

CAPÍTULO

VI

PARASITOLOGÍA Y MICOLOGÍA

OBTENCIÓN DE HECES.....	243
Principios generales	243
RECIPIENTES PARA HECES	245
Materiales	245
Método de obtención	246
PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO EN PARASITOLOGÍA.....	249
GUÍA DE IDENTIFICACIÓN	249
HELMINTOS ADULTOS	
QUE SE ENCUENTRAN EN HECES.....	250
Helmintos redondos frecuentes	250
Tenias o helmintos planos segmentados	251
Otros helmintos	254
HUEVOS Y LARVAS DE PARASITOS	
INTESTINALES	255
Principios generales	255
Características de los huevos	256
AMEBAS, FLAGELADOS Y CILIADOS: FORMAS MÓVILES.....	262
Principios generales	262
Amebas	262
Flagelados	264
Ciliados.....	265
AMEBAS, FLAGELADOS Y CILIADOS: FORMAS QUÍSTICAS	266
Principios generales	266
Quistes de amebas.....	267
Quistes de flagelados y ciliados	268
EXAMEN DIRECTO DE HECES.....	269
Principios generales	269
EXAMEN DE TINCIÓN CON YODO Y CON SOLUCIÓN SALINA O CLORURO DE SODIO	270
Materiales	270
Método.....	270
EXAMEN DE HUEVOS DE OXIURIOS	
MÉTODO DE LA CINTA ADHESIVA.....	273
Principios generales	273
Materiales	273
Método.....	273
MÉTODO DE CONCENTRACIÓN DE PARÁSITOS ..	274
Principios generales	274
Método de flotación de Faust	274
Método de sedimentación de Ritchie	276
EXAMEN DIRECTO DE <i>Trichomonas</i> EN SECRECIÓNES GENITOURINARIAS.....	279
Principios generales	279
Materiales	279
Método.....	279
EXAMEN DE GOTAS GRUESAS Y FROTIS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>Plasmodium</i>	281
Principios generales	281
Coloración de la gota gruesa y frotis	282
Examen microscópico del <i>Plasmodium</i>	286
Principios generales	286
Frotis.....	288
Gota gruesa.....	290
Determinación de la densidad parasitaria	293
OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS	297
Muestra de cuerpos fluidos (linfa)	297
Muestra de frotis	298
Muestra de tejido (biopsia)	300
EXAMEN DIRECTO Y CULTIVO EN EL DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA.....	302
Principios generales	302
Procesamiento e identificación del parásito	303
EXAMEN QUÍMICO PARA ENCONTRAR SANGRE OCULTA EN LAS HECES.....	310
Principios generales	310
Materiales y reactivos	310
Método.....	310
Precauciones en el laboratorio	312
Precauciones para el paciente	312
OBTENCIÓN DE ESCAMAS	313
Principios generales	313
EXAMEN DIRECTO CON HIDROXIDO DE POTASIO AL 10%.....	313
Materiales	314
Procedimientos	314
Lectura.....	314
Control de calidad interna	315
CULTIVO Y TIPIFICACIÓN DE HONGOS DERMATOFITOS	315
Materiales	315
Procedimiento	316
Lectura	316
Control de calidad interna	319
MEDIOS DE CULTIVO	319
Agar Sabouraud glucosado	319
Agar papa glucosado.....	320

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.

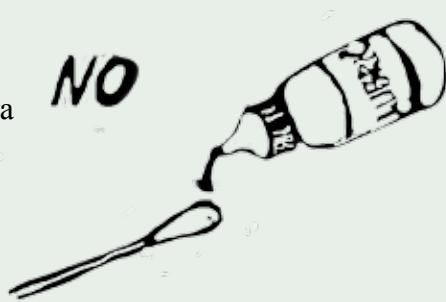


VI



⚠ 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.

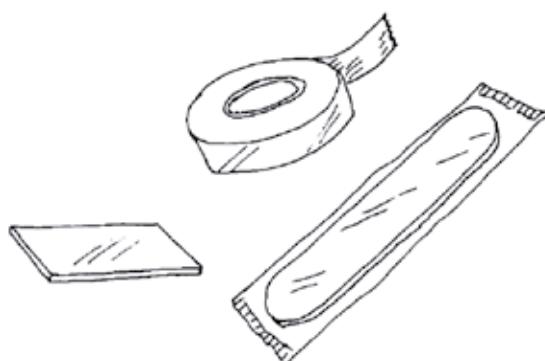


RECIPIENTES PARA HECES

- ◆ 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.



VI

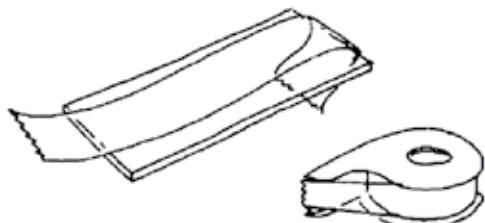
MÉTODO DE OBTENCIÓN

a. Examen parasitológico

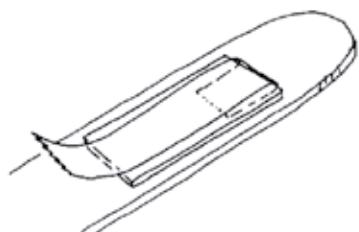
- ♦ Usar un recipiente limpio para obtener la muestra.

OBTENCIÓN DE HUEVOS DE OXIUROS (TEST DE GRAHAM)

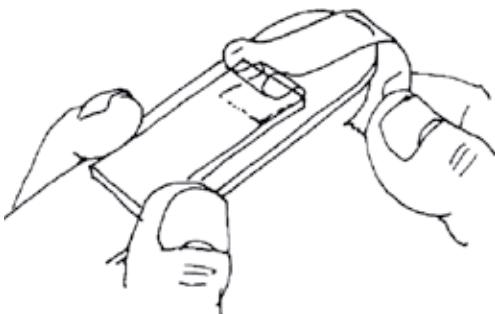
1. Pegar la cinta adhesiva en la lámina portaobjeto, dejando que sobresalgan ambos extremos de la cinta.



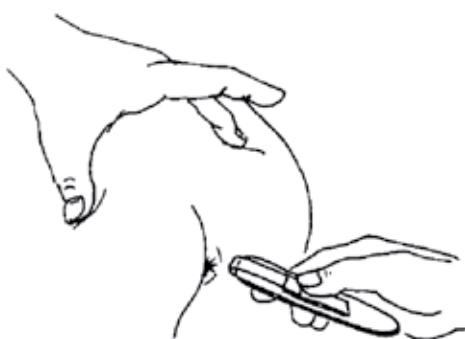
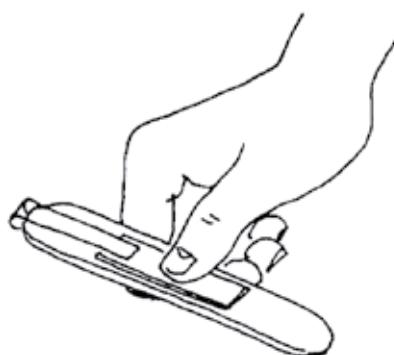
2. Colocar el lado plano del bajalengua debajo del portaobjeto.



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.



- 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.

- 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.



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.

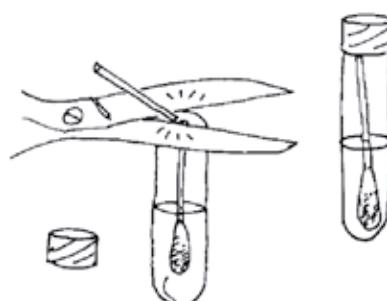


- ♦ **En el caso de niños u otros pacientes que tengan problemas en la recolección de muestra,** obtenerla directamente, introduciendo en el recto un hisopo previamente embebido en el espesor del medio de transporte que se va usar y luego se introduce en el recto.

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.



VI

- **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*

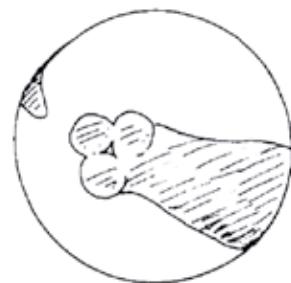
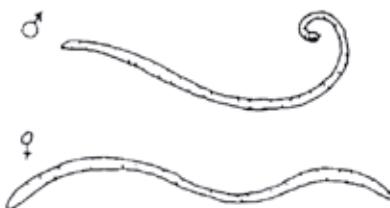
Helmintos redondos grandes.

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).

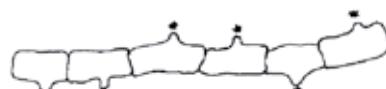
b. *Tenias frecuentes*

Tenía de la res (*Taenia saginata*)

Segmentos rectangulares separados.

Salen por el ano acompañados o no de heces.

Poros colocados alterna e irregularmente.



Segmentos color marfil, de 1-2 cm.
Con veinte ramificaciones uterinas
aproximadamente.

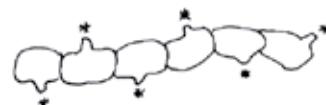


Escólex o cabeza :
cuatro ventosas de 2 mm de diámetro.



Tenía 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.



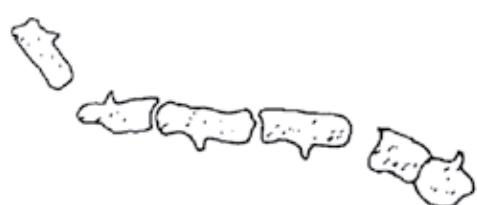
Escólex o cabeza :

Dos coronas de gancho y una ventosa de 1mm de diámetro.

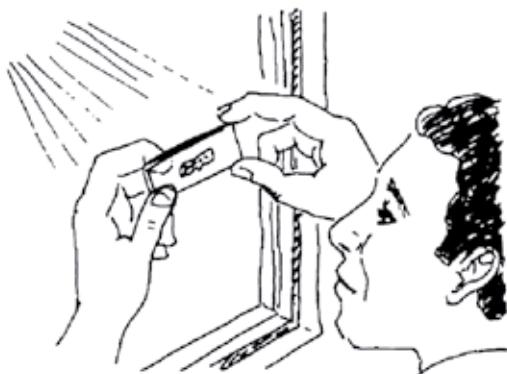
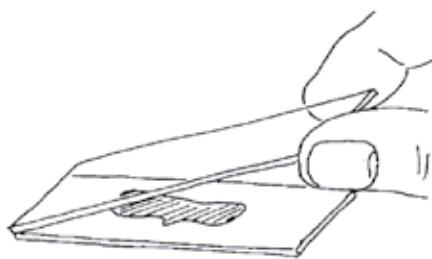


c. Examen de tenias

- I. Examinar una cadena de segmentos para observar el orden de los poros laterales



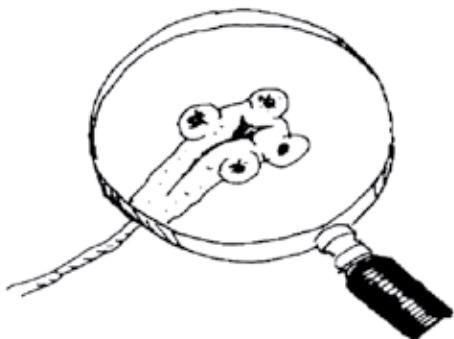
2. Examinar un solo segmento aplanado suavemente entre dos portaobjetos.



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.

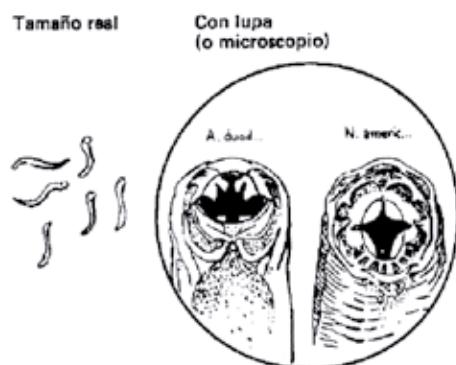


a. *Ancylostoma duodenale*

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)*

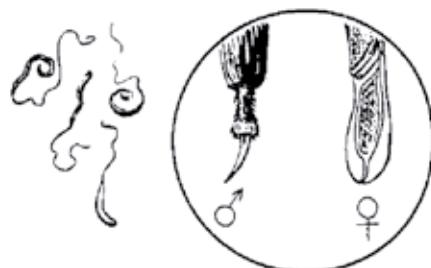
Semejante a un pequeño látigo.

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).

VI

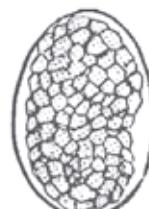
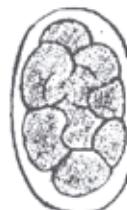
- Fibras de carne digerida (b).
- Jabones (c).
- Burbujas y gotas de grasa (d).
- Pelos vegetales (e).
- Granos de polen y esporas de Hongos (f).



CARACTERÍSTICAS DE LOS HUEVOS

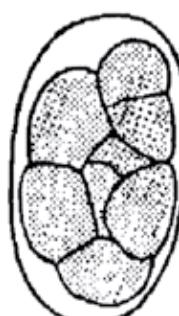
a. *Ancylostoma duodenale*

- 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".



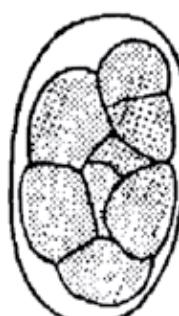
b. *Necátor americanus*

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:



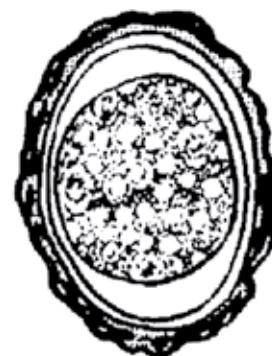
HUEVOS FECUNDADOS, CON ENVOLTURA DOBLE

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

VI

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.

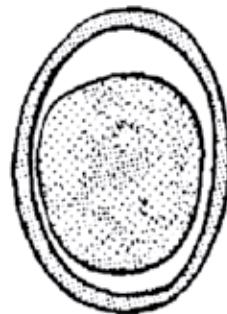


Contenido: Se encuentra lleno de gránulos brillantes, voluminosos y redondos.

HUEVOS SEMIDECORTICADOS, FECUNDADOS

Envoltura: carecen de envoltura externa. Tienen envoltura única lisa, gruesa, de color amarillo pálido.

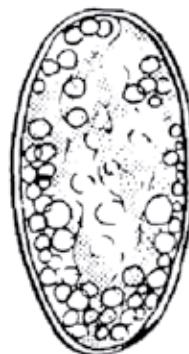
Contenido: una sola masa granulosa central redonda.



HUEVOS SEMIDECORTICADOS, NO FECUNDADOS

Envoltura: una sola envoltura lisa delgada con doble línea.

Contenido: gránulos voluminosos, redondos.



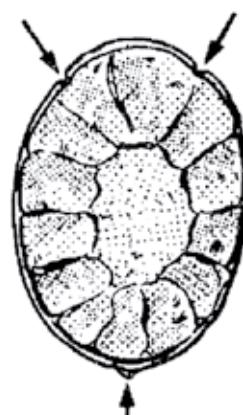
d. *Diphyllobothrium latum*

Tamaño: 70 µm.

Forma: oval, uniforme.

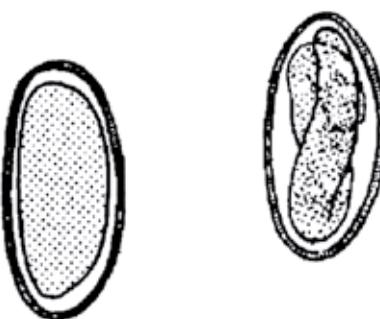
Envoltura: lisa y delgada.

Contenido: masa de células pequeñas ordenadas alrededor de una célula central voluminosa. Color amarillo pálido.



e. *Enterobius vermicularis*

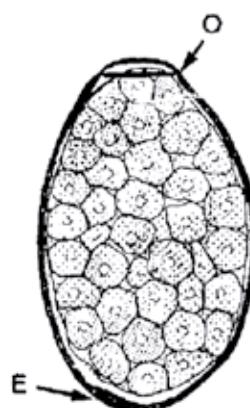
- Tamaño:** 50 - 60 μm .
- Forma:** oval, plana de un lado y redondeada del otro lado.
- Envoltura:** lisa y delgada, a veces se observa doble línea.
- Contenido:** masa granulosa pequeña, oval e irregular. Se puede observar en otros casos el embrión (pequeña larva enrollada).

**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.

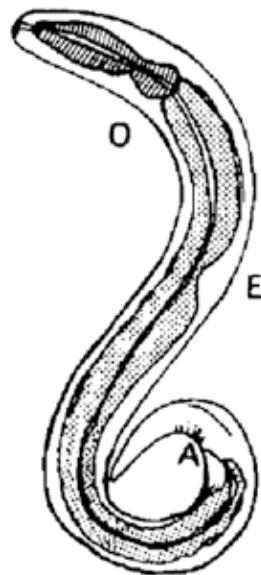
Boca: pequeña.

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.

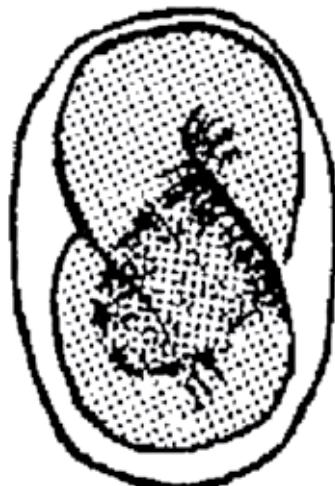
Tamaño: 50 μm .

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:** 50 μm
- 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.

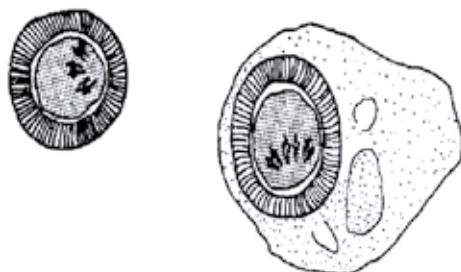
*j. Taenia saginata o Taenia solium*

VI

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

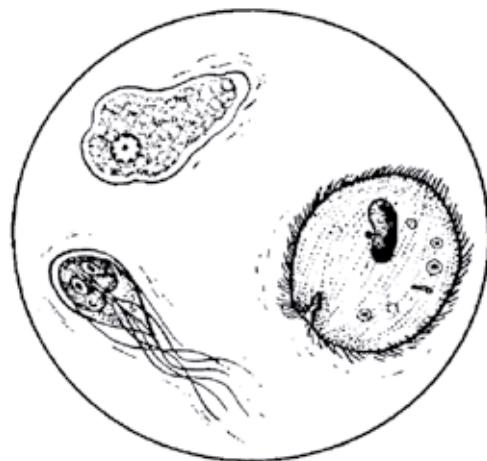
PRINCIPIOS GENERALES

- ♦ **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 .

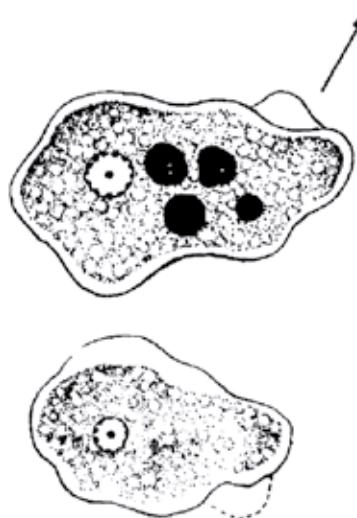
Forma: en movimiento se alarga y cambia de forma; si no está en movimiento es redonda.

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.



VI

b. *Entamoeba coli*

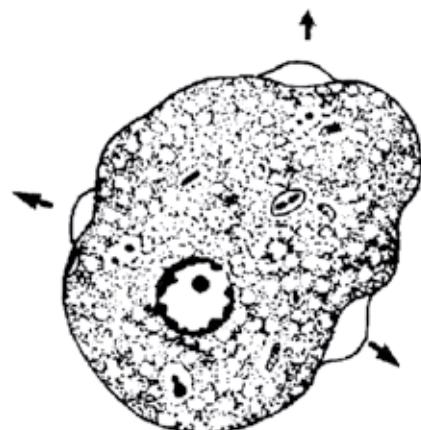
Tamaño: 20 - 40 μm .

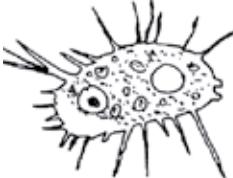
Forma: ovalo alargada.

