, septiembre 1993.

36. MANUAL DE TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA TOMA, CONSERVACIÓN Y REMISIÓN DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Ministerio de Salud Pública - Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical Leopoldo Ezquieta Pérez. Serie de Manuales Técnicos N.º 6. Ecuador, 1992.

37. MANUAL DE LABORATORIO: BRUCELOSIS

Instituto Nacional de Salud - Bogotá, O.E.; abril 1990.

38. MICROBIOLOGÍA MÉDICA - MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Bogotá, O.E; Colombia 1990.

39. GUÍA: MÉTODOS EFICACES DE ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN INTENSIVA CONTRA EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

Informe de la Organización Mundial de Salud-1989.

40. MÉTODOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS Y SU INTERPRETACIÓN

Aldo A. Guerci - Cuarta edición - El Ateneo; Buenos Aires - Argentina, 1989.

41. BRUCELOSIS HUMANA - MONOGRAFÍA N

Instituto Nacional de Salud - Bogotá, O.E.; agosto 1987.

42. *MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA LA BACTERIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS - OMS - OPS*
Organización Mundial de la Salud - Organización Panamericana de la Salud –
Nota Técnica N.º 27, 1985.
43. *MANUAL DIFCO: MEDIOS DE CULTIVO DESHIDRATADOS Y REACTIVOS PARA MICROBIOLOGÍA*
Décima edición - Detroit Michigan 48232 USA, 1984.
44. *MANUAL DE TÉCNICAS BÁSICAS PARA UN LABORATORIO DE SALUD N°2*
Organización Mundial de la Salud - Organización Panamericana de la Salud
-Publicación Científica N.º 439; 1983.
45. *LAS TÉCNICAS DE LABORATORIO EN LA BRUCELOSIS*
Organización Mundial de la Salud, - Serie de Monografías N.º 55, Segunda
edición 1976.
46. *MÉTODOS DE LABORATORIO*
Lynch, Raphael, Mellor, Spare, Inwood - Segunda edición - Interamericana;
México, 1972.
47. *THE COLOR ATLAS OF INTESTINAL PARASITES*
Spencer, F. M; Monroe S; 1961. Charles C. Thomas. Publisher.
48. *MÉTODOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIBRIO CHOLERAE*
Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades - Centro Nacional de
Enfermedades Infecciosas - Organización Panamericana de la Salud.
49. *DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE LAS ENFERMEDADES TROPICALES*
Bayer - Alemania.

GLOSARIO

BEAKER

Son recipientes cilíndricos y cortos, con una depresión en el margen de la boca. Se usan para facilitar la mezcla de una solución dada. Son de variadas medidas.

C.S.P

"Cantidad suficiente para...".

EMBUDOS

Pueden ser de vidrio, porcelana o plástico. Se usan para transvasar líquidos en frascos de boca angosta. Existen de diferentes tamaños.

FIOLAS

Recipientes para cantidades de medidas exactas. Se emplean en la preparación de reactivos y soluciones de concentraciones conocidas.

FRASCOS GOTEROS

Son frascos de vidrio de color transparente claro, color ámbar o caramelo. Tienen en la boca dos canales, uno frente a otro, por uno de los cuales sale líquido almacenado gota a gota. La tapa también tiene un canal y termina en un pico por donde cae el líquido. Se usan para colocar diversos líquidos de uso frecuente y en pequeñas cantidades.

MANGOS DE KOLLE

Están hechos de metal con una cubierta de

ebonita aislante del calor. En el extremo proximal presenta una tuerca para insertar el alambre de platino o asa de siembra. Se utilizan para tomar muestras y hacer siembras de microorganismos.

MATRACES Y ERLLENMEYER

Son recipientes volumétricos de gran utilidad para la preparación de soluciones, colorantes, reactivos, medios de cultivo, etc. Los matraces se diferencian de los erlenmeyer, por tener base esférica con fondo plano. En ambos el cuello termina en un reborde. Son de diferentes medidas.

MECHEROS DE BUNSEN

Son de metal con una tuerca movediza en su extremo, para medir la intensidad de la llama.

PERLAS DE VIDRIO

De 4 - 6 mm de diámetro. Se emplean para desfibrinar sangre y pulverizar en la preparación de antígenos.

PIPETAS

Son usadas para medidas de líquidos en pequeños volúmenes.

PIPETAS PASTEUR

Se emplean para la toma de pequeños inóculos de siembra. Están confeccionados de varillas de vidrio, de diámetro de 0,5 - 0,8 mm. La calidad de

vidrio debe facilitar el reblandecimiento a la acción directa de la llama del mechero, para conseguir por estiramiento la capilaridad deseada, es decir, es una pipeta con porción capilar.

PLACAS PETRI

Están compuestas de dos piezas redondas de vidrio, de los cuales la más grande hace de tapa. Las más usadas son las de 150 x 100 mm de diámetro. Se emplean para aislamiento y cultivo de microorganismos.

PROBETAS

Son recipientes cilíndricos con base ancha, de paredes gruesas graduadas. Se usan para medir líquidos en la preparación de cualquier solución. Tienen capacidades de 100 a 1 000 mL

TRÍPODE

Son de metal, de preferencia de fierro. Son muy buenos soportes de recipientes sometidos al calentamiento. Hay de varias alturas y diámetros.

TUBOS DE CENTRÍFUGA

Son de vidrio de paredes gruesas, graduados de medidas variables, pueden ser cónicos o cilíndricos.

TUBOS DE PRUEBA

Deben ser de vidrio, con o sin reborde. Las medidas son variables y se dan en mm, considerándose el largo del tubo por el diámetro de la boca. Se utilizan para cultivos, soluciones, etc.

