



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Manual de Prácticas de Laboratorio para la materia “Opción Técnica de Análisis Clínicos” impartida en el Colegio de Ciencias y Humanidades.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

P R E S E N T A:

Juan Carlos Flores Chávez

ASESOR DE PROYECTO

Q.F.B René Damián Santos

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Manual de Prácticas de Laboratorio para la materia "Opción Técnica de Análisis Clínicos" impartida en el Colegio de Ciencias y Humanidades.

Que presenta el pasante: Juan Carlos Flores Chávez
Con número de cuenta: 311084551 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Noviembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Victor Manuel Zendejas Buitrón	
VOCAL	Q.F.B. René Damián Santos	
SECRETARIO	Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse al día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos

Agradezco en primera instancia a mi madre, Esperanza Chávez Cruz, el único soporte y pilar en mi formación como humano y adulto, cimiento fundamental para mi educación profesional.

Quiero expresar también este agradecimiento hacia mis hermanos por su ejemplo, apoyo, solidaridad y por la confianza que pusieron en mí.

De manera muy especial quiero agradecer y expresar mi admiración hacia mis padrinos Isidro Sosa Gómez y Mónica Martínez Chávez, por el máximo apoyo recibido, la confianza brindada y por creer en mí, así también les agradezco por recibir y mostrar solidaridad a mis compañeros y amigos de la licenciatura.

A las hermanas de mi madre, mis tías, Carmelita, Ufe y Virginia, les agradezco por su amor, máximo apoyo, comprensión y por estar en los momentos más oportunos de la vida de mi madre y la mía, por aconsejarme de buena manera y por poder confiar siempre en ustedes, las quiero las admiro y las respeto de sobremanera.

A la profesora María Antonieta Escalante, quiero hacer un enorme reconocimiento por el labor que realiza día con día, tanto en el ámbito profesional como en el social, le agradezco por ser una gran ayuda en el proceso de realización de este trabajo y por abrirme no solo las puertas de su aula sino también por recibirme en su casa, le agradezco por todos los consejos que me brindó, por ser un ejemplo, por darme un lugar en la clínica para que lograra sacar a delante este trabajo, y finalmente por el compromiso y por el empeño que pone en cada una de las acciones que realiza para ser una persona íntegra. No tengo palabras en este momento para reconocer y agradecer todo lo que usted se merece. Gracias totales.

Así como también a los verdaderos amigos que conocí en esta etapa de mi vida, por su apoyo, su solidaridad y por todos esos momentos que compartimos juntos. Monse Mendoza, a ti amiga te doy las gracias por ser tan paciente conmigo, por compartir conmigo, por todos os días que nos la pasábamos estudiando y yo ni pasaba, por ser mi amiga y mi cómplice (cuando nos robamos el examen de analítica), por muchos momentos más muy agradables a tu lado.

Alejandro Oliver, amigo que puedo yo decir de ti... Gracias por ser mi confidente, mi herman@, por las risas, cuando bromeábamos en clase y cuando seguimos bromeando con los chamacos en el CCH, te doy las gracias por estar en este proyecto, por ayudarme con mis alumnos, por brindarme un consejo honesto y por hacerme ver la realidad de las cosas,

Diana y Julieta, amigas a ustedes les agradezco todo el apoyo que me dieron durante la carrera, con todo lo que nos pasaba Dian jaja, en ustedes siempre pude encontrar un luz en el camino cuando tenía dudas de la materia que fuera, siempre las vi y las sigo viendo como un ejemplo a seguir.

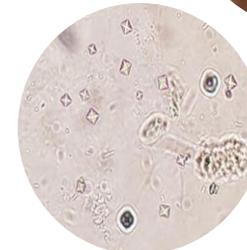
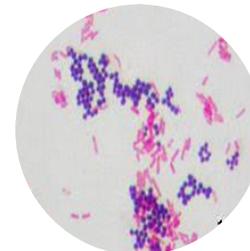
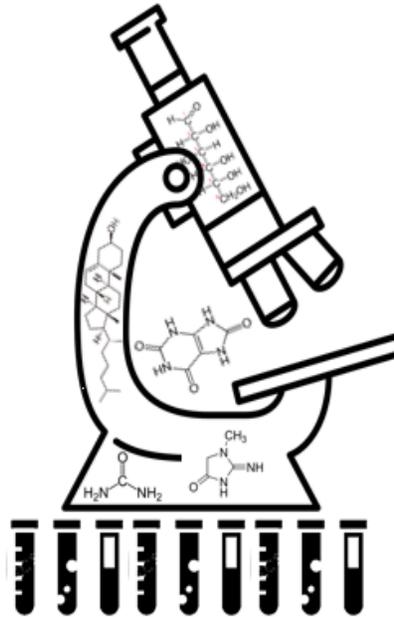
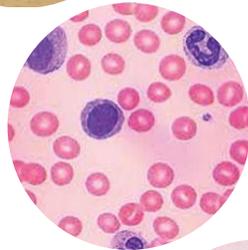
Daniela Reyes, amiga debí haberte conocido antes, gracias por todos esos momentos que vivimos en la carrera, también te agradezco que siempre fuiste una muy buena compañía, mi consejera espiritual jaja, y además por ser mi confidente, te quiero amiga!.

Luz Y Jiménez, a ti que te puedo decir, eres un ejemplo, una joven inteligente, valiente hermosa, y muy astuta, te agradezco amiga por tantas lecciones de vida que me mostraste, por ser quien eres, por apoyarme incondicionalmente en la carrera, por soportar todas las malas jugadas que te hacía, por tu compañía, y por tu bonita y sana amistad. No sé cómo expresar el cariño y la gratitud incondicional que siento hacia tu persona

A Michellé Sánchez Remigio, amiga gracias por formar parte de mi vida durante la carrera, en serio jamás había conocido a una persona tan noble de corazón como lo fuiste tú conmigo, el verdadero valor de la amistad esta expresado en ti, te agradezco por todos aquellos buenos consejos que me brindaste, y no solo a ti amiga sino también a tu hermana Junuen, en serio unas personas de gran valor y belleza por dentro y por fuera.

Ciudad de México, Azcapotzalco, enero de 2019.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES.
DEPARTAMENTO DE OPCIONES TÉCNICAS.
OPCIÓN TÉCNICA DE ANÁLISIS CLÍNICOS.



Manual de Prácticas de Laboratorio.

Opción Técnica de Análisis Clínicos.

Nombre del alumno:

Semestre:

Grupo:

DEPARTAMENTO DE OPCIONES TÉCNICAS.

CARRERA TÉCNICA ESPECIALIZADA EN ANÁLISIS CLÍNICOS.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Colegio de Ciencias y Humanidades.

Ciudad de México, Azcapotzalco.



Autor:

LBD Juan Carlos Flores Chávez.

Colaboradores:

QBP María Antonieta Escalante Rojas.

QFB Rene Damián Santos.

Dr. Victor Manuel Zendejas Buitrón.

QFB Verónica Ruíz Solorio.

M. en C. Paola Edith Briseño Lugo.

M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez.