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*

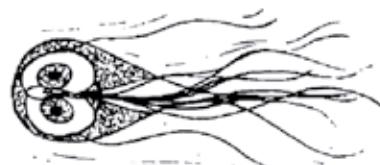
Tamaño: 10 - 18 μm .

Forma: vista frontal: piriforme (pera).

vista lateral: forma de cuchara.

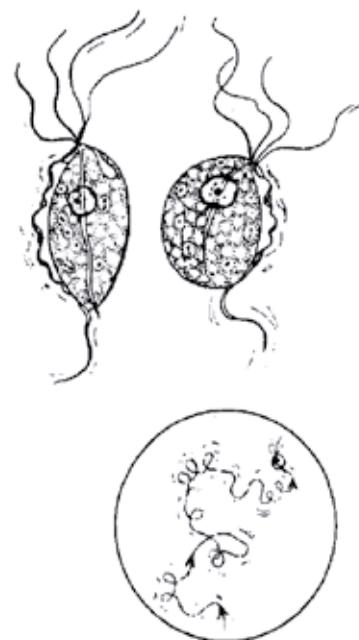
Movilidad: se desplaza hacia delante con pequeños saltos, o bien dando **giros**.

Contenido: presenta dos grandes núcleos ovalados, poco visibles.



b. *Trichomonas hominis*

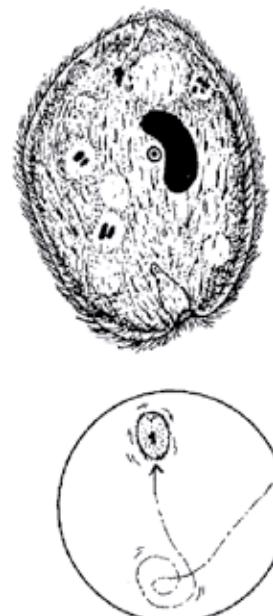
- Tamaño:** 10 - 15 μm .
- Forma:** oval con dos polos adelgazados.
- Núcleo:** difícil de identificar.
- Flagelos:** generalmente cuatro.
- Membrana ondulante:** solo se encuentra en un lado; es sumamente móvil.
- Movilidad:** gira y parece vibrar.

**CILIADOS**

VI

a. *Balantidium coli*

- Tamaño:** 50 μm . Mayor que un huevo de Ascaris.
- Forma:** oval, con un polo más redondo que el otro.
- Cílios:** cubierto por cílios 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.

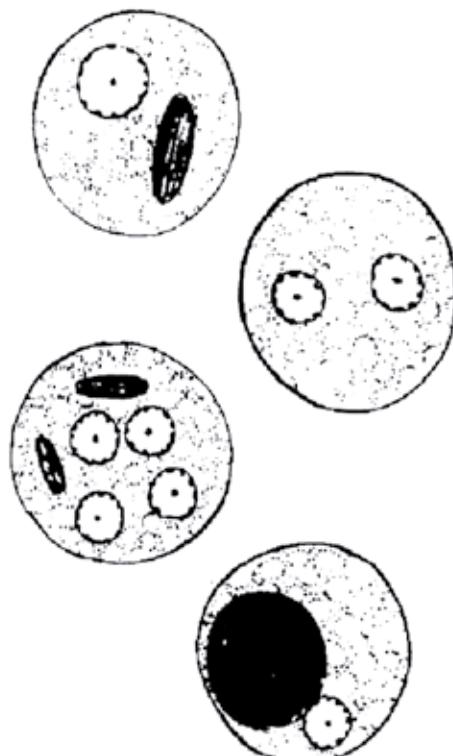
- ◆ **Los quistes no deben confundirse con:**
 - **Levaduras**, que son pequeñas (5 - 6 µm), con brote o yema. De color rojo pardo con solución de yodo. En su interior se observa 3 - 6 gránulos en posición excéntrica.
 - **Leucocitos**, 10 - 20 µm, de forma redonda o alargada, cuyo citoplasma contiene vacuolas pequeñas.
 - **Pus**, se observa como una masa de leucocitos degenerados, de color grisáceo y no transparente como el moco.



QUISTES DE AMEBAS

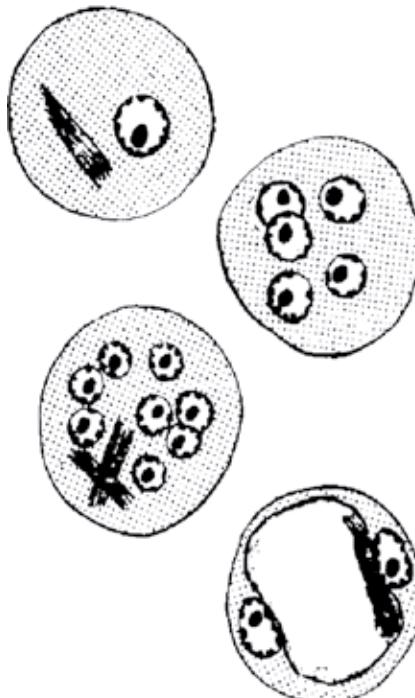
a. *Entamoeba histolytica*

- 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*

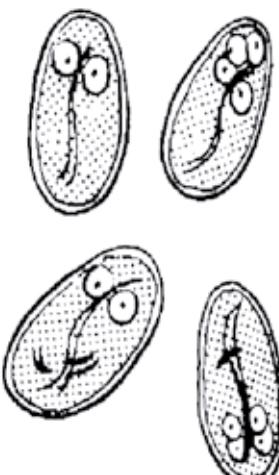
Tamaño: 8 – 12 μm .

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

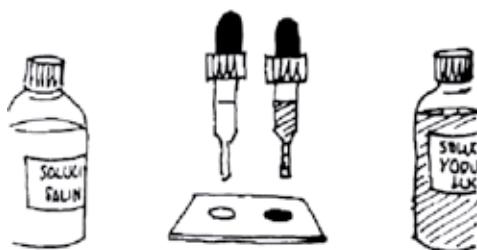
- Portaobjetos o láminas.
- Cubreobjetos o laminillas.
- Aplicadores de madera.
- Solución yodurada de lugol (ver Anexos).
- Solución salina o de cloruro de sodio.
- Un microscopio.
- Lápiz de cera.



MÉTODO

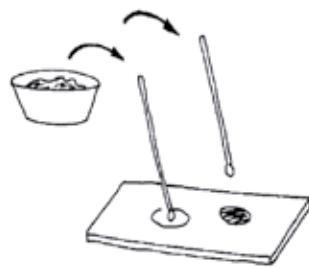
1. En un portaobjetos colocar

- 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.

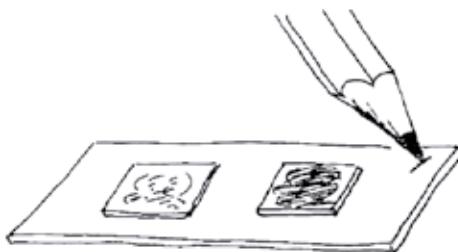
3. Mezclar la porción tomada de la muestra con la gota de solución salina o de cloruro de sodio.



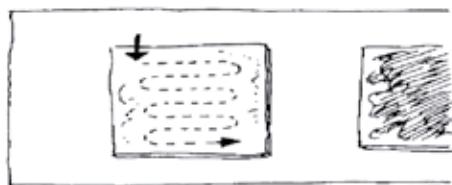
4. Tomar otra porción de la muestra y mezclarla con la gota de solución yodurada.



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.

VI

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.

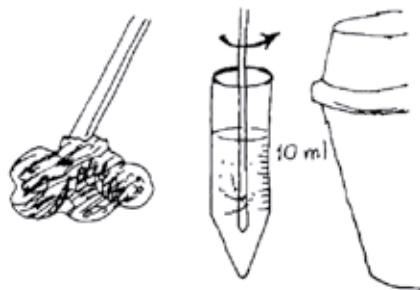
MATERIALES

- 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

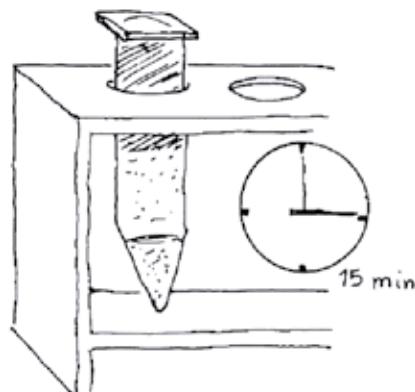
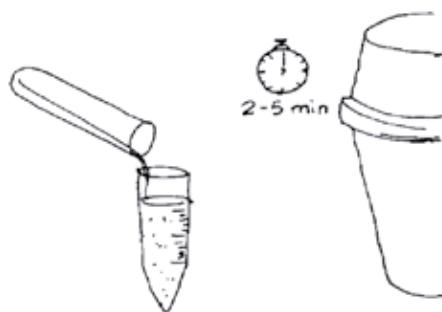
1. En el tubo de ensayo mezclar, usando el aplicador de madera, 2 g de heces con 8 - 10 mL de agua corriente tibia, centrifugar a 3 000 RPM durante 3 minutos.



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.

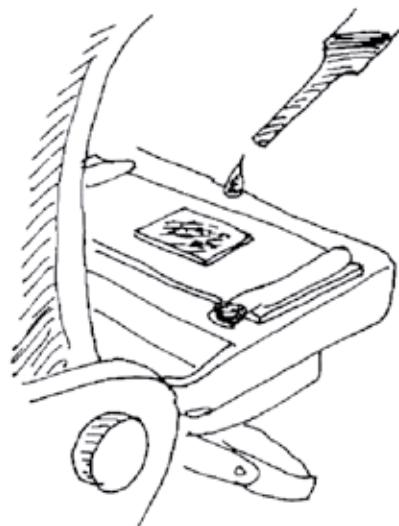


3. Se añaden 3 - 4 mL de solución de zinc al 33,3%, se centrifuga durante 2 - 5 minutos a 3 000 RPM.



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.

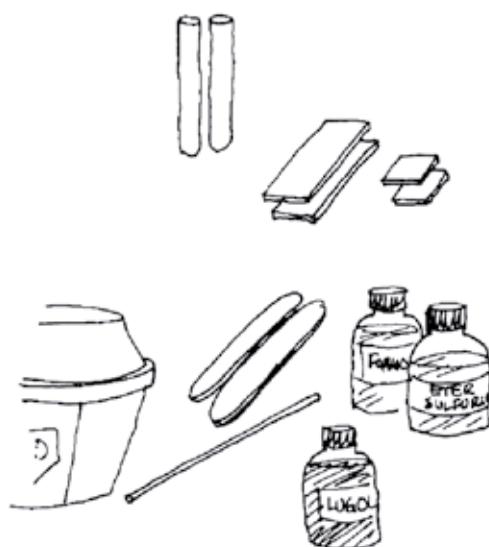
5. Despues de los 15 minutos, sacar el cubreobjetos, levantándolo. Colocarlo en un portaobjetos con una gota de lugol y observarlo al microscopio con objetivos de 10x y 40x.



MÉTODO DE SEDIMENTACIÓN DE RITCHIE

MATERIALES

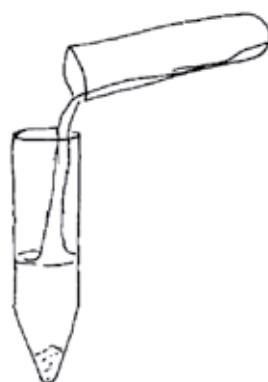
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Formol al 10% (ver Anexos).
- Éter sulfúrico comercial.
- Lugol (ver Anexos).
- Agua corriente tibia.
- Un aplicador de madera.
- Bagueta.
- Una centrífuga.
- Un microscopio.



MÉTODO

1. 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 jebe y sacudir vigorosamente, teniendo cuidado que el tapón no salte.

VI

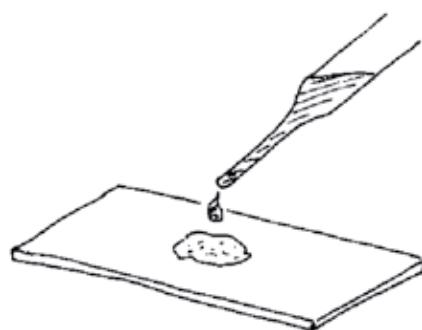
4. Retirar el tapón y centrifugar a 3 000 RPM por 3 minutos.

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 protozoario 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

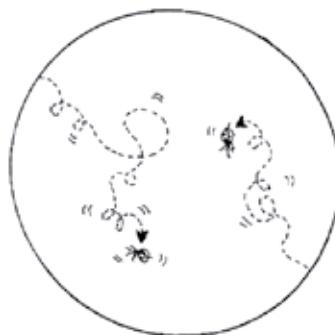
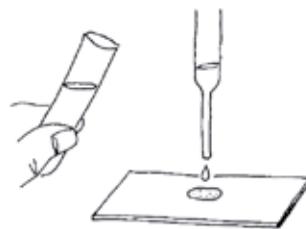
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Solución de cloruro de sodio, tibia a 37 °C (ver Anexos).
- Un asa de siembra.
- Material para obtención de muestra.
- Un microscopio.

MÉTODO

1. Obtener la muestra.
2. Depositar una gota de la secreción con el asa de siembra, en un portaobjetos.



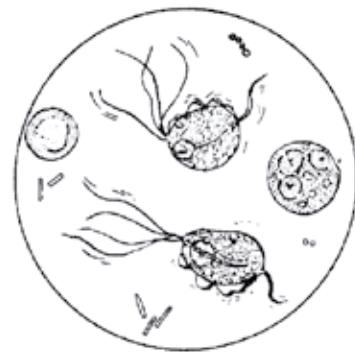
3. Añadir una gota tibia de solución de cloruro de sodio. Mezclar y poner un cubreobjetos.



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:

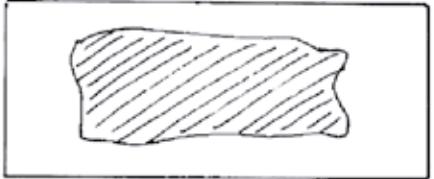
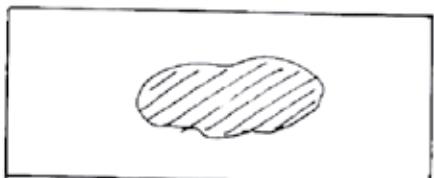
- Tamaño:** 10 - 20 μm .
- Forma:** redonda, globulosa.
- Movilidad:** giran.
- Flagelos:** tienen cuatro, semejantes a látigos.
- Membrana:** ondulante, se encuentra solo en un lado y parece aleta de un pez; es muy móvil.



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 GOTAS GRUESAS 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 GOTTA 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.

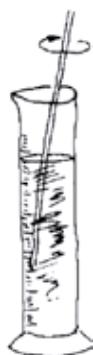
MATERIALES

- 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

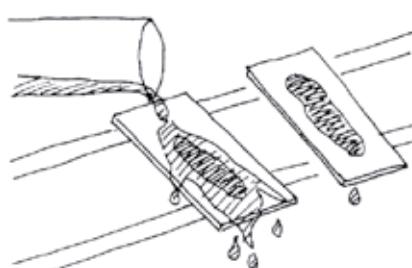
1. Utilizar la probeta de vidrio para preparar colorante de **Giemsa diluido** al 5% con agua amortiguada de pH 7,2 en la proporción de **1 gota de Giemsa (solución madre) con 1 mL de agua amortiguada (o agua de lluvia o agua hervida fría)**.



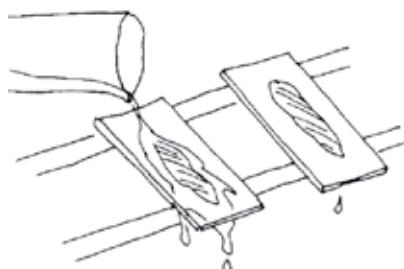
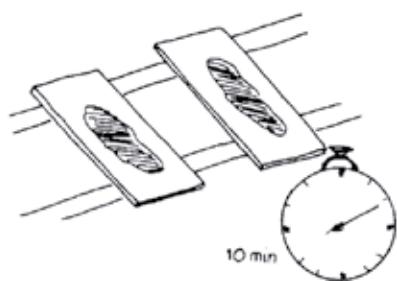
2. Mezclar suavemente con una varilla de vidrio.

VI

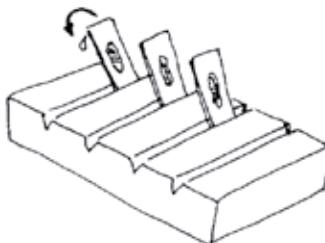
3. Si solo es una lámina (gota gruesa) para colorear, se necesitará aproximadamente 1,5 mL de solución preparada. Si se tuviera que colorear dos láminas, se necesitará tres gotas de solución Giemsa (solución madre) por cada 3 mL de agua amortiguada.
4. **Antes de colorear** verificar si las claves de las láminas coincidan con las solicitudes de diagnóstico.
5. Colocar las láminas a través de dos varillas de vidrio. Cubrirlas 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).



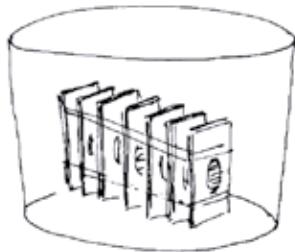
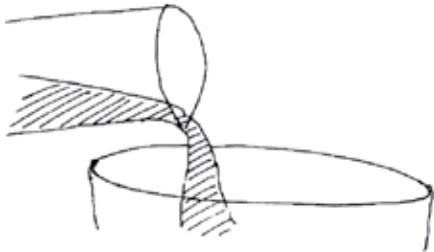
7. Transcurrido el tiempo indicado de coloración, lavar suavemente el colorante de la lámina añadiendo un chorro suave de agua limpia.



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.
- I. 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.

VI

LÁMINAS TEÑIDAS

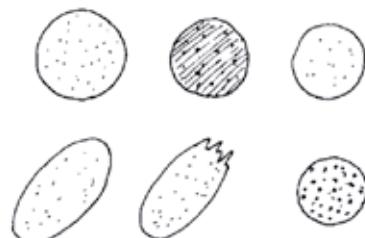
- ◆ En todas las etapas de desarrollo las diversas partes del parásito se tiñen del mismo color.
- ◆ La cromatina (núcleo del parásito) es generalmente redonda y se colorea de un rojo intenso.
- ◆ El citoplasma del parásito toma diferentes formas, desde una forma de anillo a una totalmente irregular. 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.

- I. 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. malarie</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

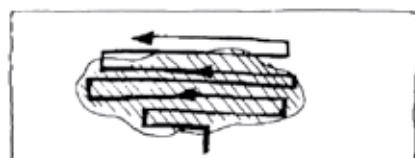
- ◆ El examen de la gota gruesa es mejor para detectar la presencia de parásitos.
- ◆ **Rutinariamente, la gota gruesa debe ser examinada primero.** Presenta las siguientes características:
 - Los glóbulos rojos han desaparecido.
 - Los gránulos de Schüffner se pueden observar alrededor del parásito.
 - 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 GOTTA GRUESA

TROFOZOÍTO

VI

Estado/ Característica	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium malariae</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.

EZQUIZONE

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	Difíciles de distinguir de trozoítos maduros.	Inmaduras: puntiagudas.	Difíciles 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 µL de sangre. Por lo tanto, si encontramos un parásito por campo microscópico, en 1µL 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:

$$\text{Parásitos por microlitro} = \frac{\text{Número de parásitos} \times 8\,000}{\text{Número de leucocitos}}$$

VI

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 (LINFA)

MATERIALES

VI

- 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.

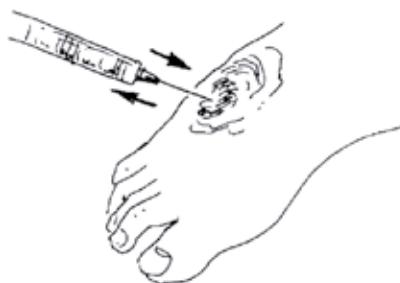


2. Elegir el área decolorada de la pápula (pequeño nódulo) que se halla al margen de la úlcera. Desinfectarla con alcohol al 70% y agua oxigenada.



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.