ÍNDICE

A

- Alcohol etílico, 33
- Agua oxigenada, 34
- Aglutinoscopio, 67
- Antibiograma
 - principios generales, 354
 - método, 354
 - lectura, 354
- Anticoagulantes
 - precauciones, uso, 466
- Agar sangre al 6%, 467
- Agua amortiguada, 467
- Alcohol polivinílico (APV), 467
- Autoclave
 - componentes, 55
 - procedimientos, 57

B

- Bioseguridad
 - concepto, 15
 - niveles, 17
 - reglas importantes, 18
 - material recomendado, 24
- Balanza
 - de platillos, 60
 - analítica, 60
- Baciloscopía

- preparación, 178
- coloración, 182
- lectura, 186
- informe, 186

Brucelosis

- prueba de aglutinación rápida en placa, 416
- prueba de Rosa de Bengala, 419
- prueba en tubo, 420
- control de calidad, 423

C

- Cloramina, 32
- Centrífugas
 - componentes, 62
 - manual, 63
 - eléctrica, 63
- Creatinina en plasma o en suero, 374, 477
- Control de calidad
 - baciloscopía, 440
 - malaria, 443
- Citrato de
 - sodio, 466
 - trisódico, 486
 - formaldehído, 486
- Cary y Blair, 468
- Caldo infusión cerebro corazón (BHI), 468

D

Desinfección

- métodos, 26

- desinfectantes químicos, 31

Desechos

- incineración, 38

- entierro, 39

Drabkin, para dilución, 469

E

Esterilización

- métodos, 27

Espectofotómetro, 66

Estufa, 29

Espujo

- recipientes, 40, 175

- obtención, 175,318

Embarazo

- método del tubo de ensayo, 235

- método del portaobjetos, 235

EDTA, 465

F

Formaldehído

- solución al 10%, 470

Fenol acuoso al 5%, 469

Formol, 33,470

Frotis

- microorganismo, 324

- Plasmodium, 284, 285

- preparación, 318

Fosfatasa alcalina, 478

G

Glutaral, 33

Gram

- preparación, 473

- tinción, 321,473

Giemsa

- colorante, 470

- diluido, colorante, 471

Gota gruesa

- obtención, 87, 286 (ver Sangre)

- coloración de 1 a 10 láminas, 279

- coloración de más de 10 láminas, 280

- coloración en bloque, 280

- examen microscópico, 287, 286

- densidad parasitaria,

- sistema de cruces, 289

- por microlitro de sangre, 290

Gonorrea

- examen directo, 356

- cultivo, 358

- identificación, 361

- prueba de carbohidratos, 475

- prueba de la oxidasa, 476

- prueba de superoxol, 476

Glucosa

método de la glucosa oxidasa, 477

H

Heces

recipientes, 40, 241
obtención, 239
examen directo, 265
examen de tinción con yodo, 266
examen con solución salina, 266
examen de huevos de oxiuros, 269
método de la cinta adhesiva, 269
método de concentración, 270
método de flotación de Faust, 270
método de sedimentación de Ritchie, 272
examen bacteriológico, 243
procedimiento de envío, 452
sangre oculta, 306

Hemocultivo

principios generales, 350
lectura, 352
microorganismos aislados, 353

Hemoglobímetro de Sahli, 68

Heparina, 465

Hipoclorito sódico, 32

I

Incubadora, 65

Informe diario y mensual, 461

L

Leishmaniasis

obtención de muestra, 293
biopsia, 296
aspirado, punción-aspiración, 302
linfa, 293
examen directo, 299, 298
cultivo, 301, 299
lectura e interpretación, 303
intradermoreacción, Leishmanina, 303

Leishman

colorante, 471

Lugol

solución yodo-yodurada, 471

M

Material de vidrio

nuevo, 70
sucio, 69

Microorganismos

por grupos de riesgo, 16

Microscopio

componentes, 47
conservación, 51

Mycobacterium tuberculosis

cultivo, 188
Lowenstein-Jensen, 191
Ogawa acidificado, 194
prueba de sensibilidad, 201
envío del cultivo, 456

Medios de cultivo

principios generales, 329
medios nutritivos simples, 332
medios nutritivos enriquecidos, 334

medios selectivos, 335
 medios de transporte, 339
 siembra en medios de cultivo,
 por inoculación, 342
 por estría, 342
 por dispersión - agotamiento,
 343
 por puntura, 343
 lectura e informe de una muestra
 cultivada, 344
 medio NNN, 473
 medio USMARU (NNN
 modificado), 472
MIF (Merthiolate - Iodine - Formol), 472

O

Orina

recipientes, 207
 obtención, 205
 frotis, 209
 tinción, 211
 gravedad específica, 226
 medición de pH, 229
 uso de tabletas, 231

P

Parásitos

Amebas de vida libre. 260
Ancylostoma duodenale, 250, 252
Ascaris lumbricoides. 246, 253
Balantidium coli, 264, 261

Diphyllobothrium latum, 254
Entamoeba histolytica. 259, 263
Entamoeba coli, 263, 259
Enterobius vermicularis, 255
Fasciola hepática, 255
Giardia lamblia, 260, 264
Hymenolepis nana, 255
Leishmaniasis, 293
Necator americanus, 250, 252
Plasmodium vivax, 287, 285
Plasmodium falciparum, 287,
 285, 292
Plasmodium malarie, 287, 285
Trichuris trichiura, 250, 257
Trichomonas hominis, 261
Taenia solium, 248, 257
Taenia saginata, 247, 257
Strongyloides stercoralis, 256

Potasio, 383

Potenciómetro, 65

R

Red de laboratorios

objetivos, 435
 ubicación por nivel de complejidad,
 Unidades recolectoras, 436
 Laboratorios locales, 436
 Laboratorios intermedios, 437
 Laboratorio de referencia
 Regional, 437
 Laboratorio de Referencia