INDICE

Contenido Temático.	Página
Reglamento de seguridad en el Laboratorio.....	i
Presentación del Manual.....	ii
Criterios de evaluación.....	ii
Evaluación del curso.....	ii
Vinculación del Contenido Teórico con las Prácticas experimentales.....	iii
MÓDULO 1. INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS.....	1
Práctica 1.1 Revisión de Normas Oficiales Mexicanas y medidas de Bioseguridad en el Laboratorio de Análisis Clínicos...	1
1.1.1 Revisión de Normas Oficiales Mexicanas.....	3
1.1.2 Medidas de bioseguridad en el Laboratorio de Análisis Clínicos.....	4
Práctica 1.2 Manejo de muestras biológicas, material de laboratorio y clasificación de RPBI's en el Laboratorio de Análisis Clínicos.....	5
Práctica 1.3 Lavado de Manos.....	8
Práctica 1.4 Manejo de Fotocolorímetro.....	9
1.4.1 Preparación de la Curva de Calibración de Glucosa.....	10
Práctica 1.5 Manejo de Centrífuga.....	13
Práctica 1.6 Manejo de Microscopio Óptico Compuesto.....	14
MÓDULO 2. EXAMEN GENERAL DE ORINA.....	18
Práctica 2.1 Examen General de Orina.....	18
2.1.1 Examen Físico o análisis macroscópico (Color, Olor, Aspecto y Densidad).....	20
2.1.2 Examen Químico.....	21
2.1.3 Examen Microscópico.....	23
MÓDULO 3. Hematología.....	25
Práctica 3.1 Obtención de muestras sanguíneas por punción venosa mediante jeringa y sistema al vacío.....	25
3.1.1 Venopunción con Jeringa.....	27
3.1.2 Venopunción por Sistema al Vacío.....	27
3.1.3 Obtención de plasma sanguíneo.....	28
3.1.4 Obtención de suero sanguíneo.....	29
Práctica 3.2 Citometría Hemática.....	30
3.2.1 Determinación de la Fórmula Roja.....	33
3.2.1.1 Determinación de Hemoglobina (Hb).....	33
3.2.1.2 Determinación de Hematocrito (Hto).....	34
3.2.1.3 Conteo Eritrocitario manual (Hemocitómetro).....	35
3.2.1.4 Determinación de la Velocidad de Sedimentación Globular (VGS).....	37
3.2.1.5 Determinación de Índices de Wintrobe.....	38
3.2.2 Determinación de la Fórmula Blanca.....	38
3.2.2.1 Conteo Leucocitario Total (Hemocitómetro).....	38
3.2.2.2 Elaboración y tinción de frotis sanguíneo.....	40



Contenido Temático.	Página
3.2.2.3 Recuento Leucocitario Diferencial.....	41
3.2.2.3.1 Características morfológicas de las células Blancas.....	42
3.2.2.4 Evaluación morfológica eritrocitaria y plaquetaria.....	43
3.2.2.4.1 Características morfológicas de las células eritrocitarias y plaquetarias.....	43
3.2.3 Determinación de la Fórmula Plaquetaria.....	44
3.2.3.1 Conteo Plaquetario Manual (Hemocitómetro).....	44
3.2.3.2 Conteo Plaquetario Manual (Extensión Sanguínea).....	45
MÓDULO 4. Inmunología.....	49
Práctica 4.1 Pruebas Inmunológicas básicas.....	49
4.1.1 Antígenos Febriles (Reacciones Febriles).....	51
4.1.1.1 Introducción a las Reacciones Febriles.....	51
4.1.1.2 Método de aglutinación en placa (Cualitativo).....	51
4.1.1.3 Método de aglutinación en placa (Cuantitativo). En caso de presentar resultados positivos.....	52
4.1.2 Determinación cualitativa de anti-Estreptolisina O.....	53
4.1.2.1 Introducción a la determinación de ASLO.....	53
4.1.3 Determinación del Factor Reumatoide (FR).....	55
4.1.3.1 Introducción a la determinación del FR.....	55
4.1.4 Determinación de Grupo Sanguíneo (SABO) y Factor Rh o D.....	55
4.1.4.1 Introducción al Sistema ABO y determinación del Factor Rh o D.....	55
4.1.4.2 Toma de muestra mediante punción capilar.....	56
4.1.5 Determinación de Proteína C Reactiva (PCR).....	57
4.1.5.1 Introducción a la determinación de la PCR.....	57
4.1.6 Determinación de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) o Prueba Inmunológica de Embarazo.....	58
4.1.6.1 Introducción a la Prueba de Embarazo.....	58
4.1.7 Prueba serológica para la Sífilis (VDRL).....	60
4.1.7.1 Introducción a la determinación de VDRL.....	60
4.1.8 Determinación de Reagina Plasmática Rápida (RPR).....	61
4.1.8.1 Introducción a la determinación de la RPR.....	61
MÓDULO 5. Bioquímica Clínica.....	63
Práctica 5.1 Química Sanguínea de 5 elementos en suero.....	63
5.1.1 Determinación de Glucosa.....	64
5.1.2 Determinación de Urea.....	65
5.1.3 Determinación de Creatinina.....	65
5.1.4 Determinación de Ácido Úrico.....	66
5.1.5 Determinación de Colesterol.....	67
MÓDULO 6. Parasitología.....	68
Práctica 6.1 Examen Coproparasitoscópico, mediante la técnica de Faust.....	68
6.1.1 Determinación de estructuras parasitarias.....	70
MÓDULO 7. Bacteriología.....	73
Practica 7.1 Preparación de Medios de Cultivo.....	73



Contenido Temático.	Página
7.1.1 Preparación de medio de Cultivo Agar Sangre / Gelosa Sangre.....	75
7.1.2 Preparación de medio de Cultivo Agar Nutritivo / Gelosa Nutritiva y otros.....	77
7.1.3 Prueba de esterilidad de medios de cultivo.....	78
Práctica 7.2 Cultivo y caracterización de los microorganismos presentes en la muestra bacteriológica.....	79
Práctica 7.3 Toma de muestra bacteriológica.....	83
7.3.1 Toma de muestra de exudado faríngeo.....	83
7.3.2 Toma de muestra de exudado nasal.....	84
7.3.3 Toma de muestra de exudado ótico.....	85
7.3.4 Toma de muestra de exudado de secreción de heridas.....	86
7.3.5 Toma de muestra de expectoración (esputo).....	87
7.3.6 Toma de muestra para urocultivo.....	88
7.3.7 Toma de muestra para coprocultivo.....	88
7.3.8 Toma de muestra Exudado vaginal.....	89
Práctica 7.4 Evaluación de la morfología colonial macroscópica y microscópica.....	91
7.4.1 Evaluación de la morfología colonial macroscópica.....	93
7.4.2 Evaluación de la morfología colonial microscópica.....	94
7.4.2.1 Tinción de Gram.....	94
Práctica 7.5 Identificación de Género y Especie: Pruebas bioquímicas.....	96
7.5.1 Identificación de género bacteriano: Pruebas bioquímicas primarias.....	98
7.5.1.1 Prueba de Oxidasa.....	98
7.5.1.2 Prueba de Catalasa.....	98
7.5.1.3 Prueba de Oxido fermentación.....	99
7.5.1.4 Prueba de Motilidad.....	99
Práctica 7.6 Sensibilidad a los antibióticos: Antibiograma.....	101