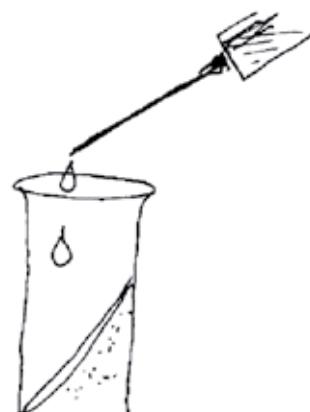
5. Retirar la jeringa.

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

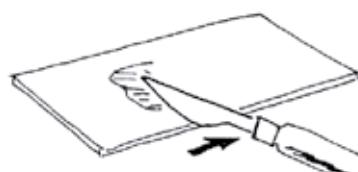
1. Lavar la lesión ulcerada con agua y jabón.



2. Elegir el borde de la lesión ulcerada. Desinfectar con alcohol al 70%.

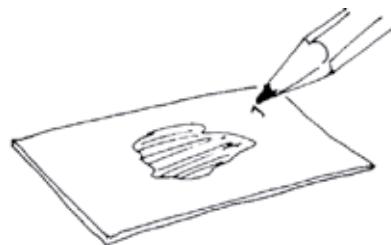
VI

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)



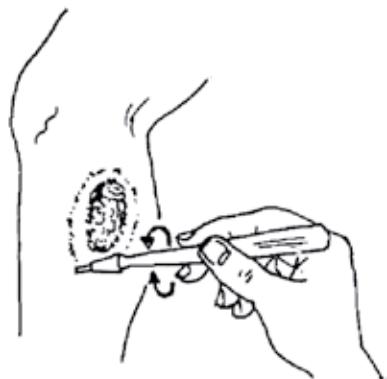
MATERIALES

- 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 romana.
- 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. Anestesiar con 0,5 cc de xilocaína el área elegida.

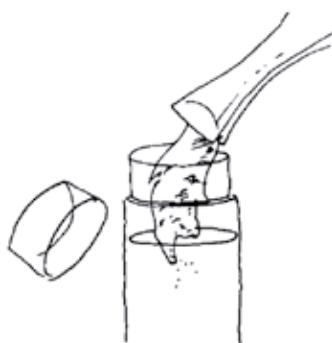
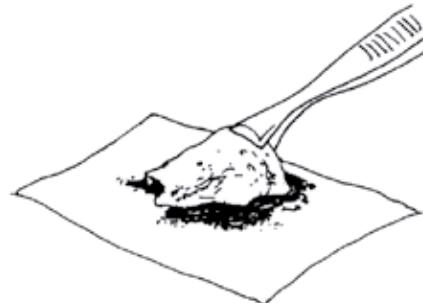
4. Introducir el *punch* en el borde de la lesión y rotar varias veces con movimiento suave.



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.

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

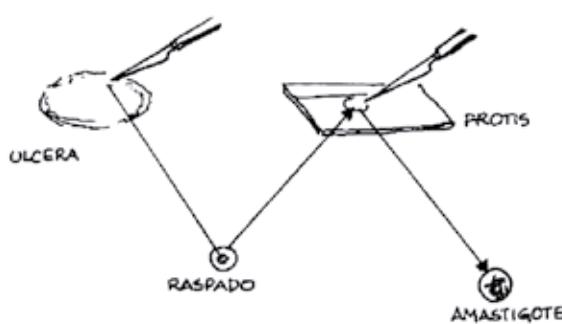
PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria endémica en los valles interandinos y el llano amazónico de nuestro país. Es transmitida por picaduras de flebotomíos.
- ◆ El agente causal es un protozoario 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

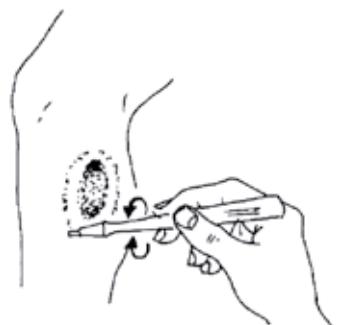
VI

MATERIALES

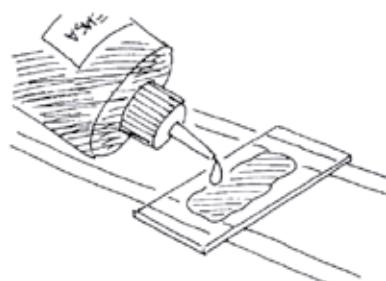
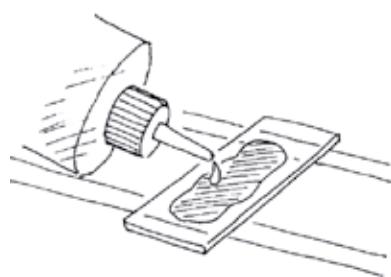
- Materiales para la obtención de muestra.
- Metanol absoluto.
- Coloración Giemsa diluido 1 en 10 a partir de una solución *stock* (ver Anexos).
- Agua corriente de caño.
- Microscopio con objetivo de 100x.
- Aceite de inmersión.

MÉTODO

- I. Obtener la muestra de frotis o una impronta - frotis.



2. Fijar las láminas que contienen el frotis o impronta-frotis cubriendolas 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

VI

- 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.



VI

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 $\frac{1}{2}$ 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.

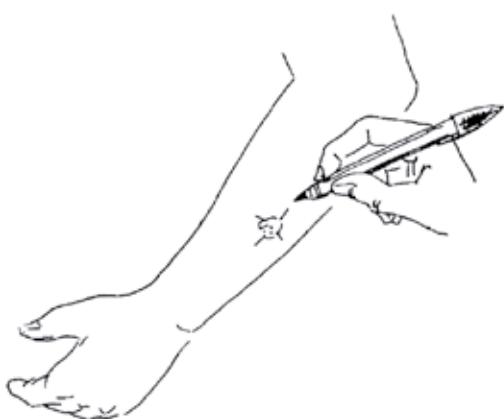


3. Introducir intradérmicamente la aguja de la jeringa con el bisel hacia arriba, cargada con leishmanina. Lentamente introducir el antígeno formando una pequeña pápula.

4. Recomendar al paciente que **no debe frotarse en el área de aplicación**.

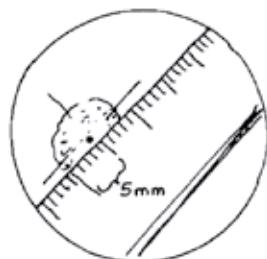
LECTURA E INTERPRETACIÓN

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 cm^3) 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.

VI

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 carcinógeas 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 extracto 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, interroge 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 lámina 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

VI

- ♦ Los hongos dermatofitos son un grupo de hongos queratinófilicos, 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 diagnóstico 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.

♦ MORFOLOGÍA 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)..... | <i>M. canis</i> (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) *M. gypseum* (Figura 1.5)
 - 5. Macroconidios alargados en forma de cigarrillo 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 *T. mentagrophytes*^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 *T. mentagrophytes* (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 *T. rubrum*^c

- Macroconidios ovales en forma de porra, aislados o en racimos (Figura 1.3f). Ausencia de microconidios.
- Clamidosporas abundantes *E. floccosum* (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 *T. mentagrophytes*^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. krajdenii*), *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 contenido tiamina e inositol, el 16% en el medio contenido tiamina y ninguna cepa se desarrolló en el medio sin vitamina.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

♦ MATERIAL DE REFERENCIA

- Cepas referenciales de dermatofitos
- Las 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 inoculos de hongos miceliales y en la estimulación de producción de pigmento rojo en *Trichophyton rubrum*, rosa salmón en *Microsporum audouinii* y amarillo en *Microsporum 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.

CAPÍTULO

VII

SECRECIONES

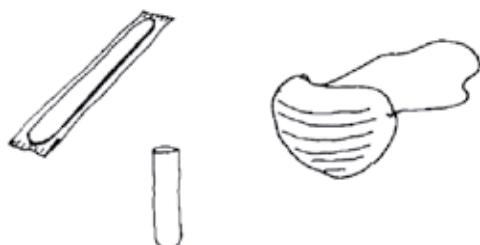
OBTENCIÓN DE SECRECIONES	
FARÍNGEAS.....	325
Materiales	325
Método de obtención	325
OBTENCIÓN DE SECRECIÓN ÓTICA	327
Materiales	327
Método de obtención	327
OBTENCIÓN DE SECRECIÓN URETRAL	328
Materiales	328
Método de obtención	328
OBTENCIÓN DE SECRECIÓN VAGINAL.....	330
Materiales	330
Método de obtención	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 baya lengua estéril.
- Una mascarilla protectora.
- Tubo estéril.



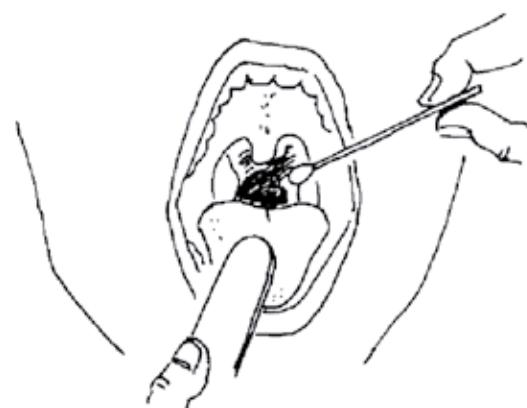
MÉTODO DE OBTENCIÓN

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).

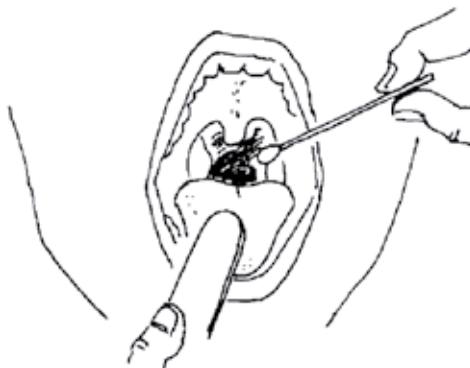


VII

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



VII

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.

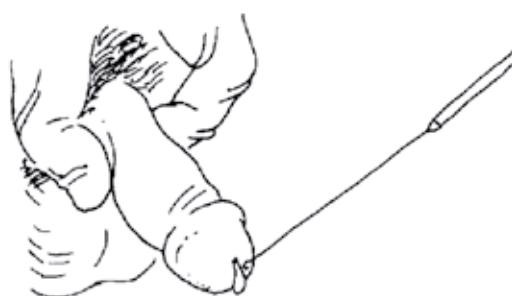


MÉTODO DE OBTENCIÓN

1. Tomar la muestra a primera hora de la mañana, antes de que el paciente haya orinado.

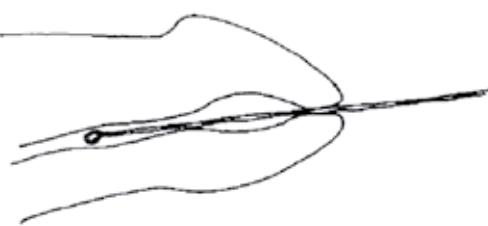


2. Limpiar el meato con algodón humedecido con solución salina estéril.

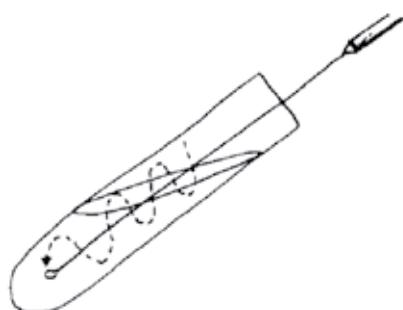


3. Aplicar al pene una ligera presión (desde atrás), de manera que salga una gota de secreción (pus) por el meato.

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 introducido 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.

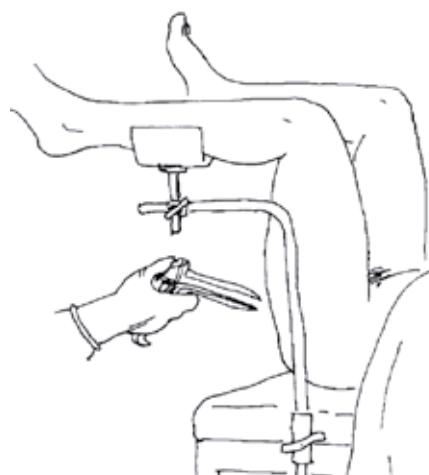
MATERIALES

- Hisopo estéril de alambre delgado y de algodón no demasiado abultado.
- Guantes quirúrgicos estériles.
- Espéculo estéril.
- Tubo con medio de transporte.



MÉTODO DE OBTENCIÓN

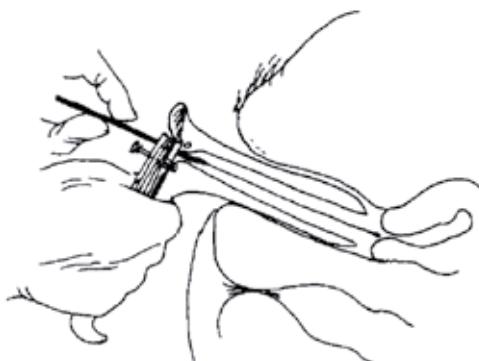
1. Colocar a la paciente en posición ginecológica.



2. Entreabrir 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.



PORAOBJETOS

- ◆ Se debe limpiar con una mezcla de etanol y éter, mediante una gasa. El portaobjetos deberá estar rotulado.



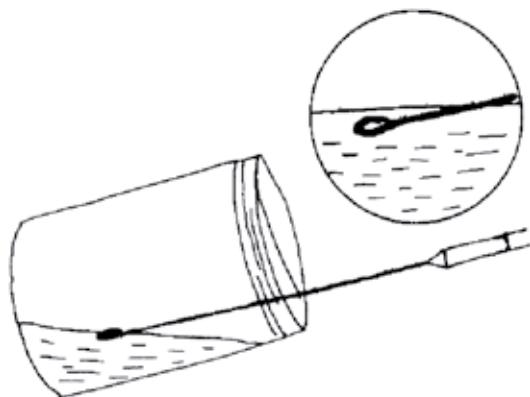
MECHERO DE BUNSEN O DE ALCOHOL

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.

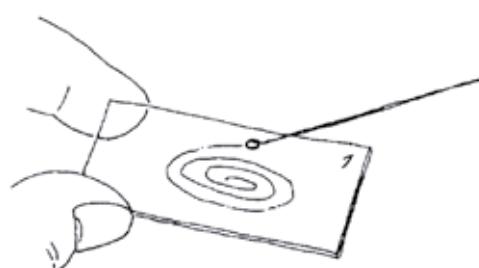


2. Dejar enfriar el asa, contar hasta 20.



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 aplandar ligeramente en el centro de este.



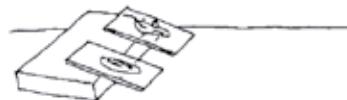
5. Sosteniendo todavía el asa aplandada sobre el portaobjetos, mover trazando un espiral del centro a la periferia.

6. Dejar cierto espacio entre la muestra y cada uno de los cuatro lados del portaobjetos.

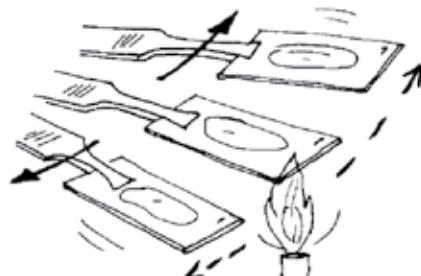
7. Dejar secar la muestra completamente al aire.



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.



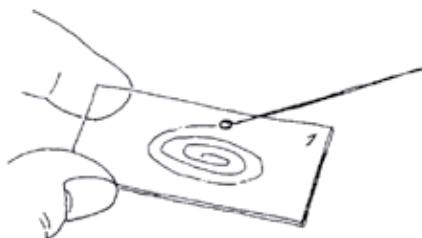
9. Flamear de nuevo el asa hasta que esté al rojo vivo para destruir las bacterias que se encuentren en ella, una vez usada.



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 graso, 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

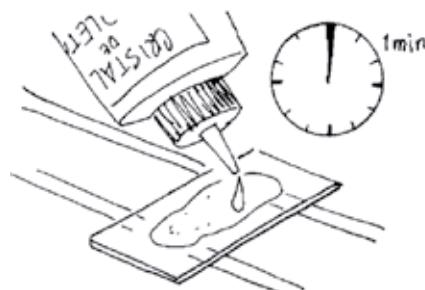
- Solución de cristal violeta al 1 %.
- Solución de safranina.
- Solución de Lugol.
- Alcohol acetona.
- Agua corriente.



VII

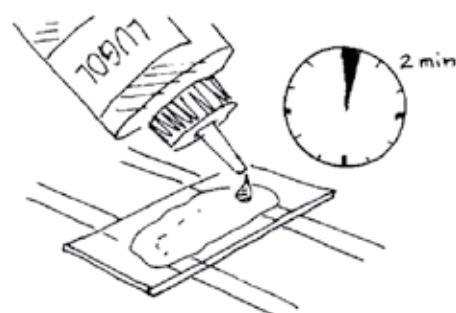
MÉTODO

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.

4. Cubrir el frotis con **solución lugol**, dejando actuar por 2 minutos.



5. Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente.
6. Cubrir el frotis con **alcohol acetona** por 1 minuto.
7. Enjuagar suavemente con agua corriente.
8. Cubrir el frotis con **solución de safranina**, por 30 segundos
9. 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

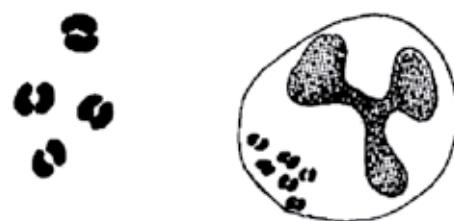
a. Cocos grampositivos de forma redonda

- ◆ 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

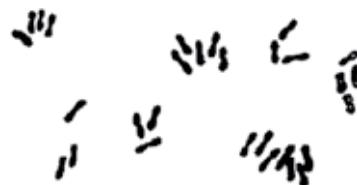
BACILOS GRAMPOSITIVOS CON ESPORAS

- ◆ 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

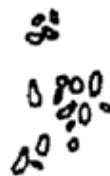
d. Bacilos gramnegativos

- ◆ 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**

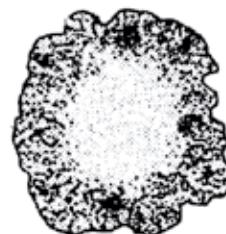
LEVADURAS

- ◆ 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.



CAPÍTULO

VIII

BACTERIOLOGÍA

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	343
Principios generales	343
Preparación de los principales medios de cultivo..	344
Métodos de siembra en medios de cultivo	355
Métodos.....	356
Lectura e Informe de una muestra cultivada	358
UROCULTIVO	361
Principios generales	361
Materiales	362
Método.....	362
Lectura e Interpretación.....	362
HEMOCULTIVOS	364
Principios generales	364
Elección del medio para hemocultivo	364
Obtención de la muestra	365
Lectura del hemocultivo.....	366
Microorganismos que se pueden encontrar en los hemocultivos.....	367
ANTIBIOGRAMAS.....	368
Principios generales	368
Método.....	368
Lectura.....	368
DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE GONORREA	370
Principios generales	370
Examen directo.....	370
Identificación presuntiva de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	375
Identificación confirmatoria de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	375
Informe	375
DIAGNÓSTICO DE <i>Yersinia pestis</i>	376
Principios generales	376
Obtención de muestras	377
Procesamiento de muestras.....	379

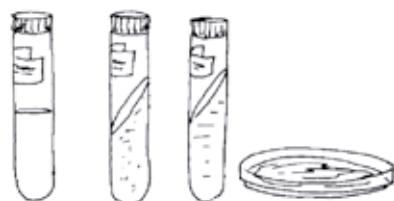
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

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.



VIII

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 reseñar 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 opalecente.

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

VIII

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 férreo	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 salmonella 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).

VIII

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	$7,2 \pm 0,2$ 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.



iATENCIÓN!

- ◆ 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

VIII

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.



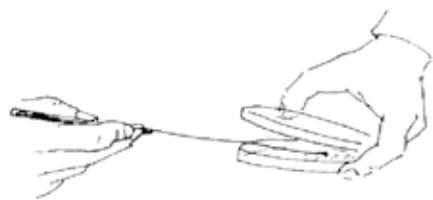
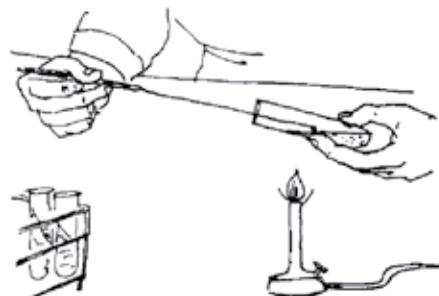
MEDIO TRANSGROW – TG

- ◆ 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.