Nacional, 439
Registro de muestras, 460
Rotador, 68

S

Salmonella

aglutinación en placa, 427
aglutinación en tubo, 429
control de calidad, 432

Sangre

recipientes para toma de muestras,
77
obtención de sangre venosa, 80
obtención de gota gruesa, 87
obtención de sangre capilar, 90
extensiones, 91
tinción de extensiones, 96
células sanguíneas, 102
hemograma, 103
leucocitos o glóbulos blancos
recuento, 122
eritrocitos o glóbulos rojos
recuento, 126
hematocrito, 131
hemoglobina, 136
tiempo de coagulación,
método Lee y White, 145
tiempo de sangría,
método de Duke, 142
tipificación de grupos sanguíneos,
148

velocidad de sedimentación, 167

Sedimentos urinarios

elementos microscópicos, 213
preparación, 224

Solución

amortiguadora,
para VDRL, 485
tamponada, 486
cloruro de sodio 0,85%, 486
salina,
isotónica, 486
0,9%, 487
10%, 487
más antibióticos, 487
sulfato de zinc, 487
yodurada de lugol 1 %, 488

Suero

obtención y envío de suero, 449

Secreciones

obtención,
vaginal, 316
uretral, 314
faríngeas, 311
ótica, 313
procedimiento de envío, 457
Trichomonas, examen directo, 275

Sífilis

examen directo, 390
VDRL, 392
RPR (Reagina plásmatica rápida),
401

Sodio,

T

Transaminasas en sangre, 376

TGO, transaminasa glutámico oxalacética, 483

TGP, transaminasa glutámico pirúvica, 484

U

Úrea

método de Chaney y Marbach, 372

Urocultivo

método, 348

lectura e interpretación, 348

V

Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ELISA indirecto, 407

ELISA competitivo, 408

ELISA con antígeno de captura, 410

Virus de la hepatitis B

test de látex, 411

W

Wintrobe, anticoagulante, 466

Wright, colorante, 488

Y

Yersinia pestis

obtención de muestra, 363

procesamiento de muestra, 365

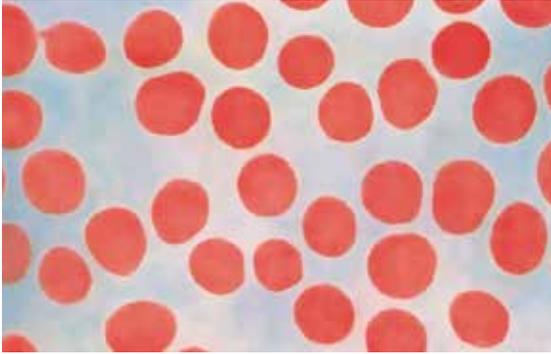
Yodopolividona, 33

Z

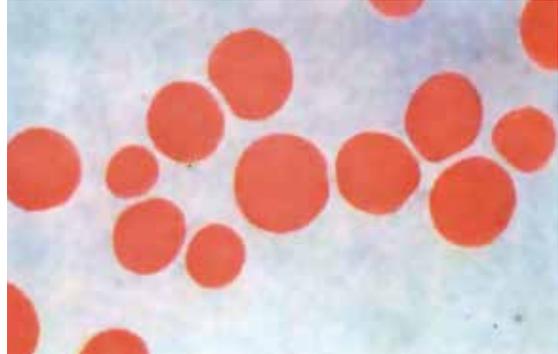
Ziehl y Neelsen

reactivos, preparación, 474

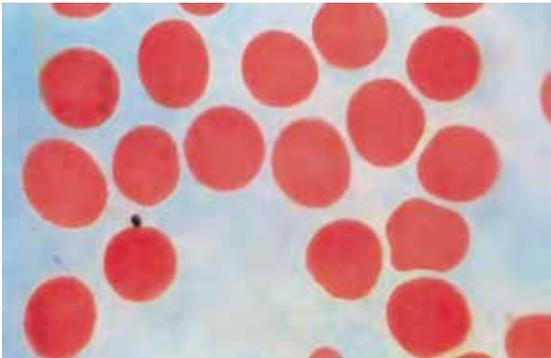
GLÓBULOS ROJOS O ERITROCITOS



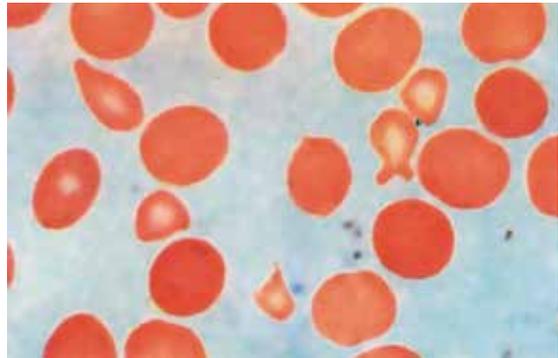
A



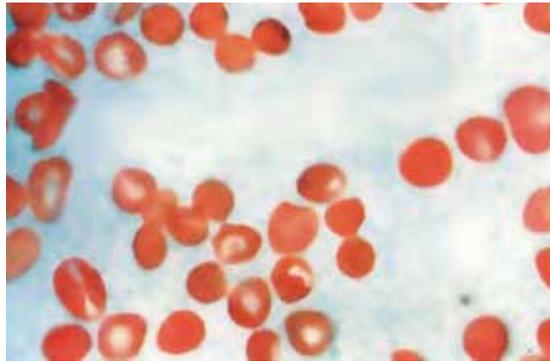
B



C



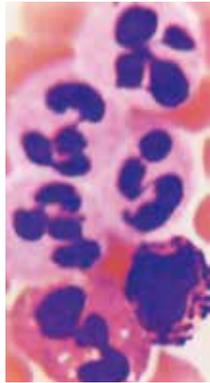
D



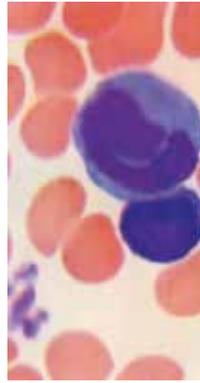
E

-
- A** Normocitos
 - B** Megalocitos
 - C** Anisocitos
 - D** Poiquilocitos
 - E** Microcitos