Reglamento de seguridad en el Laboratorio

- 1.- Para todo trabajo experimental realizado en el Laboratorio de Análisis Clínicos deberá utilizarse Bata blanca de manga larga y limpia; Así como uso de guantes de nitrilo, látex o vinilo y cubrebocas en los momentos de toma de muestra o manipulación de las mismas y manejo de compuestos químicos de riesgo
- 2.- La tolerancia para el inicio de las sesiones experimentales será de hasta 10 minutos.
- 3.- Por seguridad no debe cerrarse la puerta del Laboratorio con llave durante las actividades prácticas.
- 4.- Colocar las mochilas en los espacios correspondientes durante las prácticas experimentales, mantener los pasillos libres de bancos, con la finalidad de que en caso de algún siniestro no existan obstáculos para abandonar el lugar. De igual manera mantener las mesas libres de objetos extraños.
- 5.- En todo momento deberá mostrarse una conducta adecuada en el área de trabajo.
- 6.- Queda prohibido en el Laboratorio de Análisis Clínicos: tirar basura fuera de los cestos, ingerir alimentos y/o bebidas, fumar, recibir visitas, sentarse sobre las mesas de trabajo o maltratar el mobiliario del Laboratorio.
- 7.- Los residuos (RPBI) generados deben colocarse en los contenedores correspondientes para cada uno, entendiendo por residuo peligroso: Elementos, sustancias, compuestos, desechos o mezclas de ellos que en cualquier estado físico representen un riesgo para el medio ambiente, la salud o los recursos naturales, como se indica en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.
- 8.- No se permite el uso de teléfonos celulares, a menos que sea indicado por el profesor, ni reproductores de sonido o cualquier medio electrónico de entretenimiento, el uso de computadoras portátiles queda restringido a temáticas relacionadas con la asignatura.
- 9.- El acceso al Laboratorio solo se permitirá cuando se encuentre presente el profesor titular de la Opción Técnica.
- 10.- Es obligación de todos mantener limpio y ordenado el lugar de trabajo y todo el Laboratorio.
- 11.- Lavarse las manos antes y después de cada práctica experimental.
- 12.- El cabello largo debe estar debidamente recogido.
- 13.- No inhalar, probar u oler productos químicos si no se está debidamente bien informado.



Presentación del Manual

El presente manual de prácticas para el Laboratorio de Análisis Clínicos brinda al estudiante conocimientos básicos y las herramientas necesarias para desarrollar las habilidades, destreza, cuidados y procedimientos requeridos en el ámbito profesional del Técnico en Análisis Clínicos, con el fin de formar Técnicos especializados, capaces de apoyar al profesional responsable del laboratorio en la preparación de los materiales y lo necesario para la selección, manejo y procesamiento de las muestras biológicas a evaluar. Se citan los conocimientos básicos para realizar los procedimientos comúnmente empleados en el laboratorio de Análisis Clínicos, apegado a los lineamientos establecidos por las Normas Oficiales Mexicanas vigentes, sin olvidar los valores y la ética profesional que lo forman como alumno del Colegio de Ciencias y Humanidades de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Criterios de evaluación

Asistencia y puntualidad	
Revisión de Resultados	
Revisión de Cálculos	
Reporte	

Evaluación del curso

ASISTENCIA: Es un requisito indispensable para acreditar la parte práctica del curso; es necesario contar con por lo menos el 80% de la asistencia total a las prácticas y demás actividades realizadas y aprobadas.

PUNTUALIDAD: Se darán 10 minutos de tolerancia para la entrada a las actividades prácticas.

REPORTE: Este es un trabajo de suma importancia y se entregará en las fechas establecidas por el Profesor titular del grupo. Se debe realizar por escrito o en computadora, con excelente presentación y cumplir mínimo con los siguientes requisitos:

- 1.- **CARÁTULA:** Debe cumplir con los siguientes datos: Nombre de la Institución y Dependencia (UNAM/CCH-Azc), Nombre de la Carrera Técnica, Grupo, Título: "*Reporte de la Práctica No. ...*", Nombre del alumno, Fecha de Realización de la Práctica y Fecha de Entrega del Reporte.
- 2.- **OBJETIVO GENERAL:** Diferente al del Manual
- 3.- **INTRODUCCIÓN:** Esta deberá contener la información general de la práctica realizada, y no debe ser la misma que la del manual y debe ser una cuartilla como mínimo.
- 4.- **METODOLOGÍA:** La misma con la que cuenta el Manual.
- 5.- **RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:** Los resultados se deben colocar tal y como se muestra en el Manual y el análisis se realiza colocando el fundamento de la prueba y su interpretación
- 6.- **CONCLUSIONES:** Se hacen las deducciones de los resultados y se deben de tomar en cuenta el objetivo general de cada práctica.
- 7.- **BIBLIOGRAFÍA:** Las referencias deben ser mínimo tres y consultando por lo menos un libro. Estas se escriben de acuerdo a las normas internacionales (Formato APA); Como se ejemplifica a continuación: Autor(es), Año, Título del artículo, libro o documento consultado, Edición, Editorial, Volumen, Páginas.



Vinculación del contenido teórico con las prácticas experimentales.

Unidad Temática	Título de la práctica	Número de práctica.
MÓDULO I. Introducción al Laboratorio de Análisis Clínicos.	Revisión de conceptos y Normas Oficiales Mexicanas.	1.1
	Lavado de Manos.	1.2
	Manejo de Muestras Biológicas y material de Laboratorio comúnmente utilizado en Laboratorio de Análisis Clínicos.	1.3
	Manejo de Fotocolorímetro.	1.4
	Manejo de Centrifuga.	1.5
	Manejo de Microscopio Óptico Compuesto.	1.6
MÓDULO II. Examen General de Orina.	Examen General de Orina. - Examen Físico. - Examen Químico. - Examen Microscópico.	2.1
MÓDULO III. Hematología.	“Obtención de muestras sanguíneas por punción venosa mediante sistema al vacío y jeringa”.	3.1
	- Punción venosa con Jeringa.	
	- Punción venosa con sistema al vacío.	
	- Obtención de Suero sanguíneo.	
	- Obtención de Plasma sanguíneo.	
	“Citometría Hemática”.	3.2
	- Determinación de Hemoglobina.	
	- Determinación de Hematocrito.	
	- Conteo Eritrocitario.	
	- Determinación de la Velocidad de Sedimentación Globular.	
- Determinación de Índices de Wintrobe.		
- Conteo Leucocitario Total.		
- Elaboración y Tinción de Frotis Sanguíneo.		
- Recuento Leucocitario Diferencial.		
- Evaluación Morfológica Eritrocitaria y Plaquetaria.		
MÓDULO IV. Inmunología.	“Pruebas Inmunológicas Básicas”. - Reacciones Febriles. - Antiestreptolisina O.	4.1



	<ul style="list-style-type: none"> - Factor reumatoide - Grupos sanguíneos - Proteína C reactiva - Prueba de embarazo. - RPR. 	
MÓDULO V. Bioquímica Clínica.	<p style="text-align: center;">“Química Sanguínea de 5 elementos “</p> <ul style="list-style-type: none"> - Glucosa. - Ácido úrico. - Urea. - Creatinina. - Colesterol. 	5.1
MÓDULO VI. Parasitología.	<p style="text-align: center;">Examen Coproparasitoscópico.</p> <p style="text-align: center;">Determinación de estructuras parasitarias por la Técnica de Faust.</p>	6.1
MÓDULO VII. Bacteriología.	<p style="text-align: center;">Preparación de medios de cultivo.</p> <p style="text-align: center;">Toma de Muestra Bacteriológica.</p> <p style="text-align: center;">Cultivo de muestra Bacteriológica.</p> <p style="text-align: center;">Morfología colonial Macroscópica.</p> <p style="text-align: center;">Morfología colonial Microscópica.</p> <p style="text-align: center;">Identificación de Género y Especie bacterianos: Pruebas Bioquímicas.</p> <p style="text-align: center;">Sensibilidad a los antibióticos: Antibiograma.</p>	<p>7.1</p> <p>7.2</p> <p>7.3</p> <p>7.4</p> <p>7.4</p> <p>7.5</p> <p>7.6</p>



MÓDULO 1. INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS.