VIII

MATERIALES

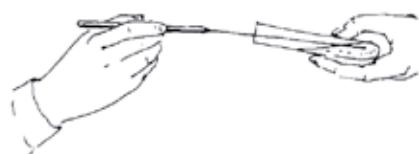
- Muestras para cultivar.
- Tubos y placas Petri con medios de cultivo
- Asas de siembra.
- Aguja de platino.
- Mechero de Bunsen.



MÉTODOS

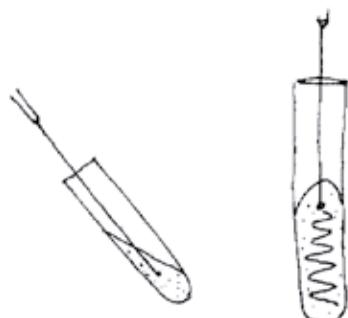
a. *Método por inoculación en medio líquido*

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.



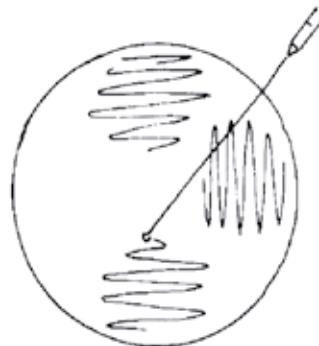
b. *Método por estría en medio sólido en tubo*

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.

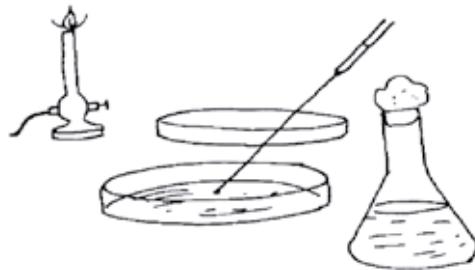
Medio	Organismo control	Reacciones esperadas
Agar Mac-Conkey	<i>Escherichia coli.</i>	Colonias rojas.
	<i>Proteus mirabilis.</i>	Colonias incoloras.
Agar Salmonella-Shigella	<i>Salmonella enteritidis.</i>	Colonias incoloras con centros rojos.
Agua peptonada(Indol)	<i>Escherichia coli.</i>	Siempre rojo (+).
	<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 inocuos (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 envío 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

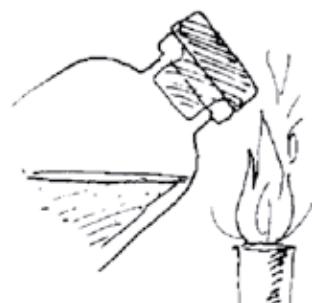
- ◆ La elección del medio depende del microorganismo que se desea aislar.
- ◆ Para la mayor parte de hemocultivos, resultan satisfactorios los medios generales:
 - Infusión corazón-cerebro con agar, este medio permite el desarrollo de bacterias tanto aerobias como anaerobias
 - El caldo de tioglicolato, 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.

VIII

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 MacConkey, 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 HEMOCULTIVOS

- *Streptococcus viridans.*
- *Streptococcus pyogenes.*
- *Staphilococcus aureus y albus.*
- *Diplococcus pneumoniae.*
- *Neisseria meningitidis.*
- *Brucella sp.*
- *Proteus-providence.*
- *Pseudomonas aeruginosa.*
- *Enterococos.*
- *Estreptococcus 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. Despues 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

- I. 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.



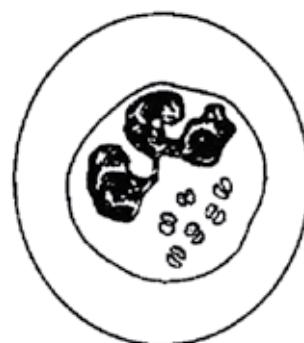
¡ATENCIÓN!

- ◆ 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.

VIII



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

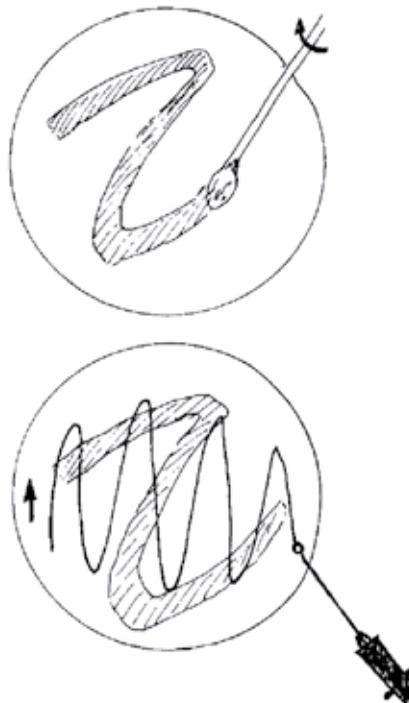
- Obtención de muestra de secreción uretral, cervical, rectal, faríngea, ocular.
- Asa bacteriológica estéril.
- Hisopo de algodón estéril.
- Tubos o placas Petri conteniendo medios de Thayer Martín modificado o agar chocolate con suplemento de crecimiento.
- Estufa a 37 °C.
- Jarra de anaerobiosis o 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**.

VIII

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

VIII

♦ 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%.

VIII

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 líquido alguno 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).

VIII

- ◆ **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 **estriá 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**.



CAPÍTULO

IX

BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

GLUCOSA EN SANGRE	383
Principios generales	383
Método de la glucosa oxidasa	383
ÚREA EN SUERO.....	385
Principios generales	385
Método de Chaney y Marbach	385
Tiras reactivas	387
CREATININA EN PLASMA O EN SUERO	388
Principios generales	388
Método.....	388
TRANSAMINASAS EN SANGRE.....	390
Principios generales	390
Método.....	390
FOSFATASA ALCALINA	393
Principios generales	393
Método.....	393
ELECTROLITOS SÉRICOS.....	395
SODIO (Na).....	395
Principios generales	395
Método.....	395
POTASIO (K)	397
Principios generales	397
Método.....	397

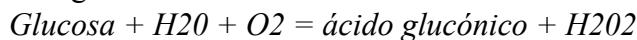


GLUCOSA EN SANGRE

PRINCIPIOS GENERALES

- ◆ La determinación 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 acceptor de oxígeno, que es convertido en un componente coloreado, cuya cantidad se lee con el espectrofotómetro.

MÉTODO DE LA GLUCOSA OXIDASA

REACTIVOS (ver Anexos)

IX

- Hidróxido de sodio 0,05 M.
- Sulfato de zinc a 110%.
- 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:


$$\text{Glucosa (mg I 100 mL)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times 200$$

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

IX

PROCEDIMIENTO

- I. 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
Reactivos 2	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Reactivos 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 centrífuga 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:

$$\text{mg de creatinina por } 100 \text{ mL} = \frac{\text{Lectura del problema}}{\text{Lectura e patrón 1}} \times 1,0$$

Utilizando el patrón 2:

$$\text{mg de creatinina por } 100 \text{ mL} = \frac{\text{Lectura del problema}}{\text{Lectura del patrón 2}} \times 3,0$$

8. Los valores normales son:

0,4 a 1,2 mg por 100 mL de plasma o suero.

TRANSAMINASAS EN SANGRE

PRINCIPIOS GENERALES

- ♦ Se incuba el suero con ácido alfa-cetoglutárico y ácido aspártico. Se forma cierta cantidad de ácido oxalacético o de ácido pirúvico, respectivamente. En medio alcalino, el cetoácido formado, da lugar a un compuesto coloreado proporcional a la cantidad de ácido presente, y refleja la actividad de transaminasa.

MÉTODO

REACTIVOS (ver Anexos)

- Buffer de fosfatos	0,1 M	pH	7,4.
- Piruvato de sodio	2 milimol.		
- Sustrato para TGO (transaminasa glutámico oxalacética).			
- Sustrato para TGP (transaminasa glutámico pirúvica).			
- Reactivo cromógeno.			
- Solución NaOH	0,4 N.		



PROCEDIMIENTO

- ♦ Es idéntica para las transaminasas oxalacética y pirúvica: **solo cambia el sustrato.**
1. Colocar 1 mL de sustrato (TGO o TGP) en un tubo de ensayo y poner en baño maría a 37 °C durante unos minutos.
 2. Añadir 0,2 mL de suero. Mezclar.

- 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

IX

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 fotocolorímetro 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 fotocolorímetro 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

IX

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. Centrífugar 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 fotocolorímetro a 430 nm poniendo a cero con agua destilada.
9. **Calcular usando la siguiente fórmula:**

$$mEq\ Na/L = \frac{Densidad\ óptica\ del\ desconocido - Densidad\ óptica\ del\ blanco}{Densidad\ óptica\ del\ testigo - Densidad\ óptica\ del\ blanco} \times 139$$

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

IX

1. En dos tubos de centrífuga 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 hirviendo hasta que el precipitado se haya disuelto por completo (más o menos 15 minutos).
- 16.** Antes que se enfrié, 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 fotocolorímetro a 660 nm poniendo a cero con agua destilada.

21. Calcular usando la siguiente fórmula:

$$mEq\ K/L = \frac{Densidad\ óptica\ del\ desconocido - Densidad\ óptica\ del\ blanco\ x\ 5,1}{Densidad\ óptica\ del\ testigo - Densidad\ óptica\ del\ blanco}$$

22. Los valores normales son:

3,6 a 5,5 mEq K/L

CAPÍTULO

X

SEROLOGÍA

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE SÍFILIS.....	403
Principios generales	403
Examen directo.....	404
Método.....	404
Examen de VDRL (prueba no treponémica).....	406
Limitaciones del examen de VDRL.....	415
Prueba de reagina plasmática rápida (RPR)(prueba no treponémica).....	415
DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)	420
Principios generales	420
DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B	425
Principios generales	425
Método.....	426
DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR HIDATIDOSIS HUMANA.....	428
Principios generales	428
TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN DE LÁTEX (AL) PARA EL DIAGNÓSTICO DE HIDATIDOSIS HUMANA	428
MÉTODOS SEROLÓGICOS EN EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS	430
Principios generales	430
Materiales para serología de Brucelosis	431
Métodos serológicos.....	432
Control de calidad de las pruebas	439
MÉTODOS SEROLÓGICOS EN EL DIAGNÓSTICO DE SALMONELOSIS.....	441
Principios generales	441
Aglutinación en placa	442
Aglutinación en tubo	444
Control de calidad de ambas pruebas	447
Limitaciones.....	447



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 **chancre 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*.

X

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.

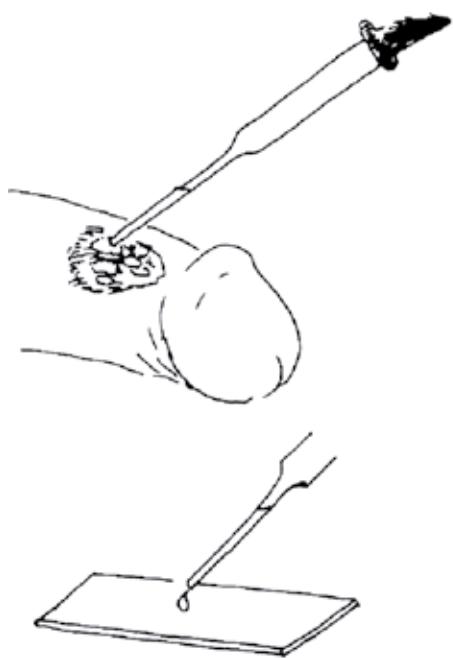


2. Raspar los bordes del chancro varias veces con la hojilla de una lanceta estéril colocada en posición plana. Evitar provocar la salida de sangre.

- 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

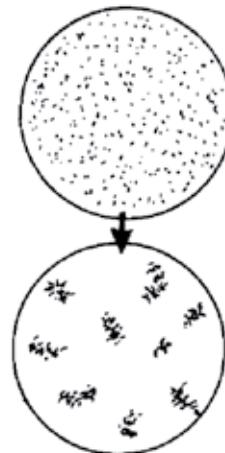
- ◆ Examinar el portaobjetos con el microscopio empleando un condensador para campo oscuro.
- ◆ Los treponemas se distinguen por sus cuerpos sumamente delgados y sus movimientos característicos, rotando alrededor de su eje longitudinal y enroscándose.

X



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 reaginas, 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 cardiolipina, 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

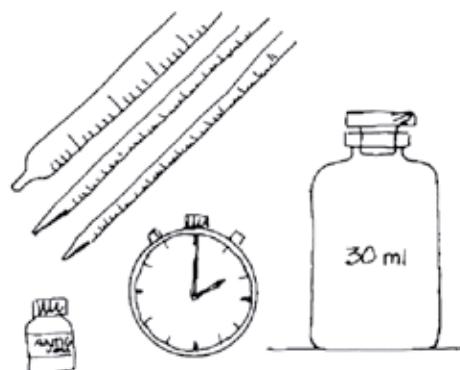
- ◆ El antígeno es una solución alcohólica que contiene cardiolipina al 0,03%, colesterol al 0,9% y lecitina al 0,21 %.
- ◆ El antígeno debe permanecer a una temperatura entre 23 a 29 °C antes de su preparación.
- ◆ Debe examinar el antígeno sosteniéndolo contra la luz. Si contiene partículas o un precipitado 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

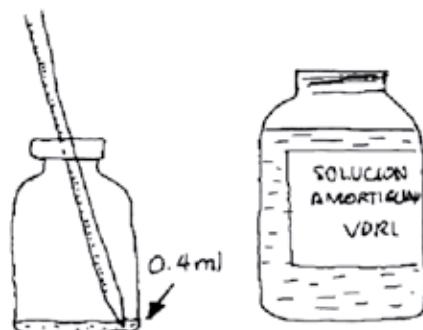
MATERIALES

- 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.

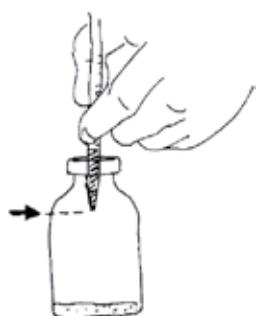


MÉTODO

1. Con una pipeta de 1 mL medir 0,4 mL de solución amortiguadora para VDRL y depositelo 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.

X

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 añada 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).

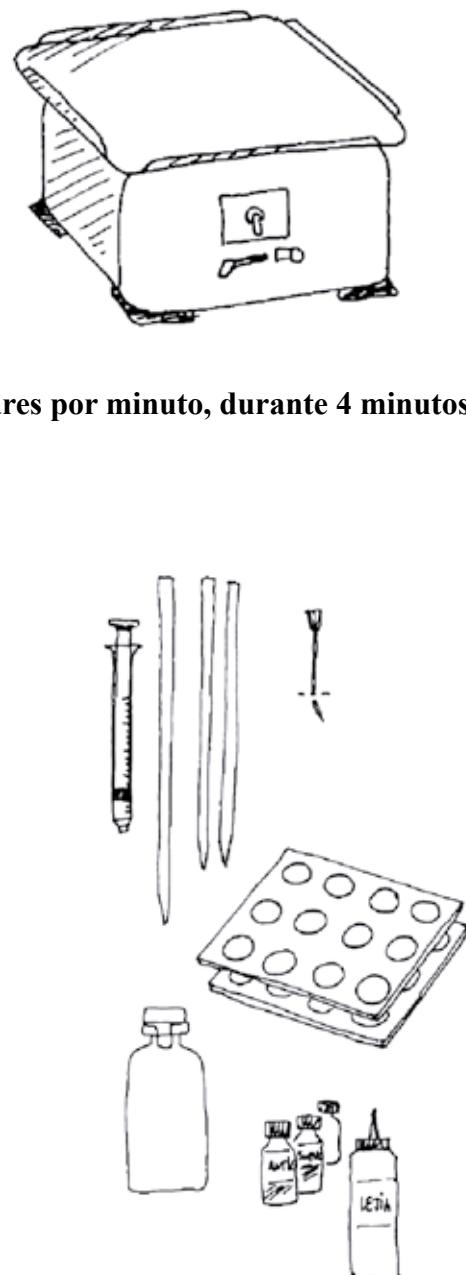
9. Antes de su uso, la solución de antígeno, debe probarse con sueros testigos cuya reacción (resultados) se ha determinado previamente.



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 µL
- Tips (1 - 100 µL).
- 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.

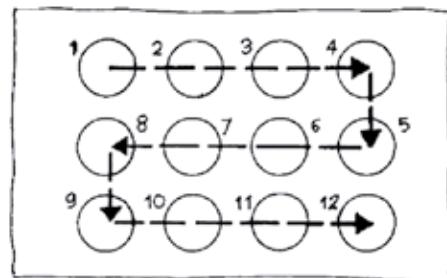


X

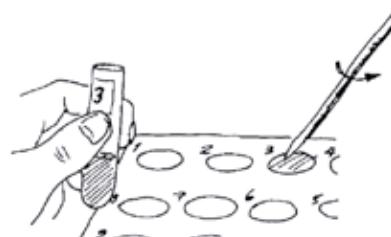
MÉTODOS

VDRL CUALITATIVA EN SUERO

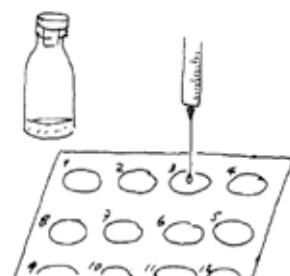
- Numerar los anillos de la lámina serológica con un lápiz graso en el orden en que indica la figura. Tomar nota de que los números de los tubos correspondan a los números de los anillos.



- Con una micropipeta colocar 50 μ L (0,05 mL) del **suero control reactivo** al anillo 1 de la lámina serológica y 50 μ L (0,05 mL) del **suero control no reactivo** al anillo 2.
- A partir del anillo 3, colocar 50 μ L (0,05 mL) de los **sueros problemas** en cada uno de los anillos de la lámina serológica.
- Añadir con una micropipeta 17 μ L (0,017 mL) de solución antigénica preparada sobre el suero contenido en cada uno de los anillos de la lámina.



- 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.

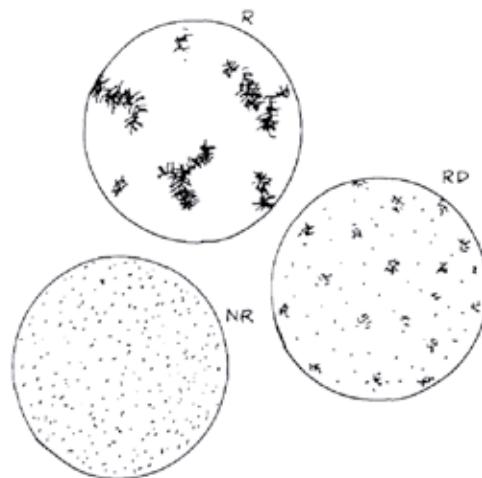


6. Colocar la lámina serológica con las muestras en un rotador a 180 RPM por 4 minutos o rotarlo manualmente (según lo indicado, ver materiales).
7. Terminada la rotación, examinar la lámina inmediatamente usando un microscopio con el objetivo de 10x y ocular de 10x.



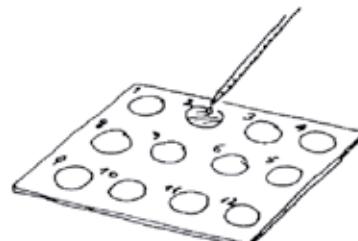
LECTURA E INFORME

- ◆ Grumos medianos o grandes = reactivo (R).
- ◆ Grumos pequeños = reactivo débil (RD).
- ◆ Sin grumos = no reactivo (NR).



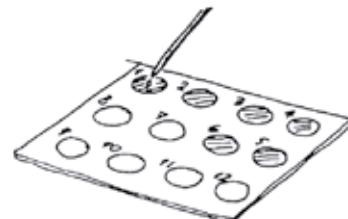
VDRL CUANTITATIVA EN SUERO

1. Colocar 50 µL (0,05 mL) de solución salina al 0,9% del anillo 2 al anillo 6 de la lámina serológica.
2. Añadir 50 µL (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 µL (0,05 mL) al anillo 3.