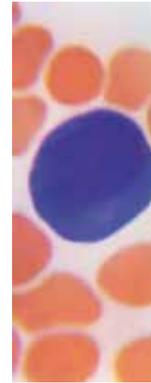
GLÓBULOS BLANCOS O LEUCOCITOS



A



B



C



D



E



F



G



H



I

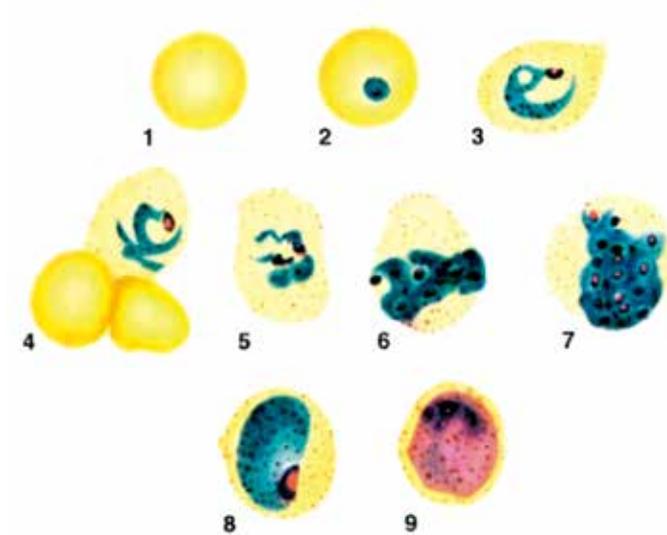


J

Basófilos: **A, D, E**
Eosinófilos: **A, F**
Neutrófilos: **A, D, E, F, G**
Plaquetas: **B**

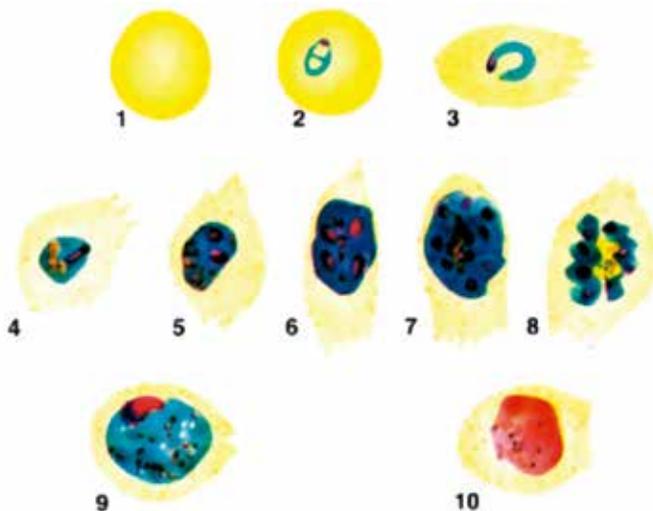
Monocitos: **B, G, H**
Linfocitos: **A, F**
Plasmocitos: **C, H, I**

Plasmodium vivax (Frotis)



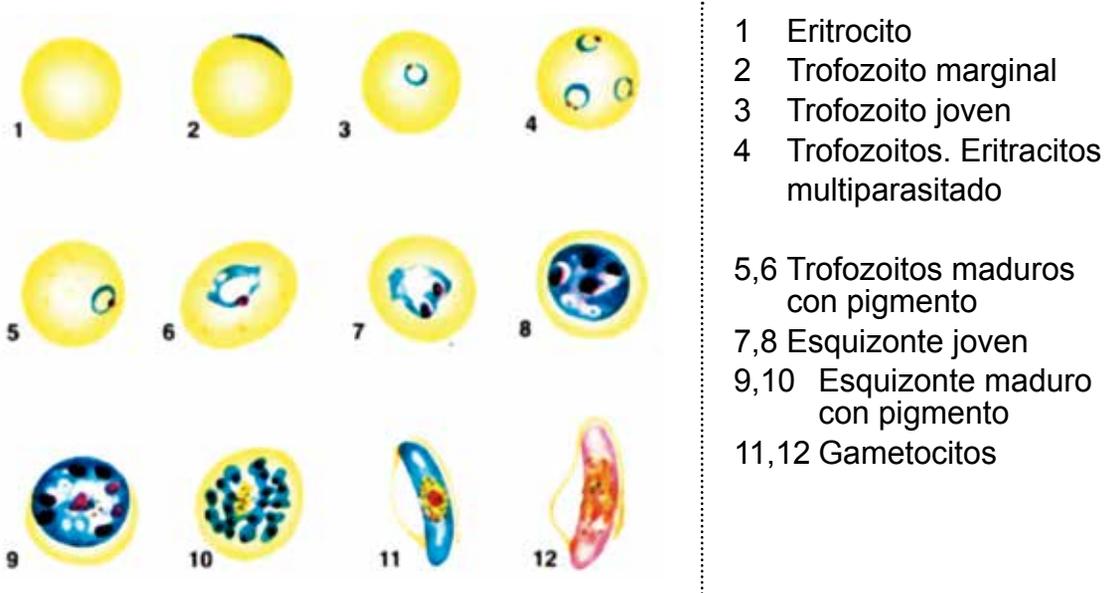
- 1 Eritrocito
- 2 Trofozoito joven
- 3 Trofozoito maduro en Eritrocito aumentado de tamaño. Gránulos de Schüffner marcados.
- 4 División de la Cromatina
- 5,6 Esquizonte joven
- 7 Esquizonte maduro
- 8 Gametocito(hembra).
- 9 Gametocito(macho). Cromatina difusa

Plasmodium ovale (Frotis)



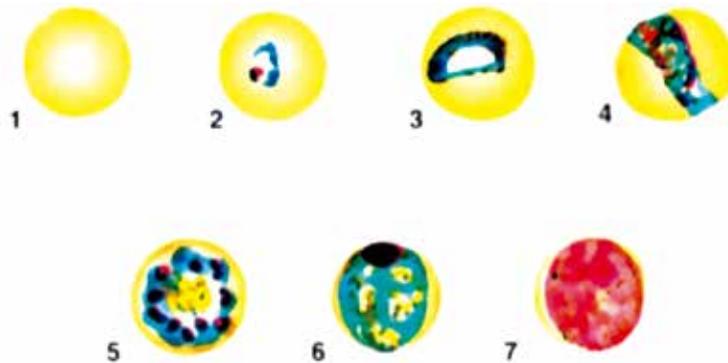
- 1 Eritrocito
- 2 Trofozoito joven
- 3 Trofozoito maduro en Eritrocito
- 4 División de la Cromatina
- 5,6 Esquizonte joven
- 7 Esquizonte maduro
- 8 Forma de margarita
- 9 Gametocito(hembra).
- 10 Gametocito(macho).