Práctica 1.1 Revisión de Normas Oficiales Mexicanas y medidas de Bioseguridad en el Laboratorio de Análisis Clínicos.

Objetivo.

Que el alumno conozca y aplique las Normas de Bioseguridad y manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI), así como la normatividad para el funcionamiento de los Laboratorios de Análisis Clínicos, verificando la conservación, limpieza y mantenimiento de los materiales, reactivos y equipos utilizados en la práctica, con la finalidad de adquirir destreza y los conocimientos básicos del funcionamiento, organización y control en este tipo de establecimiento.

Introducción.

Se le conoce como Laboratorio Clínico al establecimiento público, social o privado, legalmente establecido, independiente o ligado a otro establecimiento para la atención médica de pacientes hospitalarios o ambulatorios, que tenga como finalidad realizar análisis físicos, químicos o biológicos de diversos componentes y productos del cuerpo humano, cuyos resultados coadyuvan en el estudio, prevención, diagnóstico, resolución y tratamiento de los problemas de salud.

La principal función de este establecimiento es realizar estudios mejor conocidos como Análisis de Laboratorio. Estos son análisis físicos, químicos o biológicos, cuyas mediciones y resultados se obtienen a través del uso de diversas técnicas, por personal facultado para ello, como Médicos, Químicos y Técnicos especialistas en el área; En un laboratorio clínico legalmente establecido.

El laboratorio clínico, debe contar con Aviso de Funcionamiento y Aviso de Responsable Sanitario. El responsable sanitario deberá ser: un Químico con currículum orientado al laboratorio clínico con grado universitario de maestría o doctorado en las áreas de laboratorio clínico, o un Médico cirujano, con certificado de especialización en patología clínica, grado universitario de maestría o doctorado en las áreas de laboratorio clínico.

Los laboratorios clínicos deben contar con lo requerido en la Norma Oficial Mexicana NOM-197-SSA1-2000, Que establece los

requisitos mínimos de infraestructura y equipamiento de hospitales y consultorios de atención médica especializada. Dicha norma indica lo siguiente: área administrativa y de recepción, toma de muestra sanguínea, toma de muestra microbiológica y ginecológica, área de química clínica, hematología, inmunología, análisis de orinas y coprológicos, microbiología, banco de sangre y/o servicio de transfusiones, área de urgencias, área de lavado de material y esterilización así como un área de almacenamiento de materiales y reactivos.

Los laboratorios clínicos deben contar con personal suficiente e idóneo. El personal profesional del área de laboratorio clínico debe presentar título universitario y en el caso de que labore personal técnico, éste deberá contar con diploma ambos legalmente expedidos. (NOM-007-SSA1-2011)

La Bioseguridad se define como la serie de medidas orientadas a disminuir el riesgo del trabajador de la salud de adquirir infecciones en el medio laboral. Ya que todo trabajo clínico implica un riesgo para el personal ya que durante este, se encontrarán en contacto con muestras biológico-infecciosas y productos químicos peligrosos, de tal forma que resulta indispensable conocer su clasificación, identificación, manejo y desecho para evitar riesgos individuales y comunitarios relacionados con las actividades del laboratorio y conocer los procedimientos básicos para evitar riesgos personales como el uso de equipos de protección, lavado de manos y acondicionamiento del área de trabajo. (NOM-087-ECOL-SSA1-2002)

Aunado a esto es importante revisar las normativas de conocimiento indispensable para los Técnicos en Análisis Clínicos, como lo son:

- Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del Expediente Clínico.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los Laboratorios Clínicos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Protección Ambiental Salud Ambiental Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos, Clasificación y Especificaciones de Manejo.



- Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2015, Sistema Armonizado para la Identificación y Comunicación de Peligros y Riesgos por Sustancias Químicas Peligrosas en los Centros de Trabajo.

Por otra parte la Organización Mundial de la Salud propone la Clasificación de los Microorganismos Patógenos.

Tabla 1.- Grupo de riesgo de los microorganismos (OMS, 2005).

Grupo de Riesgo	Explicación
1. Riesgo individual y poblacional escaso o nulo.	Microorganismos que tienen pocas posibilidades de provocar alguna enfermedad en el ser humano o en los animales.
2. Riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo.	Microorganismos que tienen un riesgo muy bajo de provocar enfermedades pero sí pueden causarlas en animales y humanos.
3. Riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo.	Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades graves en humanos y animales, pero no se propagan de un individuo a otro y además existen medidas preventivas y terapéuticas para curarlas.
4. Riesgo individual y poblacional elevado	Agentes patógenos que provocan enfermedades graves en el ser humano y animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro y normalmente no existen medidas preventivas o terapéuticas eficaces.

Los laboratorios, según la Organización Mundial de la Salud se clasifican en:

Laboratorio básico, que tiene un **Nivel de Bioseguridad 1**: Este tipo de laboratorios, son casi siempre de escuelas, donde existe enseñanza e investigación básicas. Normalmente solo se utiliza bata como equipo de seguridad.

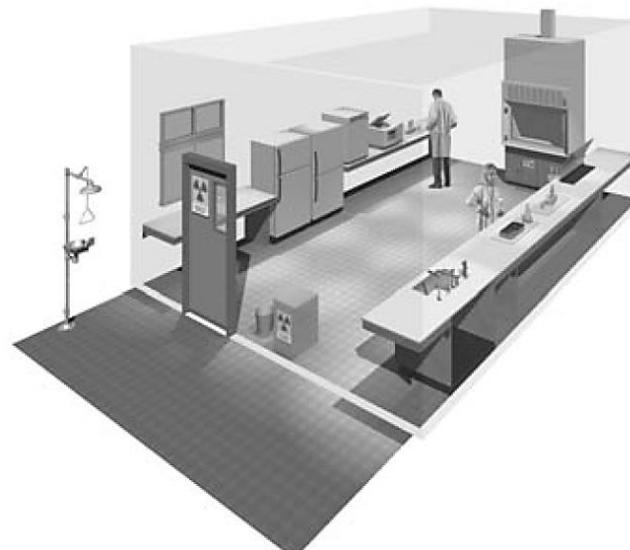


Imagen 1.- Laboratorio de bioseguridad 1 (OMS, 2005).