X

4. Mezclar el contenido del anillo 3 y transferir 50 μ L (0,05 mL) al anillo 4
5. Mezclar el contenido del anillo 4 y transferir 50 μ L (0,05 mL) al anillo 5 y así sucesivamente hasta el anillo 6.
6. Añadir con una micropipeta 17 μ L (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 μ L de solución salina 0,9% en los círculos 2, 3 y 4 de la lámina serológica.
- Añadir 50 μ L 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 débil (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	Reactiva débil 0 dils
R	NR	NR	NR	NR	NR	Reactiva 1 dils(1)
R	R	NR	NR	NR	NR	Reactiva 2 dils (1/2)
R	R	R	NR	NR	NR	Reactiva 4 dils(1/4)
R	R	R	R	NR	NR	Reactiva 8 dils(1/8)
R	R	R	R	R	NR	Reactiva 16 dils(1/16)
R	R	R	R	R	R	Reactiva 32 dils(1/32)

X

- ◆ 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 µL (0,05 mL) de LCR problema en una lámina serológica.
2. Añadir 10 µL (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 µL).
 - 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 µL

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 µL (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 µL (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 nímina 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.

X

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	Reactivó débil 0 dils
R	Rm	N	N	N	N	Reactivó 1 dils(1)
R	R	N	N	N	N	Reactivó 2 dils (1/2)
R	R	R	N	N	N	Reactivó 4 dils(1/4)
R	R	R	R	N	N	Reactivó 8 dils(1/8)
R	R	R	R	R	N	Reactivó 16 dils(1/16)
R	R	R	R	R	R	Reactivó 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.

X

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

PRINCIPIOS GENERALES

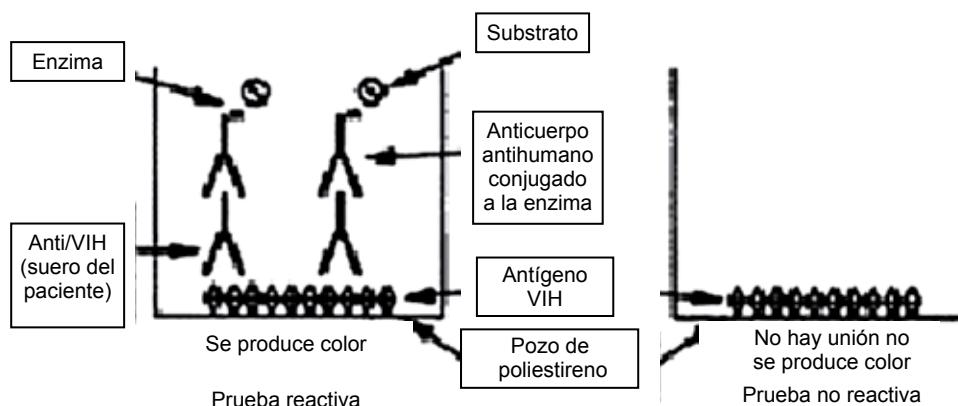
- ◆ Para hacer el diagnóstico de infección por VIH, se emplean pruebas para un **diagnóstico preliminar (tamizaje)** y **confirmatorias**, que detectan anticuerpos en muestras de sueros.
- ◆ **Las pruebas inmunológicas ligadas a enzimas (ELISA) se usan para un diagnóstico preliminar** basado en la detección 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 inmovilizado 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**.

X

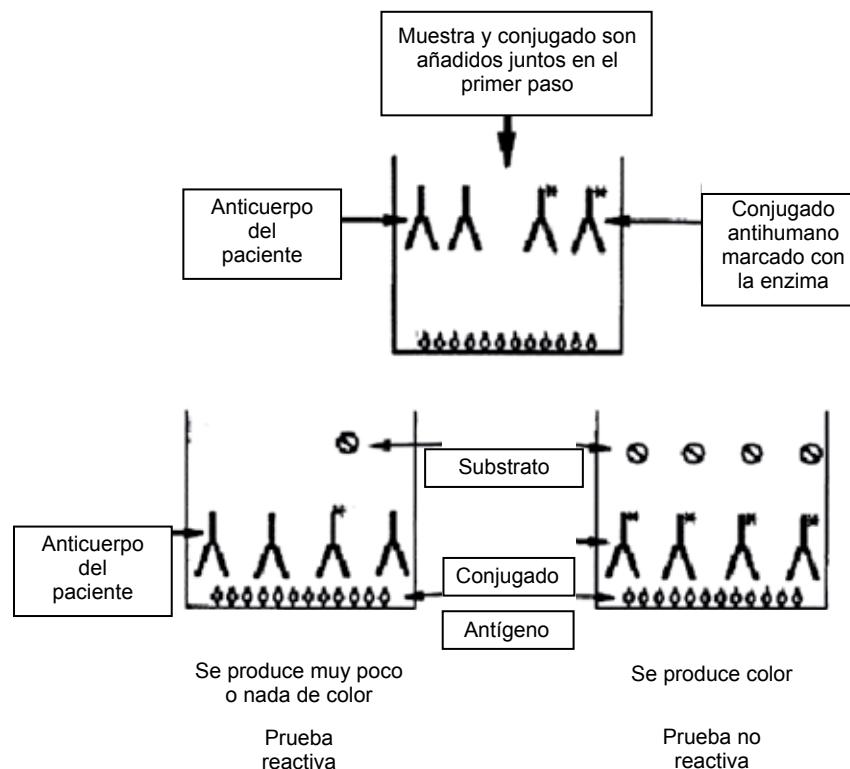
- ◆ En los casos en que se haya unido el conjugado, la reacción genera **un producto coloreado proporcional a la concentración de anticuerpos en la muestra.**
- ◆ La concentración de anticuerpos es detectada por el espectrofotómetro a una longitud de onda determinada según los procedimientos del fabricante.
- ◆ **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.





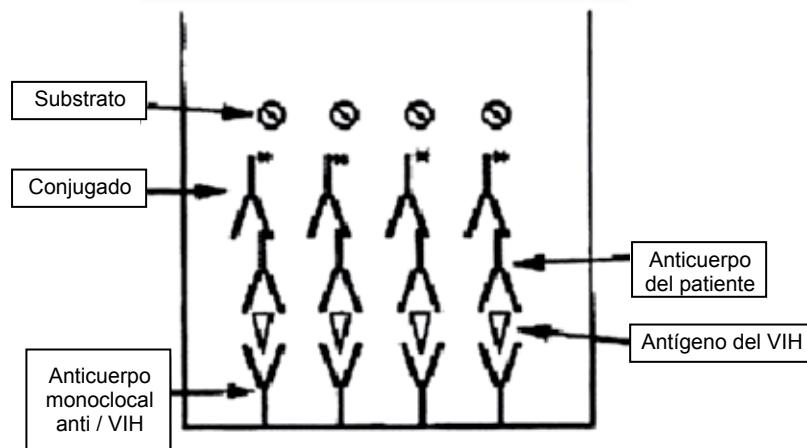
- ◆ Esto limitará la cantidad de enzima disponible para reaccionar con el substrato y **no se producirá ningún color para casos de muestras positivas con anticuerpos a VIH.**
- ◆ En contraste, **las muestras que son negativas para anticuerpos a VIH** permitirán a la gran mayoría de los anticuerpos marcados con enzima ligarse al antígeno fijado al soporte.
- ◆ Al agregar el substrato de la enzima **resultará en el desarrollo de un color similar al control negativo.**

X

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 substrato 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

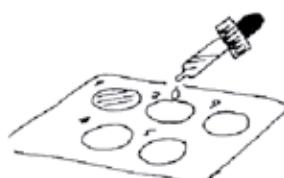
- Reactivo de látex: 1 x 2,5 mL
- Control positivo: 1 x 0,5 mL Prediluido.
- Control negativo: 1 x 0,5 mL Prediluido.
- Placas de reacción.
- Agitadores desechables.

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 µL) 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.



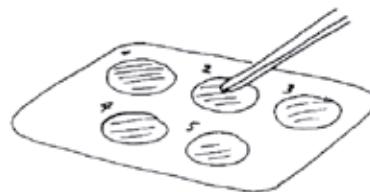
5. Colocar una gota de la **muestra sin diluir** en otro de los círculos de reacción.



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.



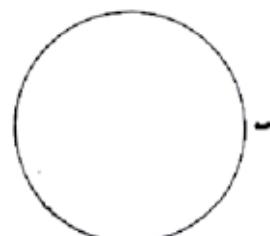
9. Balancear la placa y observar la presencia de aglutinación a los 5 minutos.

LECTURA

- ♦ De acuerdo con los siguientes patrones de aglutinación:

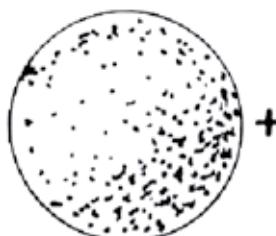
- **HBsAg negativo**

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 mondadienes.

PROCEDIMIENTO

1. En una placa de aglutinación, colocar en uno de los círculos 20 µL de partículas de látex sensibilizadas, más 20 µL de suero problema.
2. En una placa de aglutinación, colocar en uno de los círculos 20 µL de partículas de látex sensibilizadas, más 20 µL del suero control positivo.
3. En una placa de aglutinación, colocar en uno de los círculos 20 µL de partículas de látex sensibilizadas, más 20 µL del suero control negativo.
4. Mezclar con ayuda de distintos palitos mondadienes 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

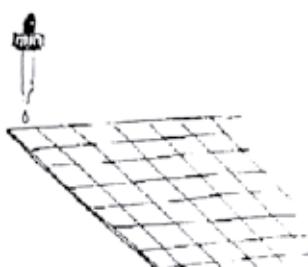
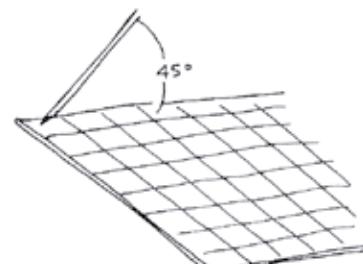
- ◆ Es una prueba de diagnóstico rápida, muy usada; sin embargo, los resultados pueden variar cuando los antígenos empleados son de mala calidad o la técnica no es la correcta.
- ◆ Se utiliza el antígeno preparado con *Brucella abortus*.
- ◆ Con esta prueba se detecta la presencia tanto de inmunoglobulina 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

X

- I. 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-Mercaptoetanol.
- ◆ 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.

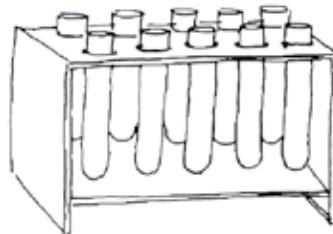
MATERIALES

- 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).



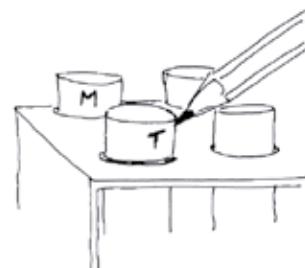
MÉTODO

1. Colocar dos hileras de 5 tubos de 13 x 100 mm en una gradilla por cada muestra de suero.



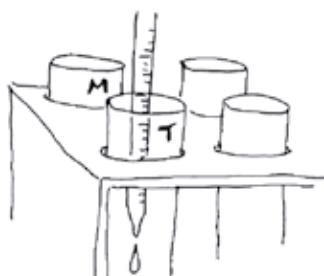
2. Identificar el primer tubo de cada hilera con el número correspondiente al suero problema.

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.

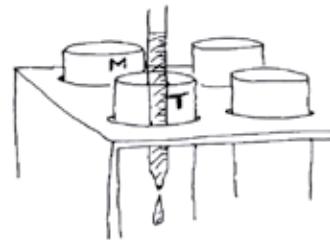
Utilizando el mismo procedimiento, echar 0,04 mL de suero en el segundo tubo, 0,02 mL en el tercero, 0,01 mL en el cuarto y 0,005 mL en el quinto tubo.



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 rumos.
- ♦ 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

X

- ♦ 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.

X

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

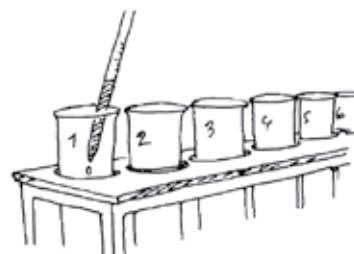
- ◆ En esta prueba, el suero del paciente se diluye de manera seriada en tubos de ensayo.

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 MWaria.
- 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

CAPÍTULO

XI

RED DE LABORATORIOS

RED DE LABORATORIOS	451
OBJETIVOS	451
UBICACIÓN DE LOS LABORATORIOS DE LA RED SEGÚN NIVEL DE COMPLEJIDAD	452
Unidades tomadoras de muestra	452
Laboratorios locales	452
Laboratorios intermedios	453
Laboratorio de referencia regional	453
Laboratorio de referencia nacional	454
CONTROL DE CALIDAD EXTERNO	455
Principios generales	455
Control de calidad externo para enfermedades de importancia epidemiológica	463
ENVÍO DE MUESTRAS	463
Principios generales	463
Tipos de muestras que se envían.....	464
Procedimiento de envío de muestras	464
PROCEDIMIENTOS PARA ENVÍO DE MUESTRAS DE SUERO	467
Materiales	467
Obtención y envío del suero.....	449
PROCEDIMIENTOS PARA ENVÍO DE HECES PARA LA DETECCIÓN DE PARÁSITOS	470
Métodos.....	471
PROCEDIMIENTOS PARA ENVÍO DE HECES PARA EXAMEN BACTERIOLÓGICO	473
Siembra y envío de muestras.....	473
PROCEDIMIENTOS PARA ENVÍO DE SECRECIÓN URETRAL.....	474
Materiales	474
Siembra y envío de muestras.....	474
REGISTRO DE LAS MUESTRAS, REGISTRO DEL LABORATORIO E INFORMES DIARIOS Y MENSUALES	477
Principios generales	477
Numeración de muestras	477
Los registros del laboratorio	478
Los informes diario y mensual.....	478

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 trasmisibles 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 distintos 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 BACILOSCOPIAS (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 límite predeterminado y no calculando el porcentaje de errores.

b. Control de calidad externo de medios de cultivo para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis

Evalua 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

- I. 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.



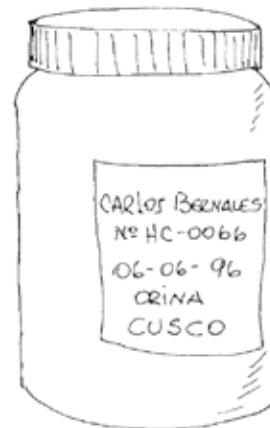
- Una envoltura exterior para proteger el recipiente secundario de las influencias exteriores durante el transporte (por ejemplo: deterioro físico y agua). **De no contar con este envase** se puede adaptar envases de plástico de cierre hermético, cajas de cartón, etc.

¡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.

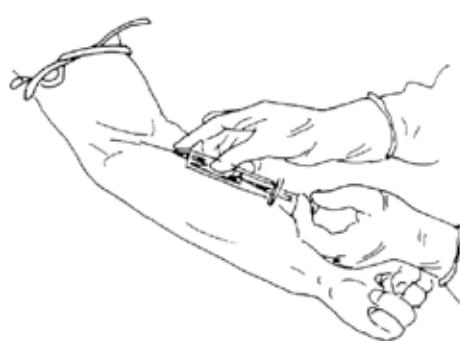
MATERIALES

- 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.



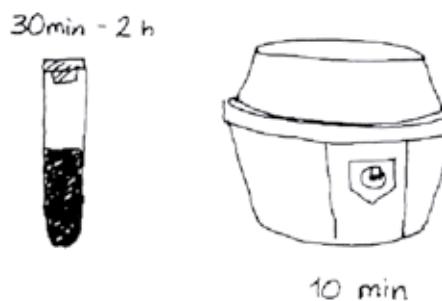
OBTENCIÓN Y ENVÍO DEL SUERO

- 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.

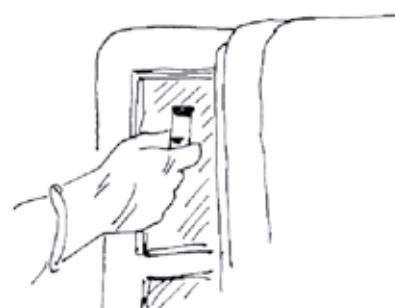


XI

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.



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 disagregar 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.



XI

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.

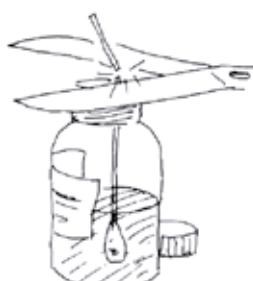
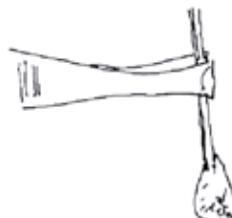
- 4.** Esta preparación se conserva hasta 3 días, sin embargo, es conveniente que se envíe cuanto antes.

- 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.



XII

CAPÍTULO

ANEXOS

ANTICOAGULANTES	481
EDTA	481
Heparina	481
Anticoagulante de Wintrobe	482
Citrato de sodio	482
Precauciones al usar anticoagulantes.....	482
REACTIVOS Y SOLUCIONES	483
Agar sangre al 6%	483
Agua amortiguada	483
APV (alcohol polivinílico)	483
Caldo infusión cerebro corazón (BHI)	484
Cary y Blair, medio de transporte	484
Drabkin, para dilución	485
Fenol acuoso al 5%	486
Formaldehído, solución al 10%	486
Formol	486
Hidróxido de potasio 10%.....	486
Giemsa, colorante	486
Glemsa diluido, colorante	487
Bluffer fosfato	487
Leishman, colorante	487
Lugol (solución yodo - yodurada)	488
Medio bifásico Usmaru (NNN modificado)	488
MIF (merthiolate - Iodine - formol)	489
NNN, medio de cultivo	490
Preparación de los reactivos para la tinción Gram	490
Preparación de los reactivos para la tinción Ziehl y Neelsen	491
Prueba de identificación de carbohidratos para <i>neisseeria gonorrhoeae</i>	492
Prueba de la oxidasa	493
Prueba de superoxol	493
Reactivos usados para el método de la glucosa oxidasa	494
Reactivos usados para medir creatinina en plasma o suero	494
Reactivos usados para medir fosfatasa alcalina ...	495
Reactivos usados para medir potasio en sangre ..	496
Reactivos usados para medir sodio en sangre ..	499
Reactivos usados para medir transaminasas en sangre	500
Reactivos usados para medir úrea en sangre ..	501
Solución amortiguadora para VDRL	502
Solución amortiguadora tamponada	503
Solución de citrato trisódico (38 g/L) (3,8%)	503
Solución de citrato y formaldehído	503
Solución de cloruro de sodio (0,85%) (solución salina isotónica)	503
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
RECOMENDACIONES SOBRE LA CONDUCTA ANTE LA EXPOSICIÓN LABORAL A LA SANGRE U OTRAS SUSTANCIAS O MATERIALES	509
POTENCIALMENTE CONTAMINADOS	509
ALMACENAMIENTO DE SUSTANCIAS QUÍMICAS	511
Principios generales	511
Incompatibilidades de almacenamiento de sustancias peligrosas	513
ESQUEMA DE INOCULACIÓN Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS QUE PROVOCAN DIARREA	515
ESQUEMA DE CONIDIOS	516
IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO SHIGELLA	517
IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i>	517
USO DE DISCOS PARA ANTIBIOPRAGMAS	518
RED DE LABORATORIOS	519
FLUXOGRAMA DE MUESTRAS	519
RED DE LABORATORIOS	520
FLUXOGRAMA DE RESULTADOS	520
REGISTROS DE LOS CONTROLES POR ENVIÓ DE PANELES DE FROTIS	521
REGISTRO DE EVALUACIÓN DE LA RELECTURA DOBLE CIEGO	522
FORMATO DE RELACIÓN TOTAL DE LÁMINAS ENVIADAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DEL DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE MALARIA	523
REGISTRO DE LA CALIDAD TÉCNICA DE GOTAS GRUESAS Y FROTIS DE LAS LÁMINAS EVALUADAS	524
HOJA DE INFORME MENSUAL DE LABORATORIO	525
BIBLIOGRAFÍA	527
GLOSARIO	534
ÍNDICE ALFABÉTICO	536
ILUSTRACIONES EN COLOR	543
Glóbulos rojos o eritrocitos	543
Glóbulos blancos o leucocitos	544
<i>Plasmodium vivax</i> (frotis)	545
<i>Plasmodium ovale</i> (frotis)	545
<i>Plasmodium falciparum</i> (frotis)	546
<i>Plasmodium malariae</i> (frotis)	546
<i>Plasmodium vivax</i> (gota gruesa)	547
<i>Plasmodium falciparum</i> (gota gruesa)	547
Preparación de heces en fresco	548
<i>Entamoeba histolytica</i>	548
<i>Entamoeba coli</i>	549
<i>Endolimax nana</i>	549
<i>Giardia lamblia</i>	550
Frotis de heces – hematoxilina	550
Mycobacterium tuberculosis	551
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	551
Helmintos	552
Huevos de fasciola hepática	552
Huevos de helmintos	553
Huevos de áscaris lumbricoides	553
Estructuras que se confunden con huevos y/o larvas de parásitos	554

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 anhídrico (Na₂HP04) 4 g
- Ortofosfato monopotásico (KH₂P04) 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.
Aregar 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 calentarla 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 stock (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 (<chem>Na2HP04</chem>)	6	g
-	Fosfato monobásico de potasio (<chem>KH2P04</chem>)	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 stock 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 mezclar 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

- I. 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

- I. 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 punción 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

- I. 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

- I. 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 YPOTASIO

- K2S04	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 utilizado.