Plasmodium falciparum **(Frotis)**



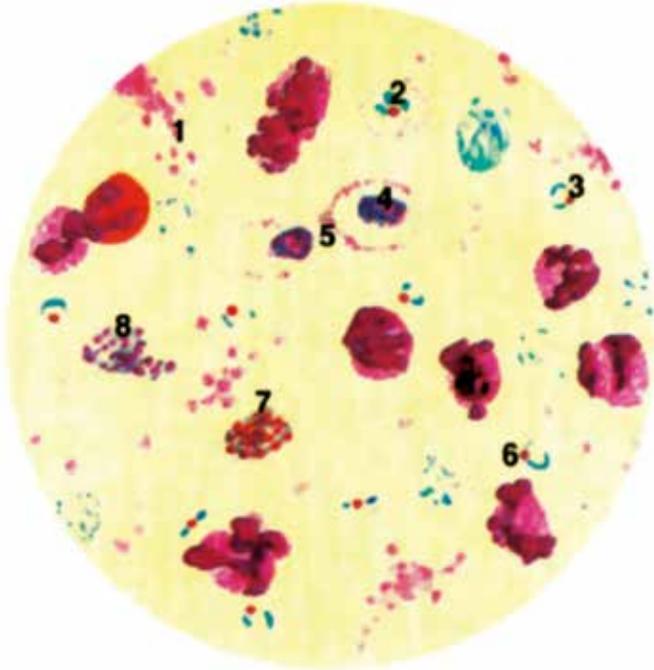
- 1 Eritrocito
- 2 Trofozoito marginal
- 3 Trofozoito joven
- 4 Trofozoitos. Eritracitos multiparasitado
- 5,6 Trofozoitos maduros con pigmento
- 7,8 Esquizonte joven
- 9,10 Esquizonte maduro con pigmento
- 11,12 Gametocitos

Plasmodium malariae **(Frotis)**



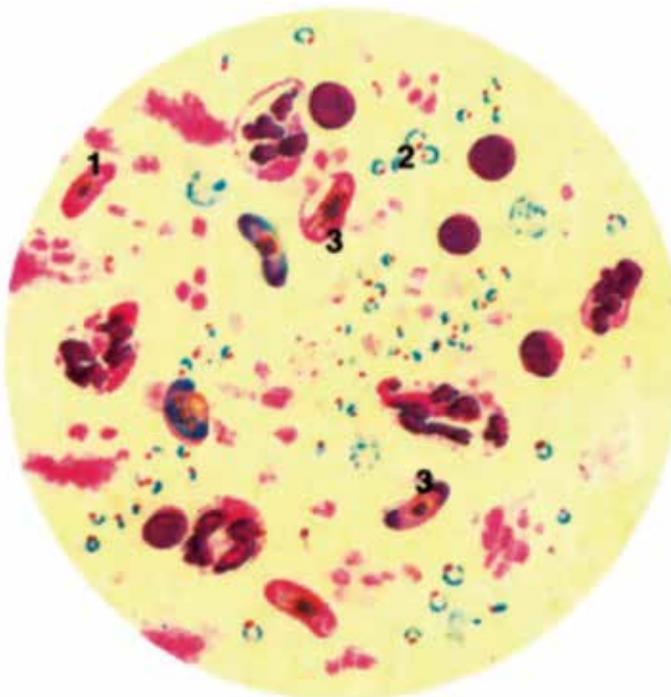
- 1 Eritrocito
- 2 Trofozoito joven
- 3,4 Esquizonte joven
- 5 Esquizonte maduro, pigmento al centro
- 6 Gametocito con Cromatina compacta
- 7 Gametocito con Cromatina difusa

Plasmodium vivax **(Gota gruesa)**



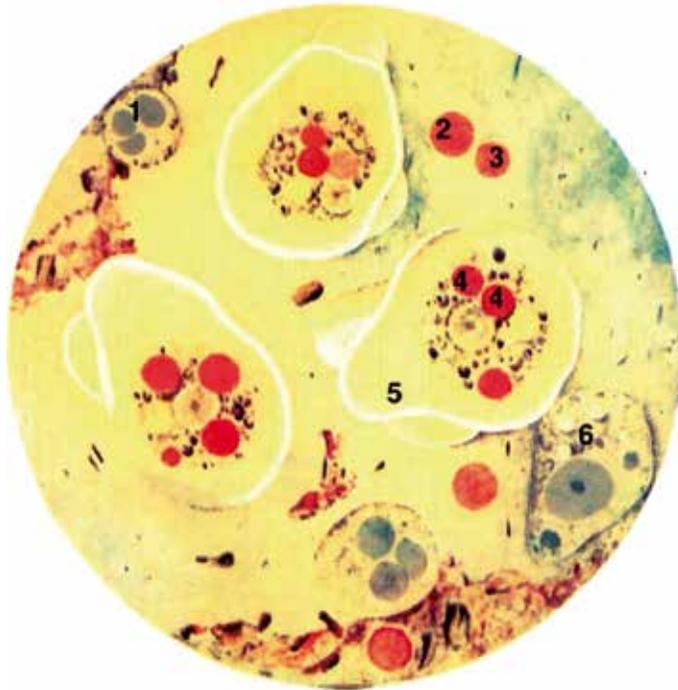
- 1 Plaquetas
- 2 Eritrocito parasitado
- 3 Anillo libre
- 4 Pigmento
- 5 Gránulos de Schülfner
- 6 Núcleo del parásito
- 7 Esquizonte
- 8 Merozoitos