Laboratorio básico que tiene un **Nivel de Bioseguridad 2**: En estos laboratorios hay servicios de atención primaria, se realiza diagnóstico e investigación. En este lugar se utilizan señalamientos de riesgo biológico y también ropa protectora como equipo de bioseguridad.

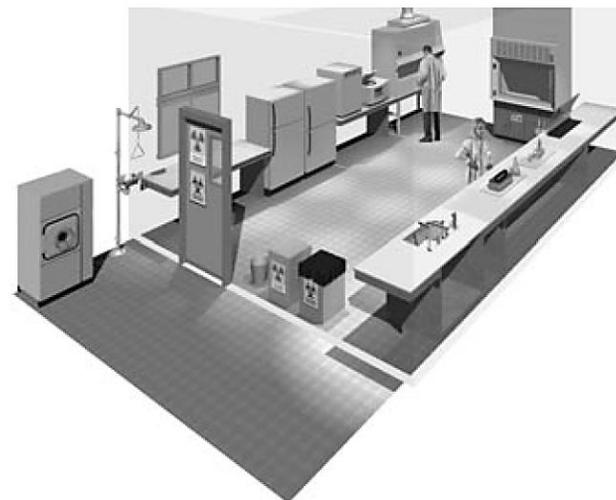


Imagen 2.- Laboratorio de bioseguridad 2 (OMS, 2005).



Laboratorio de contención que tiene un **Nivel de Bioseguridad 3**: En este apartado, en los laboratorios se hace diagnóstico especial e investigación. Se utilizan campanas de seguridad biológica y otros equipos de contención primaria, además se usa ropa especial, hay un acceso controlado al lugar y cuenta con flujo de aire controlado.

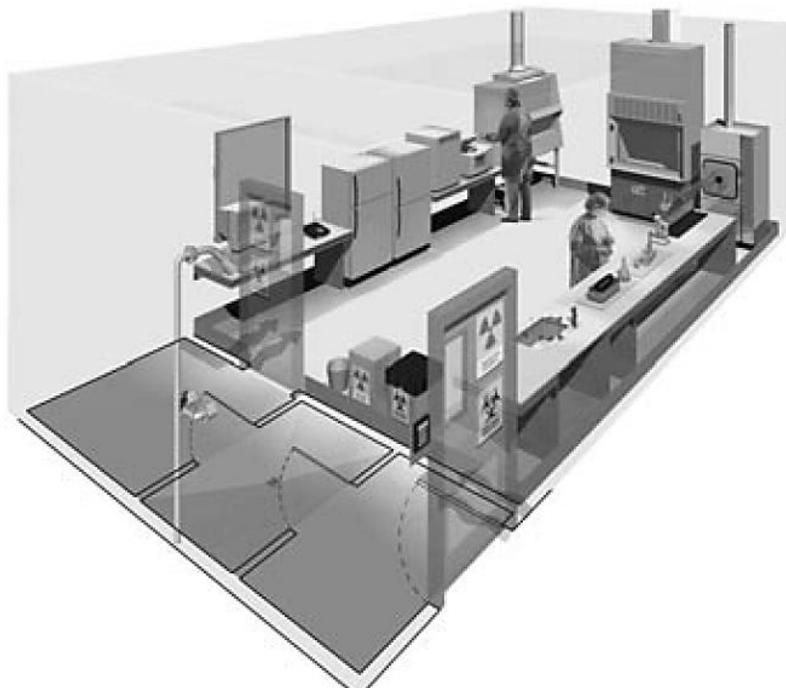


Imagen 3.- Laboratorio de bioseguridad 3 o Laboratorio de Contención (OMS, 2005).

El **Laboratorio de contención máxima** que tiene un **Nivel de Bioseguridad 4**: En este laboratorio se trabaja con patógenos altamente peligrosos, la entrada al laboratorio es controlada con cámaras de aire con cierre hermético, en la salida hay ducha y eliminación de residuos. Los equipos de seguridad son lo más nuevos en tecnología, se utilizan trajes especiales y aire filtrado.

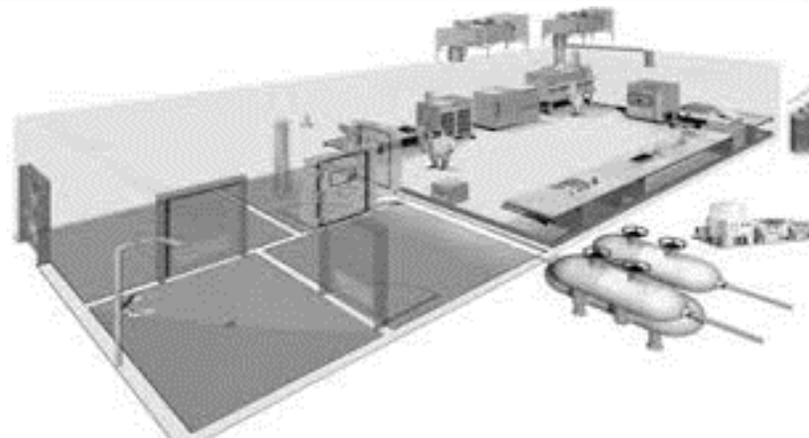


Imagen 4.- Laboratorio de bioseguridad 4 o Laboratorio de Máxima Contención (OMS, 2005).

Materiales, equipos y reactivos.

- Es necesario traer por persona para la Revisión de Normas Oficiales Mexicanas, las primeras páginas de las siguientes Normas: NOM 004, NOM 007 (Completa) y NOM 018.
- Para conocer las Medidas de Bioseguridad en el Laboratorio de Análisis Clínicos es necesario traer por persona, el resumen de la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección Ambiental Salud Ambiental Residuos – Peligrosos – Biológico - Infecciosos, Clasificación y Especificaciones de Manejo.
- Plumaz y hojas blancas por persona.

Procedimiento experimental.

1.1.1 Revisión de Normas Oficiales Mexicanas.

Discutir en equipos de tres personas los siguientes conceptos:

- Laboratorio Clínico, Funciones del Laboratorio Clínico, Organización del Laboratorio Clínico, Bioseguridad, Residuo, RPBI, NOM y su importancia en los Laboratorios de Análisis Clínicos.

- Discutir con su equipo, los puntos que consideren más importantes de las Normas Oficiales Mexicanas 004, 087, 007 y 018.
- Informar los procedimientos que se deben seguir en el Laboratorio para el manejo y disposición de todos los residuos generados durante las sesiones experimentales.
- Llenar la siguiente tabla: *Tabla 2.- Disposición de Residuos del Laboratorio de análisis Clínicos.* En la sección de Resultados.

1.1.2 Medidas de Bioseguridad en el Laboratorio de Análisis Clínicos.

- Identificar los equipos de Bioseguridad con los que cuenta el personal y los señalamientos que existen en el Laboratorio de Análisis Clínicos.
- Comentar los procedimientos más importantes para el manejo adecuado de muestras biológico-infecciosas.
- Colocar en la sección de resultados en la tabla: *Tabla 3.- Medidas y Equipos de Bioseguridad en el Laboratorio de Análisis Clínicos* las medidas que se pueden aplicar en el Laboratorio, así como los equipos con los que se debe contar dentro de él y mencionar si se tienen o no en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Colegio de Ciencias y Humanidades del Plantel en el que se encuentra.