REACTIVO DE FOLIN-CIOTALTEU

- 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 enfriá, 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-CIOTALTEU 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-aspártico	2,66	g
- Acido alfa-cetoglutárico	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-cetoglutárico	30	mg
- NaOH IN	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 HC1 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 (Reáctivo 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 (Reactiv 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
-	H2S04 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 (Na2HP04) anhidro	0,093	g
-	Fosfato monopotásico (KH2P04)	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 (Na2HP042H2O) 3,76 g
 - Fosfato de potasio dihidrogenado (KH2P04) 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 anhídrico (bebédrato 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 (ZnSO4.7H2O) 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								
APELLOS 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(#) TIPO DE TRABAJADOR 01 Empleado 02 Funcionario 03 Jefe de Planta 04 Capataz 05 Técnico 06 Operario 07 Agricultor 00 Otros	20 Contacto con materias calientes o incandescentes 21 Contacto con frío 22 Contacto con calor 23 Explosión o implosión 24 Incendio 25 Atropellamiento por animales 26 Mordedura de animales 27 Choque de vehículos 28 Atropellamiento por vehículos 29 Falla en mecanismos para trabajos hiperbáricos 30 Agresión con armas 00 Otros	009 Cara (ubicación no clasificada en otro) 010 Nariz y senos paranasales 012 Aparato auditivo 015 Cabeza, ubicaciones múltiples 016 Cuello 020 Región cervical 021 Región dorsal 022 Región lumbosacra (columna vertebral y muscular adyacentes) 023 Tórax (costillas, esternón) 024 Abdomen (pared abdominal) 025 Pelvis 029 Tronco, ubicaciones múltiples 030 Hombro (inclusión de clavículas, omoplato y Axila)
TABLA 2(+) ACTIVIDAD ECONÓMICA DE LA EMPRESA ADAPTACIÓN DEL CIU, NORMAS EN AGRICULTURA (CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL INDUSTRIAL UNIFORME Y NORMAS EN AGRICULTURA)	TABLA 4(a) AGENTE CAUSANTE PARTES DE LA EDIFICACIÓN	Instalaciones Complementarias
122 Extracción de madera 130 Pesca 210 Explotación de minas de carbón 220 Producción de petróleo crudo y gas mineral 230 Extracción de minerales metálicos 290 Extracción de otros minerales 314 Industrias de tabaco 321 Fabricación de textiles 322 Industrias de cuero y productos de cuero y sucedáneos del cuero 331 Industrias de la madera y productos de madera y corcho 351 Fabricación de sustancias químicas industriales 352 Fabricación de otros productos químicos 353 Refinerías de petróleo 354 Fabricación de productos derivados del petróleo y del carbón 356 Fabricación de productos plásticos 362 Fabricación de vidrio y productos de vidrio 369 Fabricación de otros productos minerales no metálicos 371 Industria básica de hierro y acero 372 Industrias básicas de metales no ferrosos 381 Fabricación de productos metálicos 382 Construcción de maquinarias 410 Electricidad, gas y vapor 500 Construcción 713 Transporte aéreo 920 Servicios de saneamiento y similares	01 Piso 02 Paredes 03 Techo 04 Escalera 05 Rampas 06 Pasarelas 07 Aberturas, puertas, portones. Persianas 08 Ventanas 10 Tubos de ventilación 11 Líneas de gas 12 Líneas de aire 13 Líneas o cañerías de agua 14 Cableado de electricidad 15 Líneas o cañerías de materias primas o productos 16 Líneas o cañerías de desagües 17 Rejillas 18 Estanterías 30 Electricidad 31 Vehículos o medios de transporte en general 32 Maquinas y equipos en general 33 Herramientas (portátiles, manuales, mecánicos, eléctricas, neumáticas, etc. 34 Aparatos para izar o medios de elevación 76 Onda expansiva 40 Matrices 42 Bancos de Trabajo 43 Recipientes 44 Andamios 46 Escritorios 47 Asientos en general 48 Muebles en general 49 Productos elaborados	031 Brazo 032 Codo 033 Antebrazo 034 Muñeca 035 Mano (con excepción de los dedos solos) 036 Dedos de las manos 039 Miembro superior, ubicaciones múltiples 040 Cadera 041 Muslo 042 Rodilla 043 Pierna 044 Tobillo 045 Pie (con excepción de los dedos) 046 Dedos de los pies 049 Miembro inferior, ubicaciones múltiples 050 Aparato cardiovascular en general 070 Aparato respiratorio en general 080 Aparato digestivo en general 100 Sistema nervioso en general 133 Mamas 134 Aparato genital en general 135 Aparato urinario en general 140 Sistema hematopoyético en general 150 Sistema endocrino en general 160 Pie (solo afecciones dérmicas) 180 Aparato psíquico en general 181 Ubicaciones múltiples compromisos de dos o mas zonas afectadas especificadas en la tabla 182 Órgano, aparato o sistema afectado por sustancia químicas 000 Otros

Procedimientos de Laboratorio

TABLA 1(#)	Otros factores externos e internos al ambiente de trabajo	TABLA 6(º) NATURALEZA DE LA LESIÓN
933 Servicios médicos y odontológicos, otros servicios de sanidad veterinaria 000 Otras actividades no especificadas Por ejemplo Agrícolas	70 Animales 77 Factores climáticos 79 Arma blanca 80 Arma de fuego 81 Sustancias químicas – plaguicidas 00 Otros	01 Escoriaciones 02 Heridas punzantes 04 Heridas contusas (por golpes o de bordes Irregulares 05 Herida de bala 06 Perdida de tejidos 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 Enucleacion (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 02 Caída de personas de altura 03 Caída de persona al agua 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	001 Región craneana (cráneo, cuero cabelludo) 002 Ojos (con inclusión de los párpados, la órbita y el nervio óptico 008 Boca (con inclusión de labios, dientes y lengua)	



RECOMENDACIONES SOBRE LA CONDUCTA ANTE LA EXPOSICIÓN LABORAL A LA SANGRE U OTRAS SUSTANCIAS O MATERIALES POTENCIALMENTE CONTAMINADOS

Fuente: Revista Panamericana de Salud Pública / 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 está 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 retrovírico 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 alfabetico 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

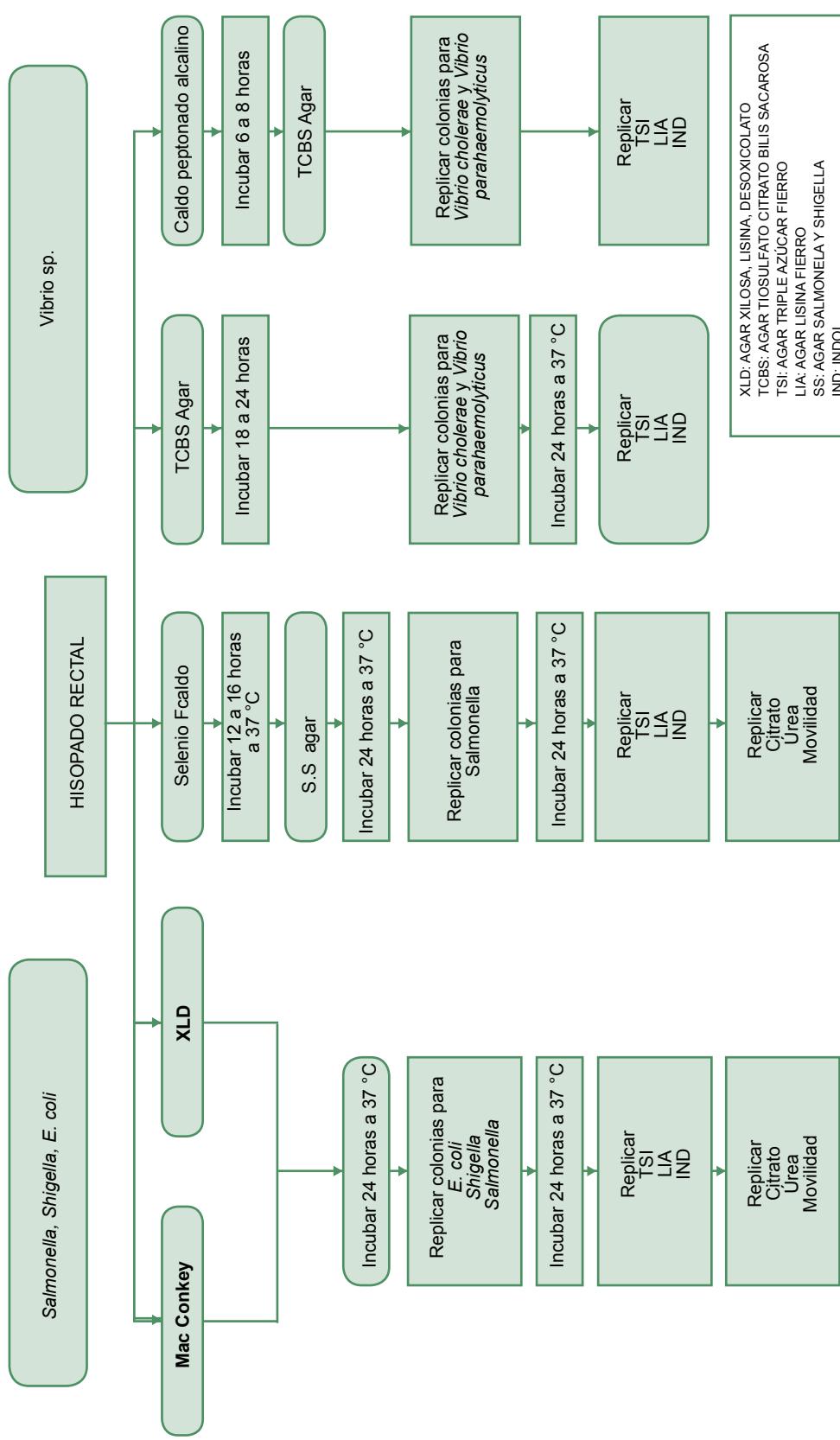
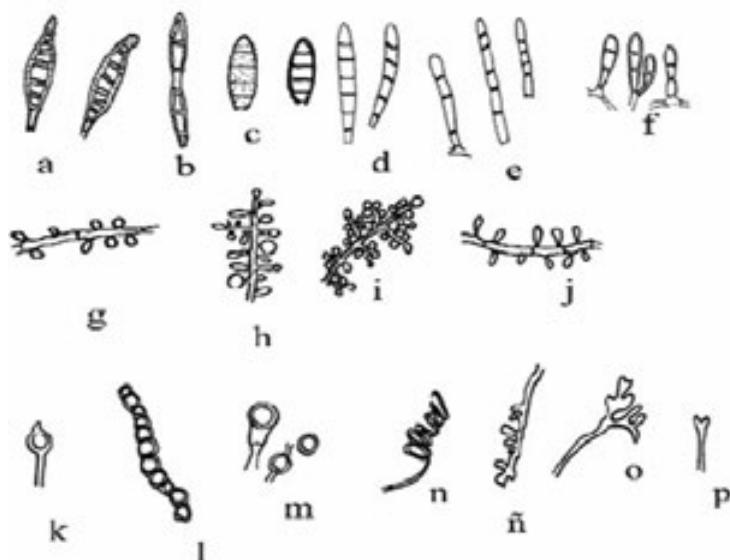


Figura 1.3: ESQUEMA DE CONIDIOS

Diferentes tipos de macroconidios (a-f), microconidios (g-j), clamidosporas (k-m) e hifas (n-p) (consultar clave taxonómicas).



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

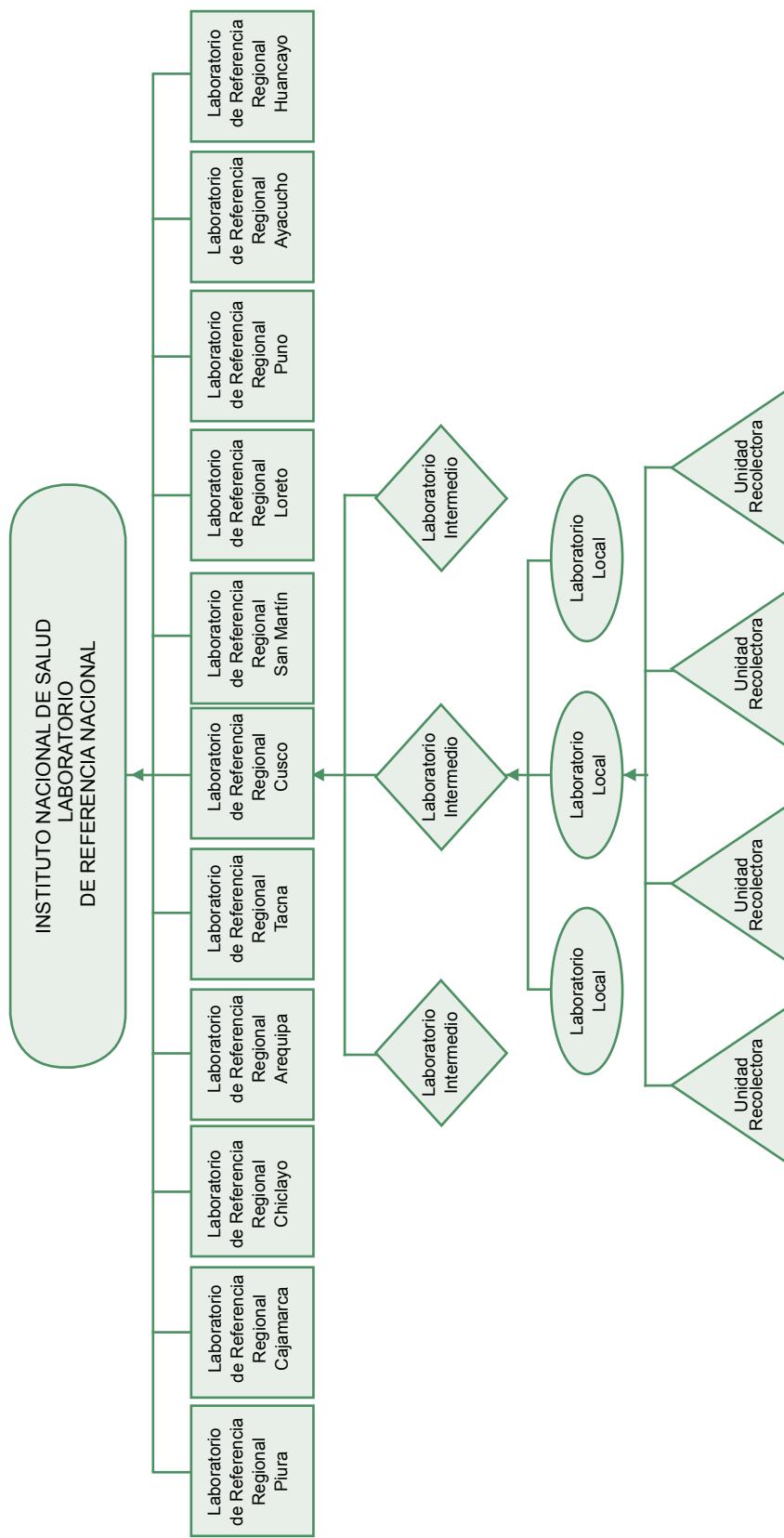
USO DE DISCOS PARA ANTIBIOGRAMAS

ANTIBIÓTICOS PARA BACTERIAS GRAMNEGATIVAS				
	Símbolo del disco	Resistente (mm)	Intermedio (mm)	Susceptible (mm)
Amikacina	AN	14	15 - 16	17
Carbencilina (solo para pseudomonas)	CB	13	14 - 16	17
Cloramfenicol	C	12	13 - 17	18
Climdamicina(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

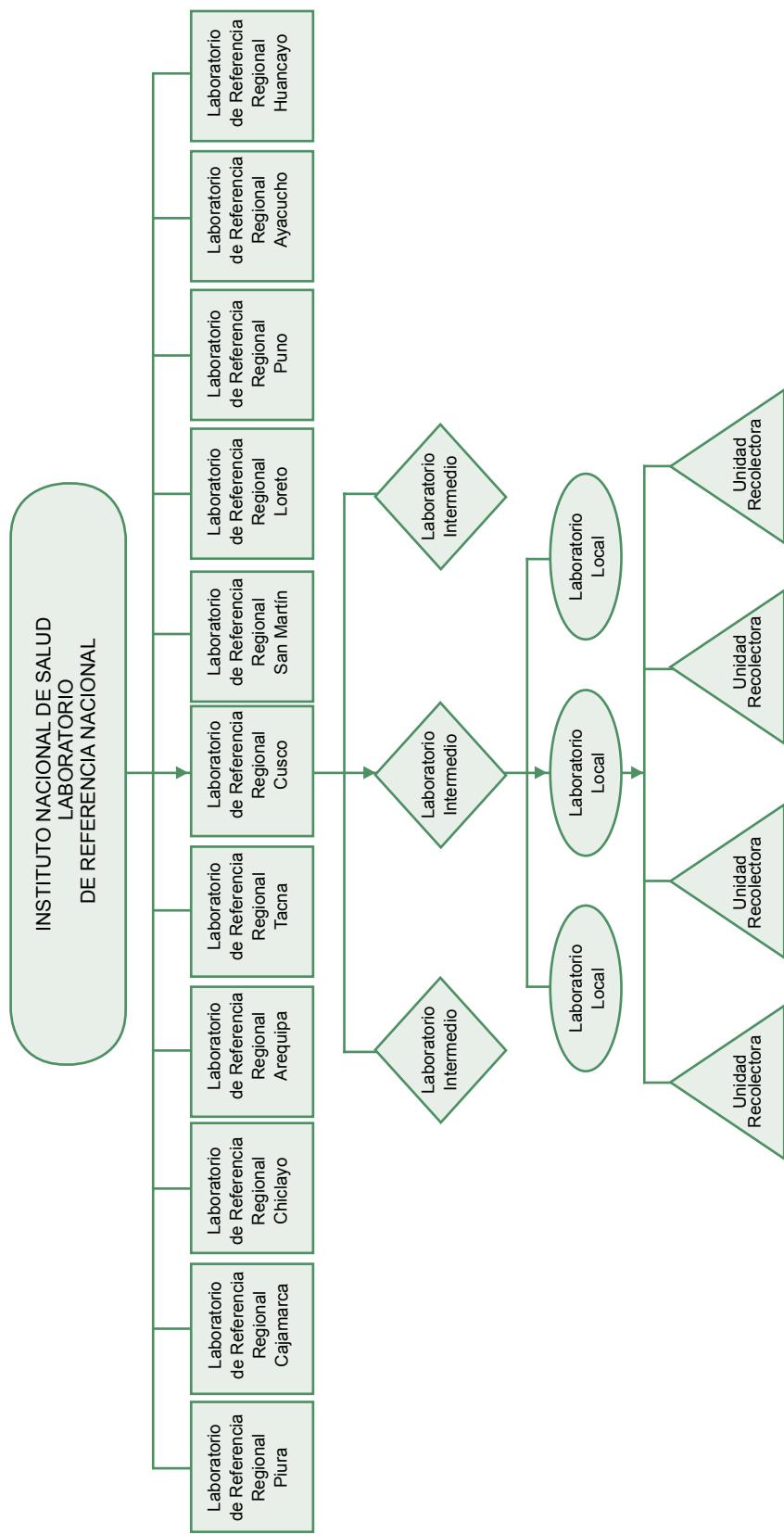
ANTIBIÓTICOS PARA BACTERIAS GRAMPOSITIVAS				
	Símbolo del disco	Resistente (mm)	Intermedio (mm)	Susceptible (mm)
Cefalotina	CL	14	15 - 17	18
Dicloxacilina	DCX	9	10 - 14	15
Eritromicina	E	13	14 - 17	18
Tetraciclina	TE	14	15 - 18	19
Rifampicina(*)	RA	16	17 - 19	20
Penicilina	P	20	21 - 28	29
Oxacilina	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 PANELS 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°	LOTÉ N°	RESULTADO ESPERADO	RESULTADOS DE LOS INTERMEDIOS O REGIONALES										OBSERVACIONES
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													



PROCEDIMIENTOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DE BACILOSCOPIA
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS
PARA EL DIAGNÓSTICO

REGISTRO DE EVALUACIÓN DE LA RELECTURA DOBLE CIEGO

ESTABLECIMIENTO DE SALUD:

DISADRESA:

Referencias

Fecha de recepción:

Período de la colección

1er Evaluador:

Tamaño:
A= Adecuado
NA= No Adecuado

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
LABORATORIO REFERENCIAL NACIONAL DE MALARIA

**FORMATO DE RELACIÓN TOTAL DE LAMINAS ENVIADAS PARA
EL CONTROL DE CALIDAD DEL DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO
DE MALARIA**

Laboratorio:

Microscopista:

Fecha:

Mes evaluado

Trimestre evaluado



MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
LABORATORIO REFERENCIAL NACIONAL DE MALARIA

REGISTRO DE LA CALIDAD TÉCNICA DE GOTA GRUESA Y FROTIS DE LAS LÁMINAS EVALUADAS

Laboratorio Evaluador: Microscopista:

Dee Performance: Trimaster/Mast; Echoes do I hear.... Echoes do Emision:

HOJA DE INFORME MENSUAL DE LABORATORIO

Establecimiento:	Código:	Pruebas de Laboratorio	Mes/Período												Responsable de Laboratorio						Pág. 1
			Costo Unitario	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
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 espuma																				
17	Bk en orina																				
18	Parasitológico (por concentración)																				
19	Examen directo de heces																				
20	Graham																				
21	Gota Gótesa																				
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 Secretiones																				
30	Cultivo de Bk																				
31	Proteínas séricas																				
32	Bilirrubinas																				
33	Fosfatasa Alcalina																				
34	Glicemia																				
35	Urea sérica																				
36	Creatinina sérica																				
37	Transaminases séricas																				
38	Electrolitos séricos																				
39	Proteínas en orina																				
40	Papanicolaú																				
	Total Exonerado																				
	Total Ingreso																				

HOJA DE INFORME MENSUAL DE LABORATORIO

Código:	Pruebas de Laboratorio	Costo Unitario	Nº Acum.	Costo Parcial	Mes/ Periodo												Responsable de Laboratorio	Pág. 2	
					16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
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 Brucela																		
12	Oína completa																		
13	Sedimento urinario																		
14	Examen directo de secreciones																		
15	Gram de secreciones																		
16	Bk en espúlio																		
17	Bk en orina																		
18	Parasitológico (por concentración)																		
19	Examen directo de heces																		
20	Gramam																		
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 Leishmaniasis																		
27	Hemicultivo																		
28	Urocultivo																		
29	Cultivo de Secreciones																		
30	Cultivo de Bk																		
31	Proteínas séricas																		
32	Bilirrubinas																		
33	Fosfatasa Alcalina																		
34	Glicemia																		
35	Urea sérica																		
36	Creatimina sérica																		
37	Transaminases séricas																		
38	Electrolitos séricos																		
39	Proteínas en orina																		
40	Papanicolaou																		
Total Exonerado																			Costo Total
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 Grafia 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 Grafia 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 CLINICOS***
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 (1)

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. **MANUALDIFCO: 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.

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.

C.S.P

"Cantidad suficiente para...".

MATRACES Y ERLENMEYER

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.

EMBUDOS

Pueden ser de vidrio, porcelana o plástico. Se usan para transvasar líquidos en frascos de boca angosta. Existen de diferentes tamaños.

MECHEROS DE BUNSEN

Son de metal con una tuerca movediza en su extremo, para medir la intensidad de la llama.

FIOLAS

Recipientes para cantidades de medidas exactas. Se emplean en la preparación de reactivos y soluciones de concentraciones conocidas.

PERLAS DE VIDRIO

De 4 - 6 mm de diámetro. Se emplean para desfibrinar sangre y pulverizar en la preparación de antígenos.

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.

PIPETAS

Son usadas para medidas de líquidos en pequeños volúmenes.

MANGOS DE KOLLE

Están hechos de metal con una cubierta de

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
Esputo
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 oxidas a, 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

Hemoglobinómetro 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, Leishmania,
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 - Formalin), 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
Leishmania, 293
Necator americanus, 250, 252
Plasmodium vivax, 287, 285
Plasmodium falciptera, 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

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

Y

Yersinia pestis

obtención de muestra, 363
procesamiento de muestra, 365
Yodopolividona, 33

U

Úrea

método de Chaney y Marbach, 372

Urocultivo

método, 348
lectura e interpretación, 348

Z

Ziehl y Neelsen

reactivos, preparación, 474

V

Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ELISA indirecto, 407
ELISA competitivo, 408
ELISA con antígeno de captura, 410

Virus de la hepatitis B

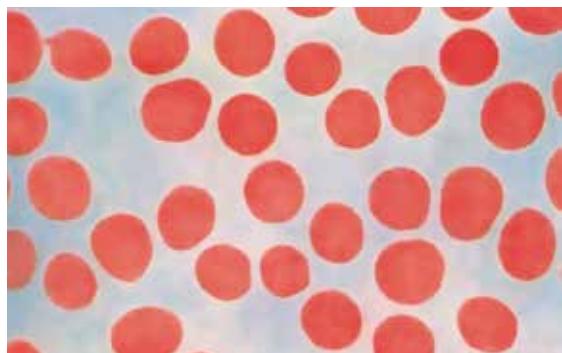
test de látex, 411

W

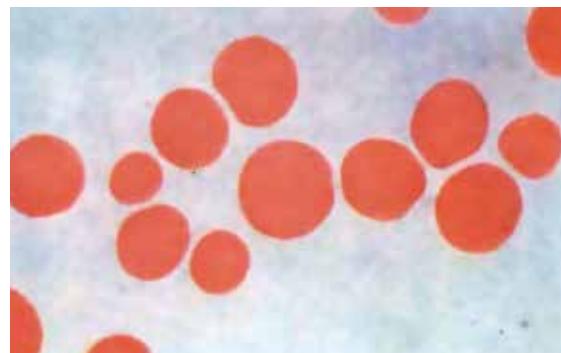
Wintrobe, anticoagulante, 466

Wright, colorante, 488

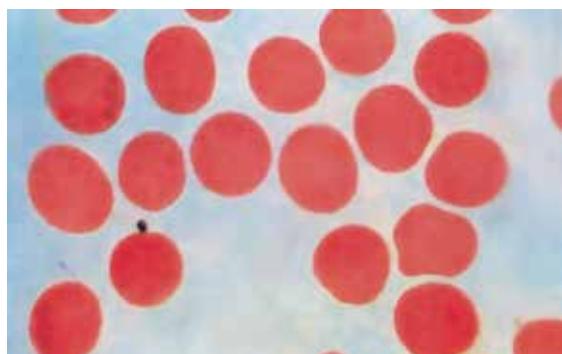
GLÓBULOS ROJOS O ERITROCITOS



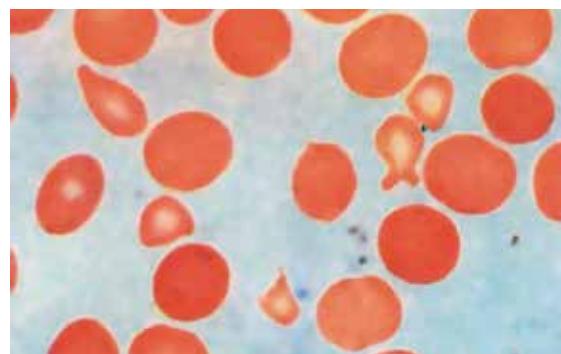
A



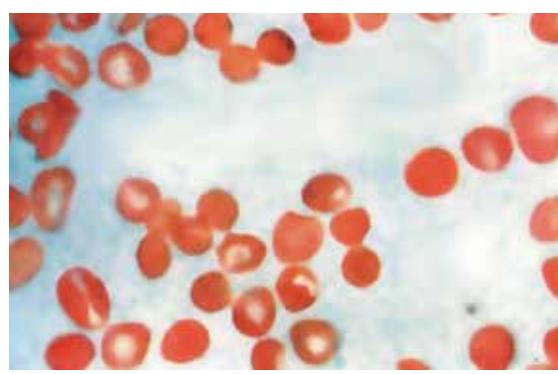
B



C



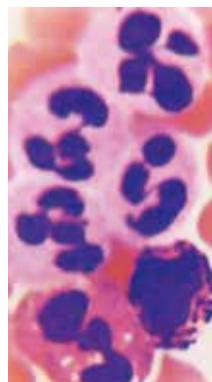
D



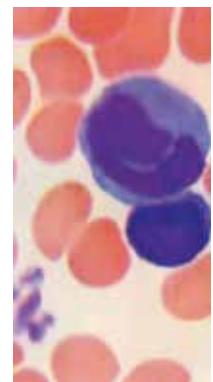
E

-
- A Normocitos
 - B Megalocitos
 - C Anisocitos
 - D Poiquilocitos
 - E Microcitos

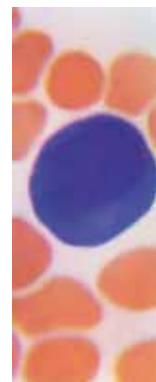
GLÓBULOS BLANCOS O LEUCOCITOS



A



B



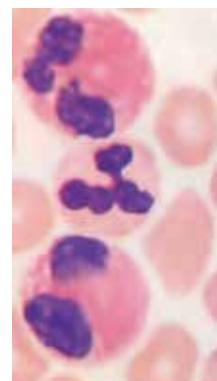
C



D



E



F



G



H



I



J

Basófilos: A, D, E

Eosinófilos: A, F

Neutrófilos: A, D, E, F, G

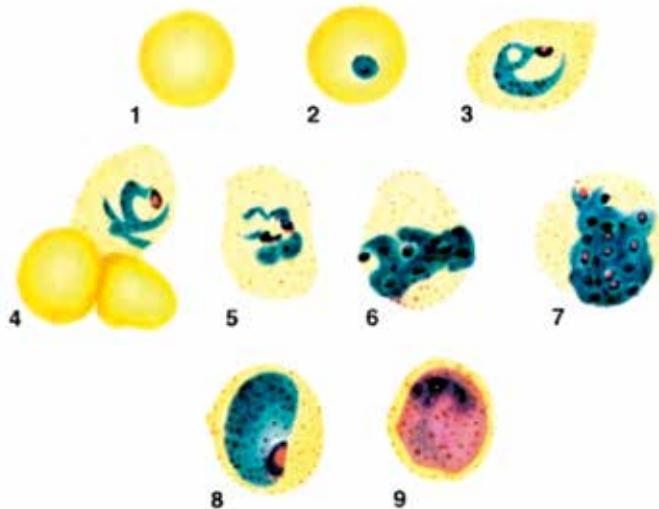
Plaquetas: B

Monocitos: B, G, H

Linfocitos: A, F

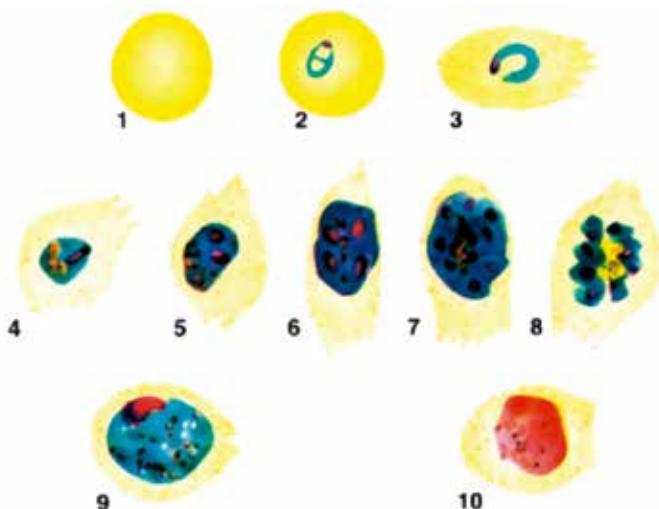
Plasmocitos: C, H, I

Plasmodium vivax **(Frotis)**



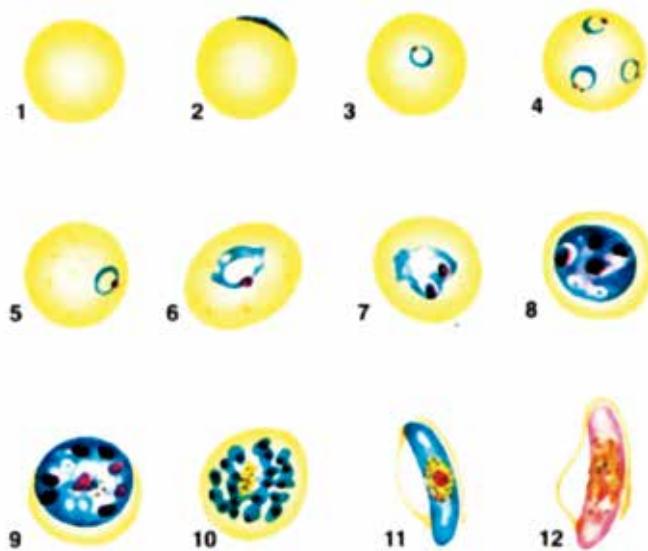
- 1 Eritrocito
- 2 Trofozoito joven
- 3 Trofozoito maduro en Eritrocito aumentado de tamaño. Gránulos de Schüffner marcados.
- 4 División de la Cromatina
- 5,6 Esquizonte joven
- 7 Esquizonte maduro
- 8 Gametocito(hembra)
- 9 Gametocito(macho). Cromatina difusa

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).

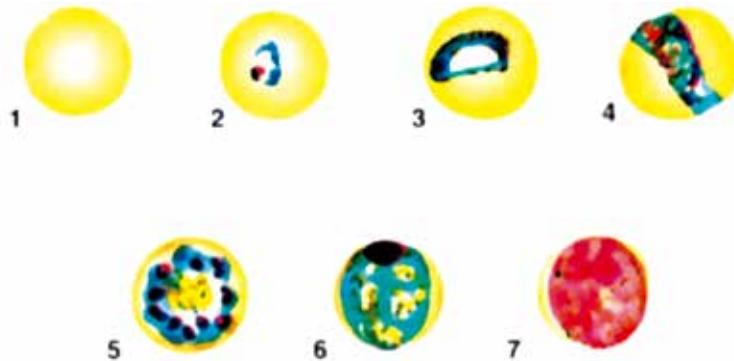
Plasmodium falciparum **(Frotis)**



- 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)**



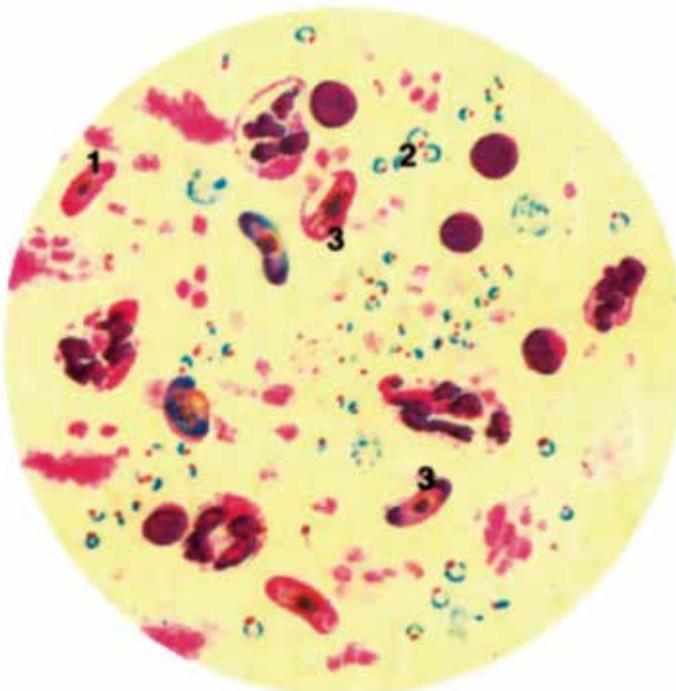
- 1 Eritrocito
- 2 Trofozoito joven
- 3,4 Esquizonte joven
- 5 Esquizonte maduro, pigmento al centro
- 6 Gametocito con Cromatina compacta
- 7 Gametocito con Cromatina difusa

Plasmodium vivax **(Gota gruesa)**



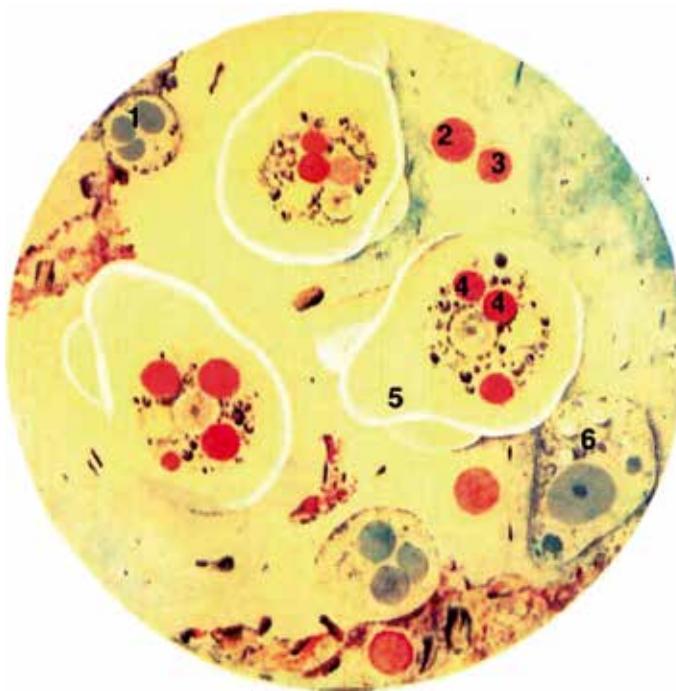
- 1 Plaquetas
- 2 Eritrocito parasitado
- 3 Anillo libre
- 4 Pigmento
- 5 Gránulos de Schülfner
- 6 Núcleo del parásito
- 7 Esquizonte
- 8 Merozoitos

Plasmodium falciparum **(Gota gruesa)**



- 1 Pigmento malárico
- 2 Formas anulares
- 3 Gametocitos

PREPARACIÓN DE HECES EN FRESCO

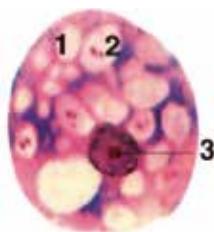


- 1 Leucocitos
- 2 Eritrocitos
- 3 Bacterias
- 4 Eritrocitos fagocitados
- 5 Pseudópodo
- 6 Célula epitelial

Entamoeba histolytica

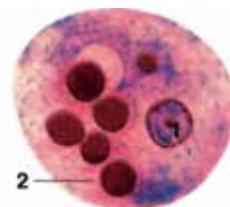
FORMA MINUTA
(Luz intestinal)

- 1 Vacuola
- 2 Bacteria fagocitada (en vacuola)
- 3 Núcleo



FORMA MAGNA
(Invasora de tejidos)