Plasmodium falciparum **(Gota gruesa)**



- 1 Pigmento malárico
- 2 Formas anulares
- 3 Gametocitos

PREPARACIÓN DE HECES EN FRESCO

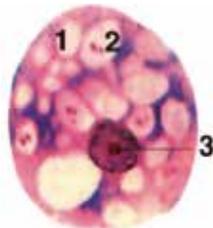


- 1 Leucocitos
- 2 Eritrocitos
- 3 Bacterias
- 4 Eritrocitos fagocitados
- 5 Pseudópodo
- 6 Célula epitelial

Entamoeba histolytica

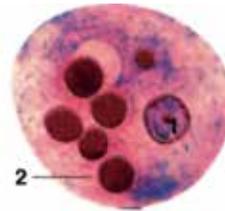
FORMA MINUTA
(Luz intestinal)

- 1 Vacuola
- 2 Bacteria fagocitada (en vacuola)
- 3 Núcleo



FORMA MAGNA
(Invasora de tejidos)

- 1 Núcleo con endosoma central
- 2 Eritrocito fagocitado



FORMA MINUTA VEGETATIVAS

- 1 Membrana del quiste
- 2 Núcleo
- 3 Vacuola
- 4 Cuerpos cromatoides "Salchicha"



- 5 Quiste binucleado
- 2 Quiste cuadrinucleado

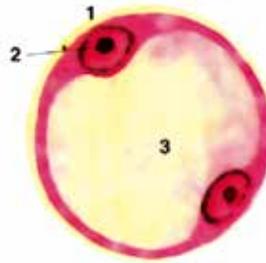
Entamoeba Coli

TROFOZOITO



- 1 Núcleo con endosoma excéntrico
- 2 Bacterias fagocitadas

QUISTE BINUCLEADO



- 1 Membrana quística
- 2 Núcleo
- 3 Vacuola de glicógeno

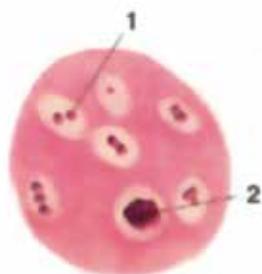
Quiste con ocho núcleos



- 1 Membrana quística
- 2 Núcleo
- 3 Cuerpo cromatoide

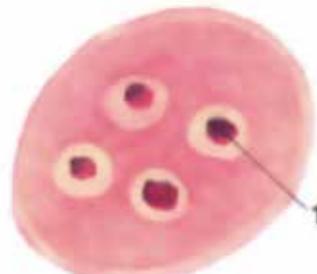
Endolimax Nana

- 1 Vacuola con bacteria
- 3 Núcleo



TROFOZOITO

- 1 Núcleo



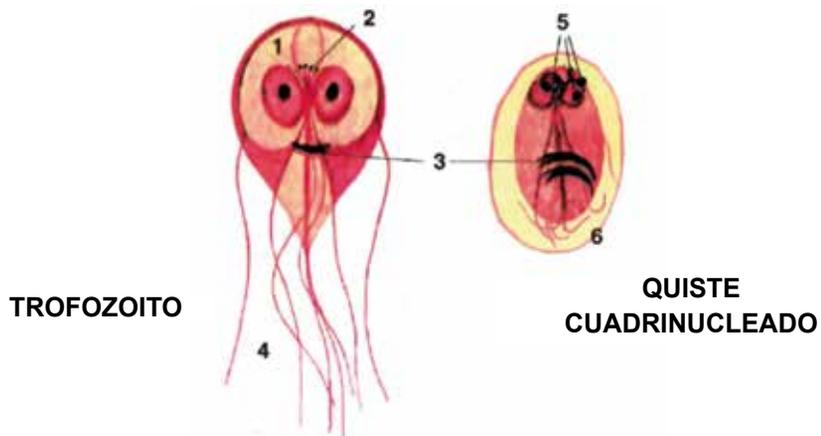
QUISTE TETRANUCLEADO

Giarda Lamblia (Jugo duodenal, preparación en fresco)



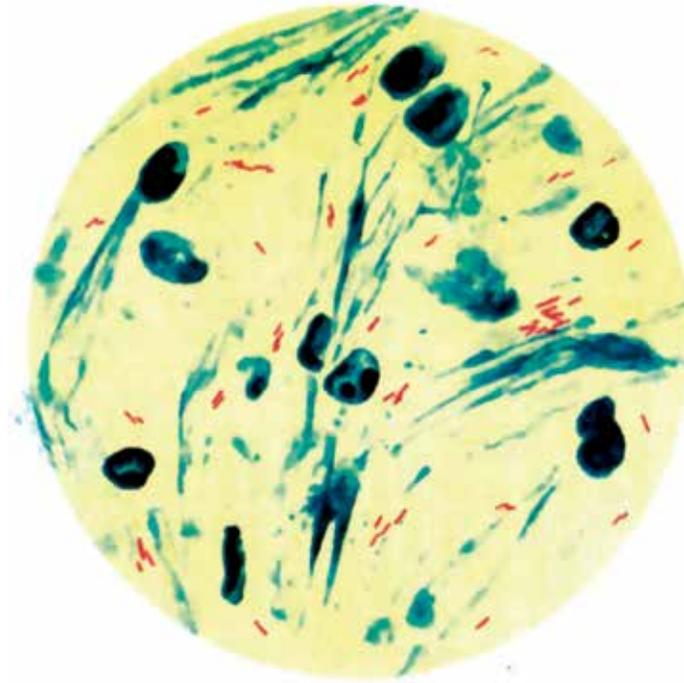
-
- 1 Bacterias
 - 2 Núcleos
 - 3 Vista ventral
 - 4 Vista lateral