Referencias.

- Ávila, I., Campos, M., et al. (2015) Manual de Prácticas de Laboratorio de Análisis Bioquímicos Clínicos Generales., UNAM- Departamento de Ciencias Biológicas.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección Ambiental Salud Ambiental Residuos-Peligrosos-Biológico-Infecciosos, Clasificación y Especificaciones de Manejo.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los Laboratorios Clínicos.
- Organización Mundial de La Salud (OMS)

Resultados.

Tabla 2.- Disposición de residuos del Laboratorio de Análisis Clínicos.

Tipo de residuos	Contenedor

Tabla 3.- Medidas y equipos de bioseguridad en el Laboratorio de Análisis Clínicos.

Medidas Aplicables y equipos de bioseguridad.	Equipos de bioseguridad	¿Se encuentra en el Laboratorio de Análisis Clínicos? Sí o No



Práctica 1.2 Manejo de muestras biológicas, material de laboratorio y clasificación de RPBI's en el Laboratorio de Análisis Clínicos.

Objetivo

Que el alumno reconozca y aplique normas de bioseguridad durante el manejo y procesamiento de muestras biológicas, para que adquiera los conocimientos generales del funcionamiento del Laboratorio de Análisis Clínicos, verificando el mantenimiento y conservación de materiales de vidrio, muestras biológicas y equipos de laboratorio utilizados en la práctica diaria.

Introducción

Los laboratorios clínicos en general se organizan por áreas de trabajo, con requerimientos específicos, las principales y más comunes son: área administrativa y de recepción, toma de muestra sanguínea, toma de muestra microbiológica y ginecológica, química clínica, hematología, inmunología, análisis de orinas y coprológicos, banco de sangre y/o servicio de transfusiones, área de urgencias, área de lavado de material y esterilización, así como área de almacenamiento de materiales y reactivos (NOM-007-SSA3-2011).

Los laboratorios clínicos cuentan con material especial para realizar los estudios y es responsabilidad de los químicos y técnicos que ahí laboran, así como de los trabajadores del Laboratorio usarlo de manera adecuada, y en las ocasiones que se requiera, darle mantenimiento básico. También es imprescindible conocer todos los procedimientos necesarios para realizar su labor de la mejor manera (Ávila, I., Campos, M., et al., 2015).

Todo el personal del laboratorio deberá adoptar las medidas preventivas para su protección en el almacenamiento, transporte y manejo de sustancias tóxicas o residuos peligrosos biológico-infecciosos tomando en cuenta los requisitos establecidos en las Normas Oficiales Mexicanas.

Recordando el objetivo de la bioseguridad es proteger al personal del Laboratorio contra la exposición innecesaria e injustificada a agentes infecciosos, tales como las muestras biológicas de pacientes, de los que se sospeche de alguna enfermedad infecto-contagiosa, cabe

resaltar que todas las muestras que se trabajen en el Laboratorio de Análisis Clínicos deben manipularse como si se tratara de muestras potencialmente patógenas para los humanos; y mantener a los agentes infecciosos dentro de los confines del laboratorio y/o no contaminar el medio externo. La primera línea de contención persigue la protección del personal y del ambiente del laboratorio. La segunda se destina a preservar el ambiente externo al laboratorio.

Los agentes que se consideran como residuos peligrosos biológico-infecciosos son los siguientes: Sangre y sus componentes, solo en su forma líquida, cultivos y cepas de agentes biológico-infecciosos incluyendo los utensilios desechables utilizados para contener, transferir, inocular y mezclar cultivos de dichos agentes, patológicos que son tejidos, órganos y partes que se remueven durante necropsias, cirugías o algún tipo de intervención quirúrgica, residuos no anatómicos como recipientes desechables que contengan sangre líquida, materiales de curación empapados, saturados o goteando de sangre y objetos punzocortantes como tubos capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringas desechables, hipodérmicas, de sutura, de acupuntura y de tatuajes, bisturís y estiletes de catéter, exceptuando material de vidrio roto.

Una muestra biológica es la parte anatómica o fracción de órganos o tejido, excreciones o secreciones obtenidas de un ser humano o animal vivo o muerto para su análisis (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

La principal muestra biológica utilizada en el Laboratorio de Análisis Clínicos es la sangre, que se encuentra definida como: El tejido hemático con todos sus componentes, sólo en su forma líquida, así como los derivados no comerciales, incluyendo las células progenitoras hematopoyéticas y las fracciones celulares o a celulares que de esta resulten (hemoderivados) (NOM-087-ECOL-SSA1-2002), de la cual es importante conocer como deberá ser desechada.

Los pasos para el manejo de los RPBI's, son 6 puntos importantes para eliminar los residuos generados dentro del laboratorio en su quehacer diario.

Paso 1. Identificación de los residuos, consiste en la identificación inmediata de los desechos después del procedimiento que los generó, en el sitio y por el personal donde se generaron, para lo cual se utiliza el siguiente cuadro.



R1	Tubos con muestras biológicas (Coágulos, suero o plasma) Se desechan en bote con solución de hipoclorito de sodio al 6% o entregar directamente al profesor.
R2	Agujas, (solo agujas, sin jeringa y sin tapones de agujas de jeringas, y sin tapas de agujas de doble filo) y capilares con sangre, desechan en bote para punzocortantes.
R3	Material sólido empapado de sangre, se deposita en la bolsa roja de RPBI.
R4	El material utilizado durante la práctica, como envolturas de jeringas, tapones protectores de agujas, guantes, torundas, tiras reactivas para EGO, etc. que no esté contaminado con sangre, se desecha en el bote de basura habitual.
R5	Las soluciones reactivas utilizadas en las prácticas, se desechan en bote con solución de hipoclorito de sodio al 6% o entregar directamente al profesor, por ningún motivo se desecha en la tarja, ni serán almacenadas.
R6	Puntas azules y amarillas de las micropipetas se dispondrán en contenedores a parte de los tubos y laminillas, con solución de hipoclorito de sodio al 6%.
R7	Agua utilizada para el lavado de celdas o cubetas para el espectrofotómetro se depositara en un bote, con solución de hipoclorito de sodio al 6%.

Tabla 4. Residuos generados en el laboratorio de Análisis Clínicos y su disposición.

- Paso 2. Envasado de los residuos generados, después de su identificación y con base en su estado físico, ya sean sólidos o líquidos.
- Paso 3. Almacenamiento temporal, deberán resguardarse en contenedores con tapa y permanecer cerrados todo el tiempo.
- Paso 4. Recolección y transporte externo, del que se ocupa personal calificado y que conoce ampliamente los riesgos que implica su trabajo (aplica únicamente para centros hospitalarios).
- Paso 5. Tratamiento, las mismas instituciones lo pueden realizar, la forma más limpia y barata es la utilización de la autoclave.
- Paso 6. Disposición final, los RPBI's que fueron tratados se dispondrán en camiones recolectores de basura común, mientras que los que no fueron tratados deberán enviarse a empresas recolectoras autorizadas (aplica únicamente para centros hospitalarios).

Materiales, equipos y reactivos.