- 1 Núcleo con endosoma central
- 2 Eritrocito fagocitado



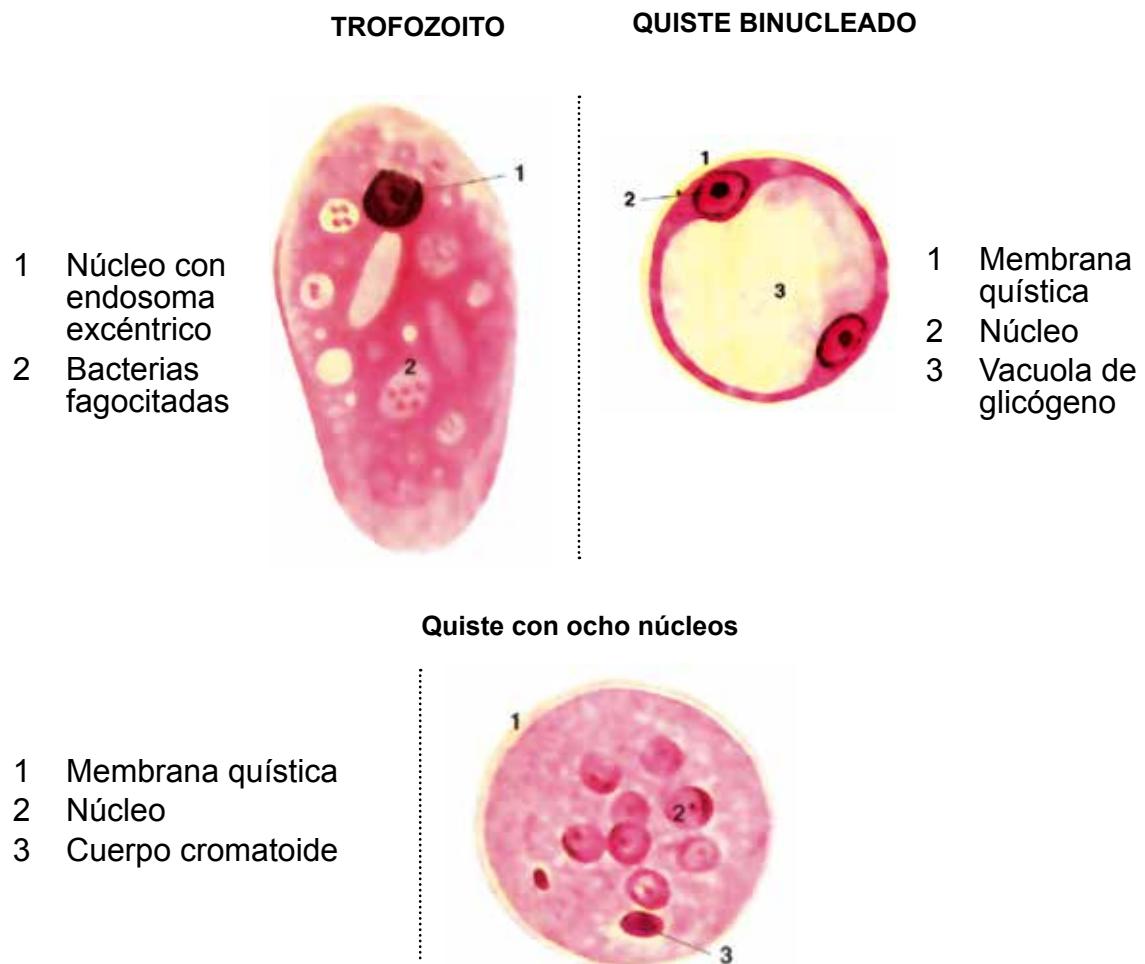
FORMA MINUTA VEGETATIVAS

- 1 Membrana del quiste
- 2 Núcleo
- 3 Vacuola
- 4 Cuerpos cromatoides "Salchicha"

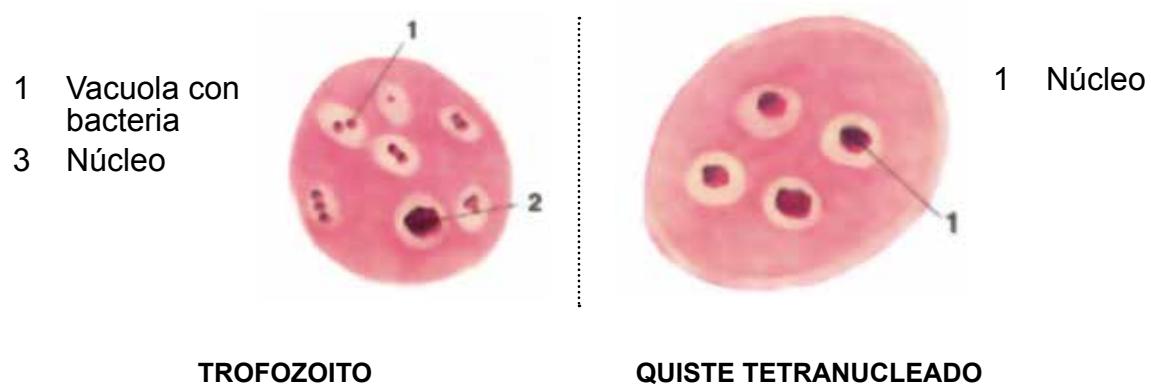


- 5 Quiste binucleado
- 2 Quiste cuadrinucleado

Entamoeba Coli

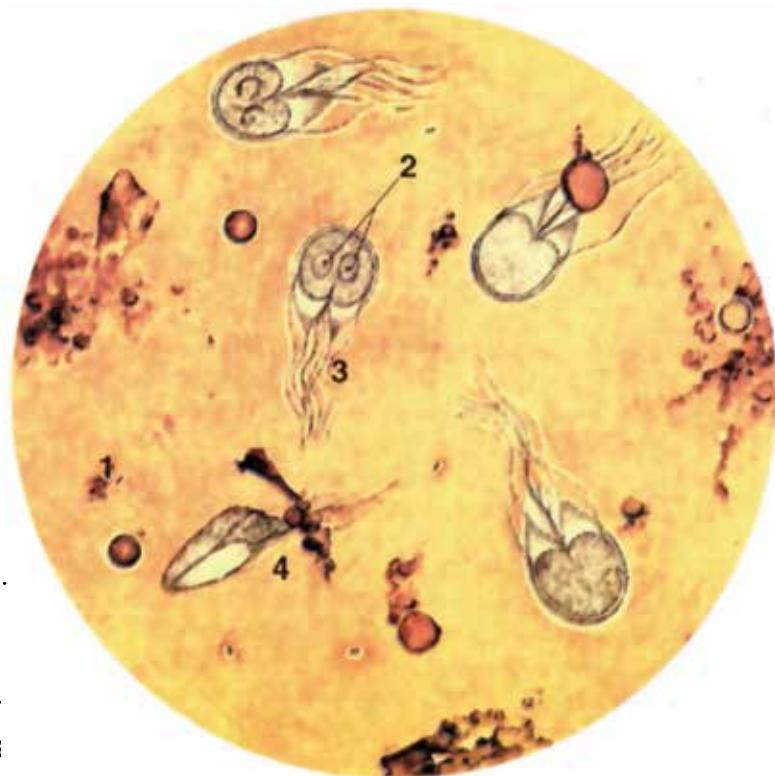


Endolimax Nana



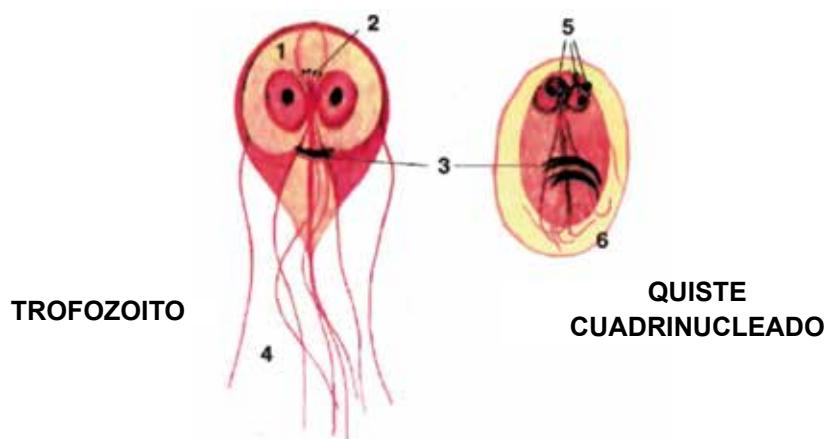
Giarda Lamblia

(Jugo duodenal, preparación en fresco)



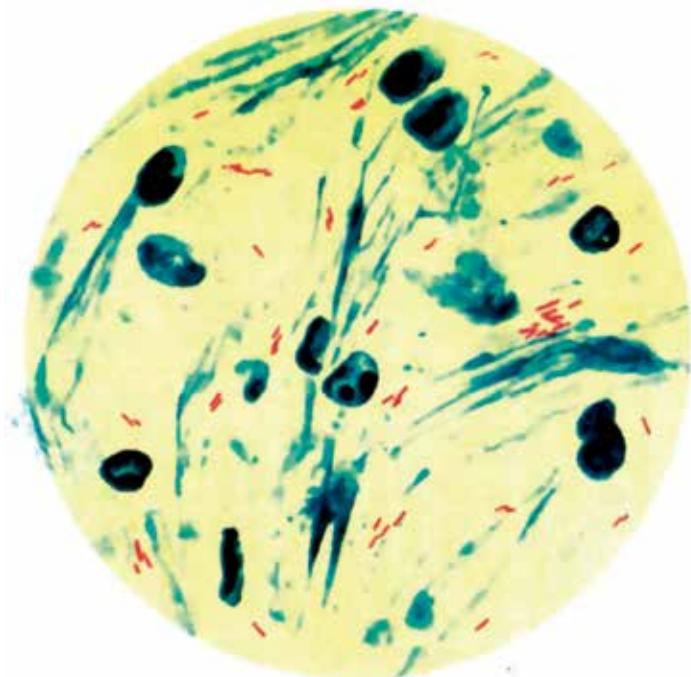
- 1 Bacterias
- 2 Núcleos
- 3 Vista ventr
- 4 Vista latera;

FROTIS DE HECES - HEMATOXILINA

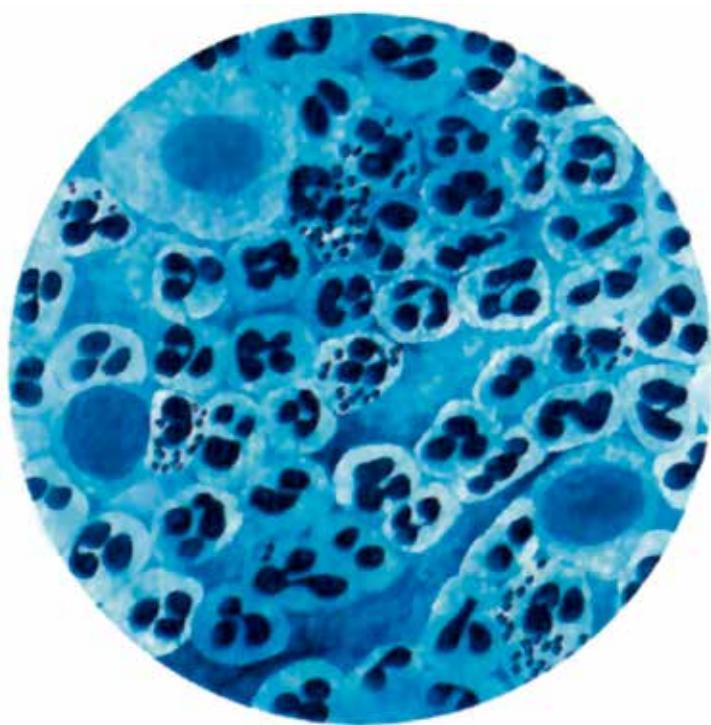


- | | |
|-----------------------|---------------------|
| 1 Disco suctorio | 4 Flagelos |
| 2 Blefaroplasto | 5 Endosomas |
| 3 Cuerpos parabasales | 6 Membrana quística |

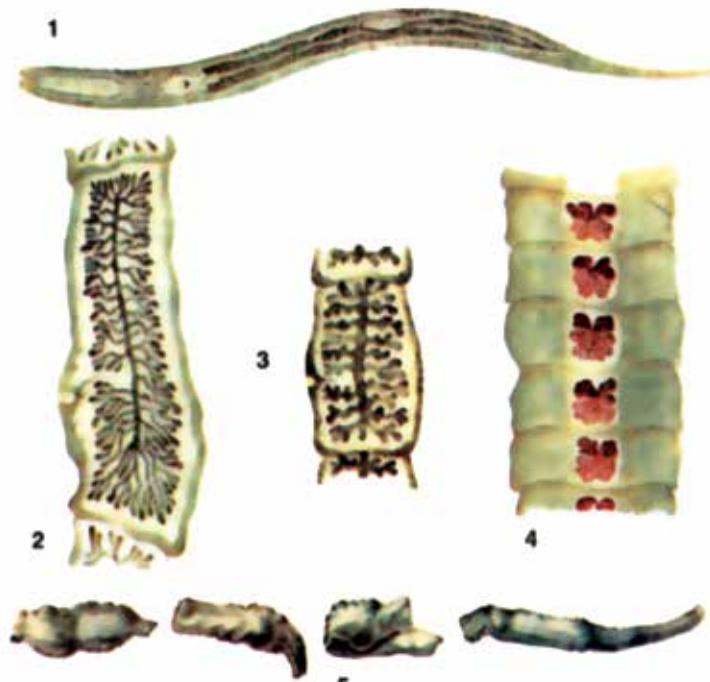
Mycobacterium tuberculosis
(Coloración Ziehl-Neelsen)



Nesseira gonorrhoeae
(Coloración azul de metileno)

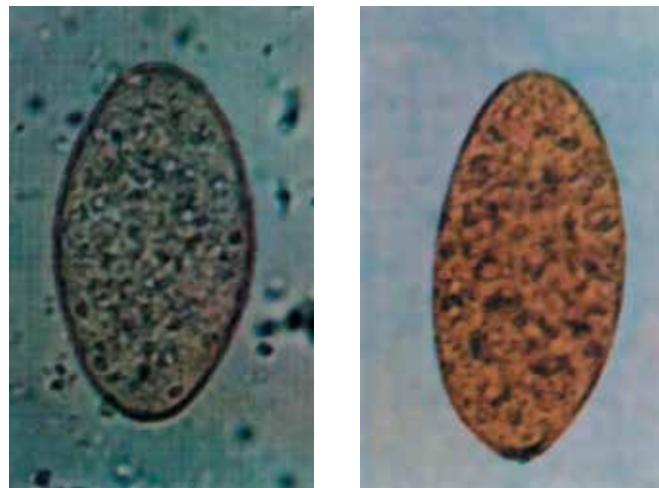


HELMINTOS

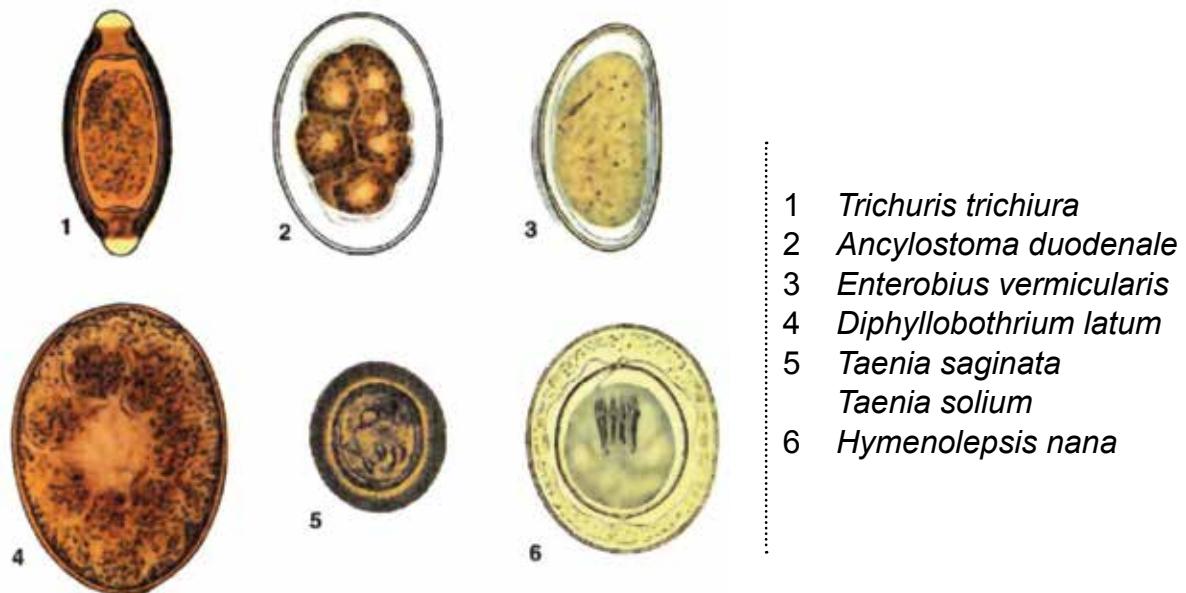


-
- 1 Strongyloides stercorafis
 - 2 Taenia saginata
 - 3 Taenia solium
 - 4 Diphyllobothrium latum
 - 5 Taenia saginata

HUEVOS DE *Fasciola hepática*



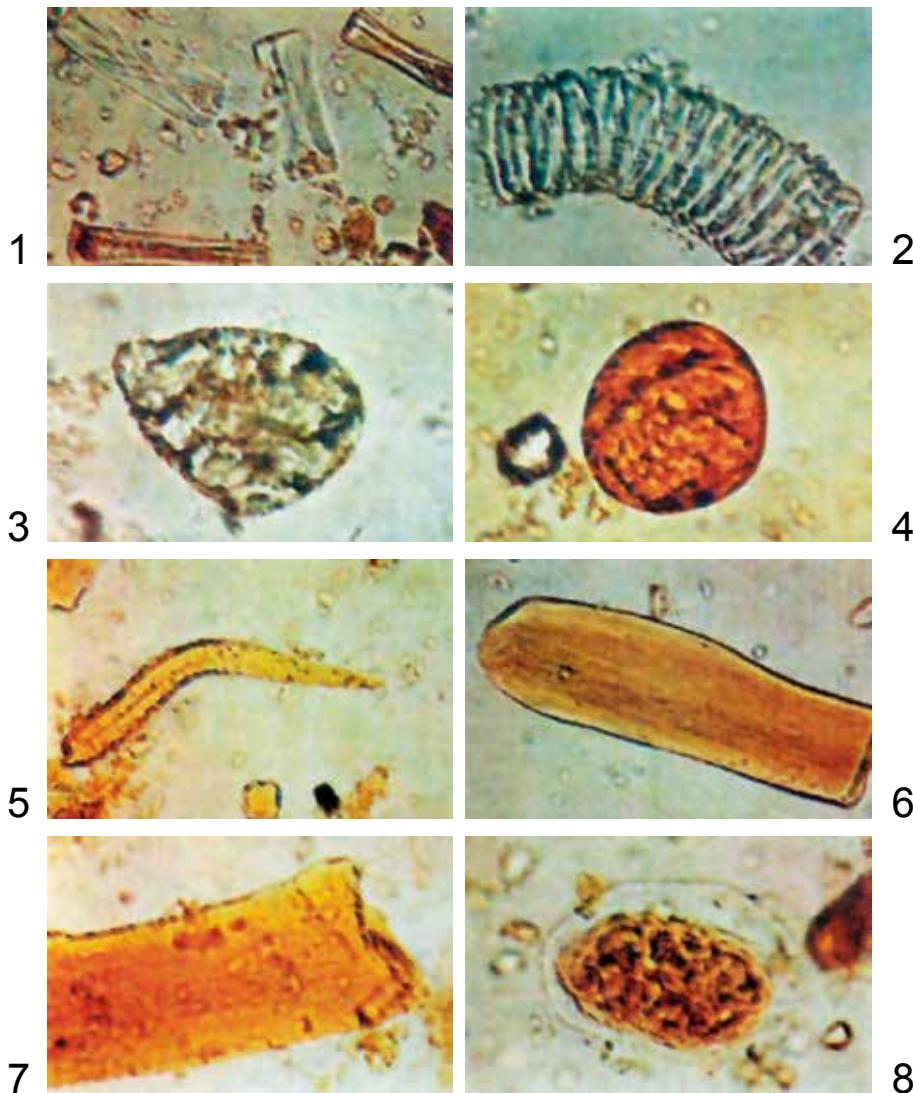
HUEVOS DE HELMINTOS



HUEVOS DE *Ascaris lumbricoides*



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