FROTIS DE HECES - HEMATOXILINA

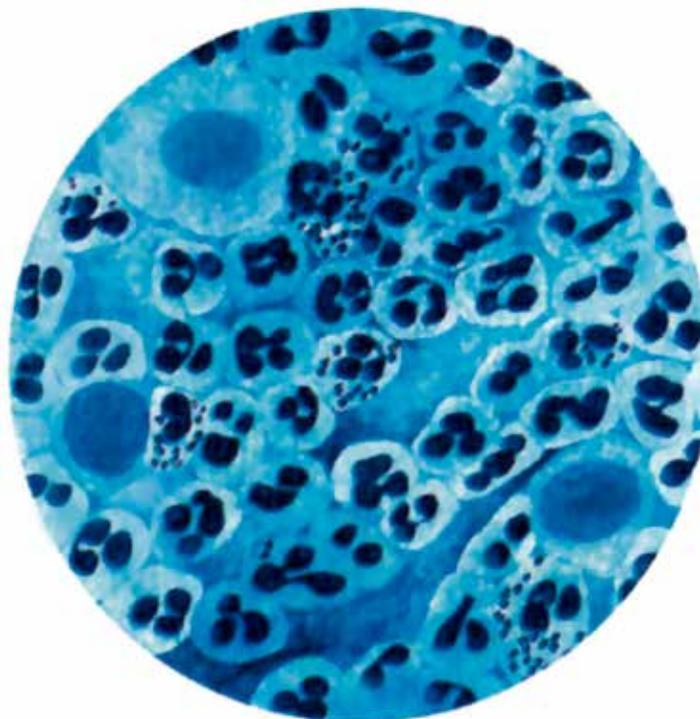


-
- | | |
|-----------------------|---------------------|
| 1 Disco succionador | 4 Flagelos |
| 2 Blefaroplasto | 5 Endosomas |
| 3 Cuerpos parabasales | 6 Membrana quística |

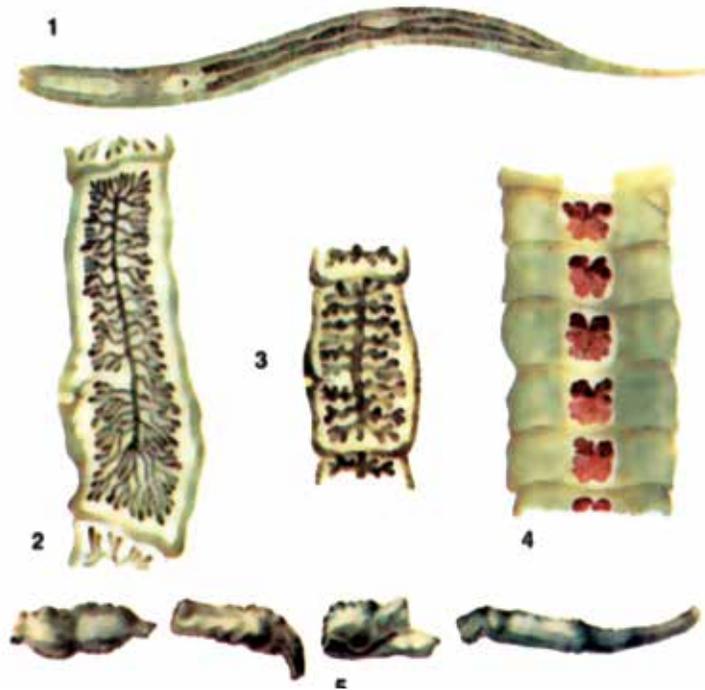
Mycobacterium tuberculosis
(Coloración Ziehl-Neelsen)



Nesseira gonorrhoeae
(Coloración azul de metileno)



HELMINTOS

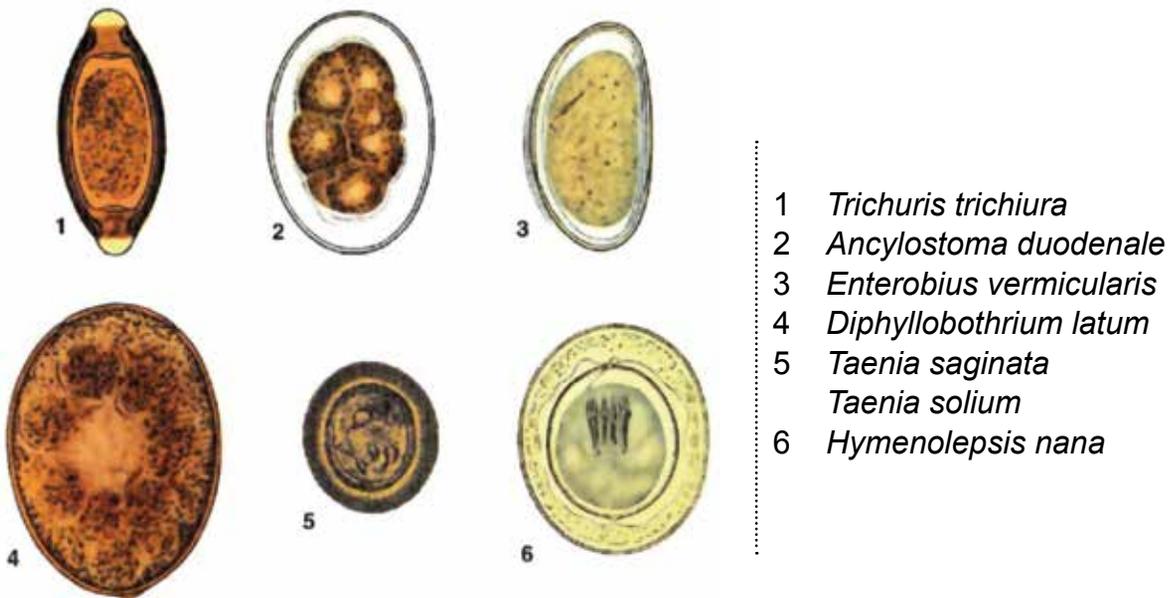


-
- 1 Strongyloides stercorafis
 - 2 Taenia saginata
 - 3 Taenia solium
 - 4 Diphylobothrium latum
 - 5 Taenia saginata