- 1 Gradilla de unicel.
- 5 Pipetas de vidrio de diferentes volúmenes
- 1 Pipeta de Sahli.
- 1 Pipeta de Wintrobe.
- 1 Tubo capilar sin heparina.
- 1 Jeringa de plástico de 5mL.
- 1 Aguja de punta doble, calibre 21x33 para sistema al vacío.
- 1 Adaptador para sistema al vacío (Camisa o capuchón)
- 1 Fotocolorímetro.
- 1 Juego de micropipetas.
- 1 Centrifuga para Análisis Clínicos.
- 1 Balanza de dos platos.
- 1 Piseta con agua
- 2 Microscopios Ópticos Compuestos.
- 5 Tubos de ensaye
- 1 Bolsa roja para RPBI
- 1 Contenedor rojo rígido para punzocortantes
- 2 Laminillas con muestra de sangre, previamente teñidas con Wright.
- Puntas para micropipeta (amarillas y azules)
- Agua destilada
- Solución Salina Fisiológica (SSF)
- Aceite de inmersión.

Procedimiento experimental.

- Se realizará una exposición por parte del profesor, para la explicación del uso adecuado y cuidados específicos del material de vidrio, pipetas, micropipetas y equipos que se utilizan en el laboratorio clínico, además de los procedimientos más importantes para el manejo de muestras biológicas, los principales reactivos de laboratorio clínico y la disposición de los RPBI's que se generan en los procedimientos realizados en cada práctica, por lo cual es necesario llenar la *Tabla 5.- Manejo de muestras biológicas, material de laboratorio y clasificación de RPBI's en el Laboratorio de Análisis Clínicos* y la *Tabla 6.- Disposición de RPBI's en el Laboratorio de Análisis Clínicos del CCH Azcapotzalco.*



Resultados

Tabla 5.- Manejo de muestras biológicas, material de laboratorio y clasificación de RPBI's en el Laboratorio de Análisis Clínicos.

Material	Uso	Indicaciones adicionales.

Referencias

- Santos, C. y Cols (2003). Guía para el manejo de los residuos peligrosos biológico infecciosos en unidades de salud. Secretaría de Salud. Dirección General de Planeación y Desarrollo en Salud.
- OMS (2005). MANUAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO, Ginebra, Tercera Edición
- Gutiérrez, A. (2016) Investigación Diagnóstica. Laboratorio de reactivos para diagnóstico, Multibac ID, [En línea] Recuperado el 1 de junio de 2018. De goo.gl/oY7Bk2

Tabla 6.- Disposición de RPBI's en el Laboratorio de Análisis Clínicos del CCH Azcapotzalco.

Residuos	Tipo de residuo	Contenedor (material y color)	Destino del residuo



Práctica 1.3 Lavado de Manos.

Objetivo.

Que el alumno reconozca y aplique las normas de bioseguridad para el lavado de manos, así como la normatividad para el funcionamiento de los laboratorios de Análisis Clínicos, con la finalidad de prevenir contaminaciones y el transporte de posibles infecciones, resguardando la integridad de los trabajadores del Laboratorio y de sí mismo.

Introducción

La buena salud depende en parte de un entorno seguro. Las prácticas o técnicas que controlan o previenen la transmisión de enfermedades ayudan a proteger al paciente, al personal y familiares de la amenaza de éstas.

Los pacientes corren el riesgo de sufrir infecciones debido a una menor resistencia a los microorganismos infecciosos, mayor exposición al número y al tipo de microorganismos causantes de enfermedades, y a procedimientos invasivos.

Recomendaciones: Lavarse las manos al iniciar la jornada laboral. Quitarse anillos y pulseras; antes y después de realizar algún procedimiento; antes y después de estar en contacto con pacientes, antes y después de comer e ir al baño; antes de preparar medicamentos y antes de administrarlos al paciente en el caso de ser personal que se encuentra en contacto directo con los pacientes como lo son las enfermeras; antes o después de manipular muestras en el Laboratorio. No se recomienda utilizar un lienzo de tela para secar las manos para todo el personal, ya que probablemente estén contaminadas con microorganismos. (Salazar, I., 2013)

En primer lugar, la limpieza de las manos se realiza cuando están visiblemente sucias. El lavado de las manos se realizará mediante jabón y agua para eliminar así todos los restos de suciedad evidentes. La tarea será realiza con once sencillos pasos y apenas un minuto de tiempo, que te garantizan la eliminación de todo rastro de suciedad. Pese a ello, aunque las manos estén limpias, no se deben realizar procedimientos sanitarios tras este lavado. Para evitar las infecciones asociadas a la atención sanitaria, hay que desinfectarlas mediante soluciones desinfectantes a base de alcohol.

Materiales, equipos y reactivos.

- Jabón líquido antibacterial para manos.
- Servitoallas o sanitas.

Procedimiento experimental.

Técnica

¿Cómo lavarse las manos?

¡Lávese las manos solo cuando estén visiblemente sucias! Si no, utilice la solución alcohólica

0 Duración de todo el procedimiento: 40-60 segundos



Mójese las manos con agua;



Deposite en la palma de la mano una cantidad de jabón suficiente para cubrir todas las superficies de las manos;



Frótese las palmas de las manos entre sí;



Frótese la palma de la mano derecha contra el dorso de la mano izquierda entrelazando los dedos y viceversa;



Frótese las palmas de las manos entre sí, con los dedos entrelazados;



Frótese el dorso de los dedos de una mano con la palma de la mano opuesta, agarrándose los dedos;



Frótese con un movimiento de rotación el pulgar izquierdo, atrapándolo con la palma de la mano derecha y viceversa;



Frótese la punta de los dedos de la mano derecha contra la palma de la mano izquierda, haciendo un movimiento de rotación y viceversa;



Enjuáguese las manos con agua;



Séquese con una toalla desechable;



Sírvase de la toalla para cerrar el grifo;



Sus manos son seguras.



Imagen 5.- Lavado de manos propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS) Tomado de goo.gl/v3XFyJ



- Tener a la mano y cerca de la tarja toallas de papel desechables y un dispensador de jabón líquido antibacterial (es importante que sea líquido ya que el jabón en barra no es una buena opción pues acumula microorganismos)
- Abrir la llave de agua y mojarse las manos
- Tomar una porción de jabón líquido antibacterial, frotar para formar espuma, tener precaución de frotarse las muñecas y entre los dedos, así como las uñas, siguiendo las instrucciones de la *Imagen 5.- Lavado de manos según la Organización Mundial de la Salud (OMS)*.
- Enjuagarse las manos en posición descendente, secarse con una toalla de papel y utilizar la misma toalla para cerrar la llave de agua.

Referencias.

- Salazar, I., (2013). Lavado de manos. UNAM, ENEO
- Ávila, I., Campos, M., Galván, M., Damián, R., Arellano, G., Ruíz, V. et al. (2015) Manual de Prácticas de Laboratorio de Análisis Bioquímicos Clínicos Generales., UNAM- Departamento de Ciencias Biológicas.

Práctica 1.4 Manejo de Fotocolorímetro.

Objetivo.

Que el alumno conozca y aplique la normatividad para el funcionamiento de los laboratorios de Análisis Clínicos, conociendo el fundamento y manipulación del fotocolorímetro y/o espectrofotómetro, para que adquiera destreza y habilidad en el manejo de los mismos.