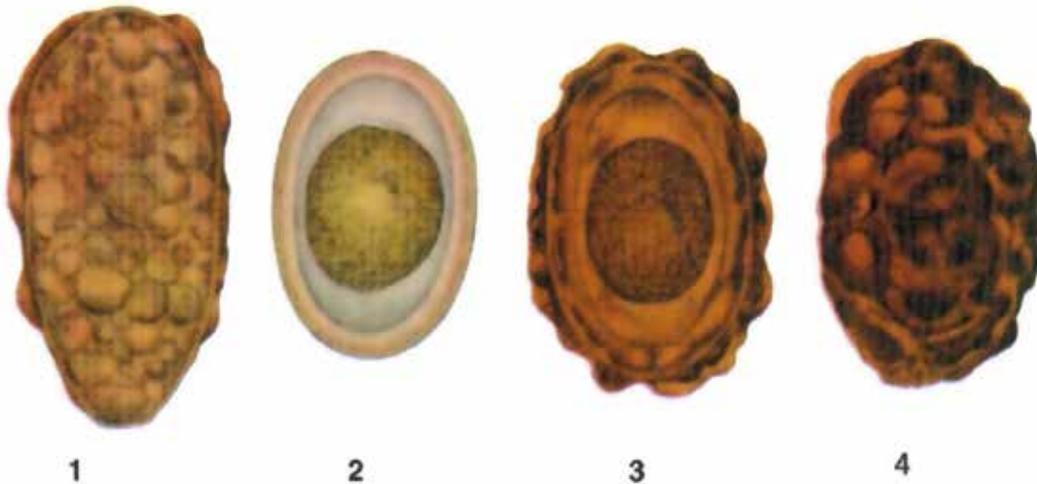
HUEVOS DE *Fasciola hepática*



HUEVOS DE HELMINTOS

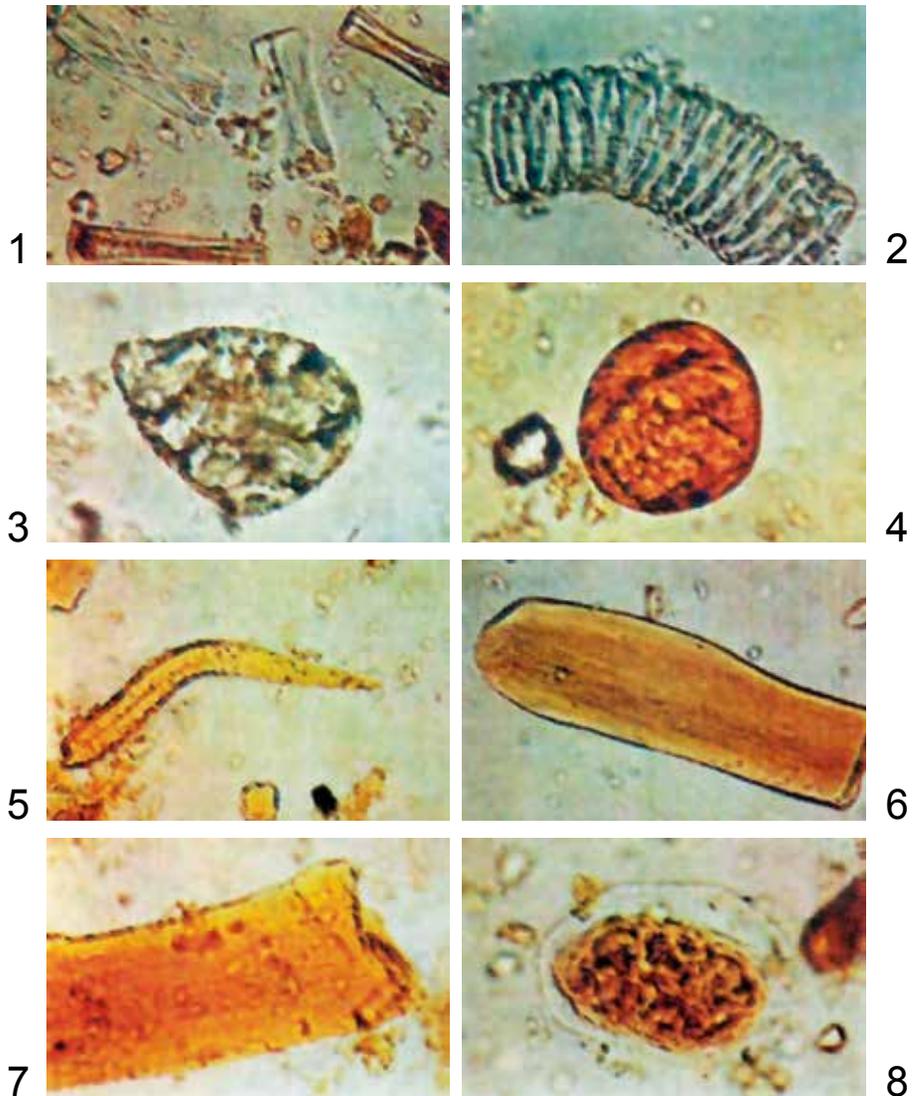


HUEVOS DE *Ascaris lumbricoides*



-
- 1 Aspecto externo
 - 2 Corte óptico
 - 3 Decorticado
 - 4 No fecundado

ESTRUCTURAS QUE SE CONFUNDEN CON HUEVOS O LARVAS DE PARÁSITOS



-
- 1,8 Células vegetales
 - 2 Vegetales espirales
 - 3 Célula coloidal
 - 4 Célula coloide teñida con yodo
 - 5 Pelos vegetales
 - 6 Fibra de carne
 - 7 Fibra de carne teñida con yodo

Se terminó de imprimir en la imprenta gráfica de
Solvimagraf S.A.C.
Jr. Emilio Althaus N° 406, Of. 301 - Lince
contacto@solvimagraf.com / diseno@solvimagraf.com
Teléf. 471-9149 / 471-1972
www.solvimagraf.com

ISBN: 978-612-310-018-6



9 786123 100186



Instituto Nacional de Salud
Jr. Capac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú
Teléfono: (0511) 748 - 1111
Página Web: www.ins.gob.pe