Introducción.

El fotocolorímetro constituye una herramienta fundamental en el laboratorio clínico. Más del 90% de las determinaciones que se realizan en Química Clínica tienen como paso final la lectura de una Absorbancia o una Transmitancia. El correcto desempeño de los fotocolorímetros es entonces determinante, en última instancia, de la calidad analítica de los resultados que emite el laboratorio.

Se deberán llevar registros que certifiquen dichos controles; los estándares de calidad del instrumental deberán cumplirse y por el contrario si algún parámetro estuviera fuera de rango, es conveniente realizar la reparación del instrumento a través de un servicio técnico acreditado y luego volver a verificar el buen funcionamiento (Duymovich, C., Acheme, R., Sesini, S. y Mazziotta, D., 2005)

La espectrofotometría de absorción es usada con moléculas disueltas en una solución acuosa. La absorbancia de un soluto depende linealmente de la concentración y por consiguiente la espectrofotometría de absorción es ideal para hacer mediciones cuantitativas. La longitud de absorción y la fuerza de absorbancia de una molécula no sólo depende de la naturaleza química, si no del ambiente molecular en donde se encuentre la molécula que da el color.

Cuando un rayo de luz, de determinada longitud de onda, incide perpendicularmente sobre una solución, de un compuesto químico que absorbe luz (cromóforo), absorberá una parte del rayo y dejará pasar el resto, este fenómeno se conoce como absorbancia, mientras que la transmitancia de una sustancia en solución, es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra y la cantidad de luz que incidió sobre ella, se representa normalmente en porcentaje (%)



Un procedimiento analítico muy utilizado en análisis cuantitativo, en los Laboratorios de Análisis Clínicos es el de Calibración, que implica la construcción de una “Curva de Calibración” que es la representación gráfica de una señal que se mide un equipo como el espectrofotómetro o el fotocolorímetro, entre otros, en función de la concentración de un analito a determinar. La calibración incluye la selección de un modelo para estimar los parámetros que permitan determinar la linealidad de esa curva y, en consecuencia, la capacidad de un método analítico para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de un compuesto en una muestra.

Por otra parte, cuando se realiza la preparación de las soluciones que serán utilizadas para la lectura en el fotocolorímetro, es importante definir que el Blanco o Blanco de reactivo es una solución compuesta únicamente por reactivo que se utiliza para llevar a cabo la reacción que dará lugar al compuesto que se busca cuantificar. Medir la absorbancia del Blanco de reactivo es importante ya que en la mayoría de los casos el reactivo tiene un color propio que no está relacionado con el complejo colorimétrico del que se desea conocer su concentración.

El patrón es una solución que se utiliza como referencia, y que se encuentra compuesta por una cantidad conocida del analito que se desea cuantificar y el reactivo específico para la determinación. La lectura que se realiza en el equipo es importante ya que es un parámetro de la concentración que puede presentarse en una determinada muestra.

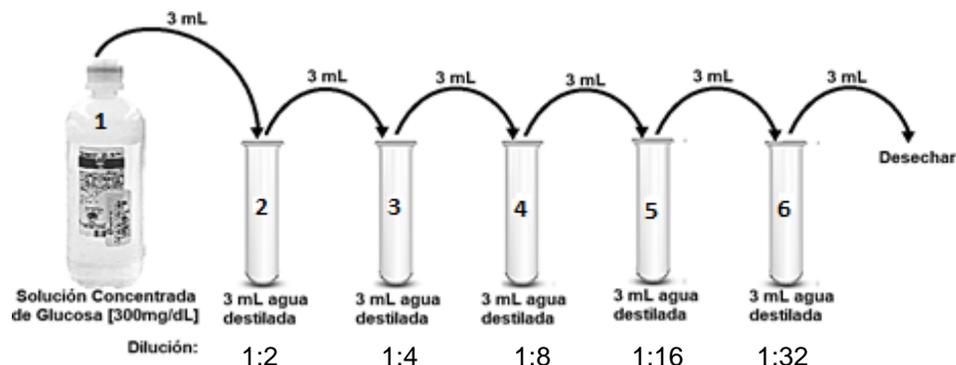
Materiales, equipos y reactivos.

- Fotocolorímetro / Espectrofotómetro UV-Vis
- Calculadora Científica
- Matraces Volumétricos de 10 mL.
- Pipeta volumétrica de 1, 2, 3, y 4 mL.
- Solución Patrón de Glucosa [300 mg/dL]
- Tubos de ensaye 13 x 100
- Agua destilada
- Reactivo GOD/POD para la determinación de Glucosa sérica.

Procedimiento experimental.

1.4.1 Preparación de la Curva de Calibración de Glucosa.

- Los alumnos realizarán las diluciones de la **Solución Patrón** de Glucosa [300 mg/dL] (sistemas) de acuerdo a las indicaciones correspondientes del siguiente diagrama:



- Encender el Espectrofotómetro de Ultravioleta-Vis y calentar por aproximadamente 15 minutos antes de su manipulación, en caso de utilizarlo, y tener a la mano un pañuelo de papel desechable.
- Una vez realizados los sistemas anteriores; rotular tubos de ensaye distintos como: Sistema 1, Sistema 2, Sistema 3, Sistema 4, Sistema 5 y Sistema 6.
- Es necesario preparar tubos con el Blanco de Reactivo (Tubo 1) y Patrón del Reactivo (Tubo 2); El profesor responsable de la sesión indicará a las personas que prepararán dichos tubos.
- Preparar los tubos de acuerdo a las siguientes indicaciones:

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
	Blanco	Patrón	Sistema
Reactivo (mL)	2.0	2.0	2.0
Patrón (uL)		20	
Muestra (uL)			20

Nota: La solución Patrón es la solución concentrada de Glucosa [300 mg/dL]



- Mezclar e incubar 5 minutos a 37 °C o 10 min a temperatura ambiente 15-25 °C.
- Leer la absorbancia del Patrón y la muestra, como se menciona a continuación, frente al Blanco de reactivo. El color es estable 30 minutos.
- Dependiendo del espectro de absorción de la muestra es como se selecciona la longitud de onda a la que se lee, en caso de utilizar espectrofotómetro (Para esta determinación es de 540 nm)
- Calibrar el espectrofotómetro/fotocolorímetro a 0 de Absorbancia y a 100 de Transmitancia usado el tubo “Blanco”. Llenando una cubeta o celda espectrofotómetro para el espectrofotómetro con 1mL de agua destilada o bien un tubo de ensaye con el reactivo GOD/POD en caso de utilizar fotocolorímetro y colocándola en la misma dirección que el haz de luz realizar la medición. Tal y como se muestra en la siguiente *Imagen 6. Dirección del haz de luz de fotocolorímetro / espectrofotómetro.*



Imagen 6.- Dirección del haz de luz de Fotocolorímetro / Espectrofotómetro. Tomado de goo.gl/7QjGvn.

- Registrar la lectura de absorbancia que emita el equipo y anotar nuevamente la dilución para cada sistema, para recabar los datos de la *Tabla 7.- Resultados experimentales del manejo de Fotocolorímetro.*

Resultados

Tabla 7.- Resultados experimentales del manejo de Colorímetro.

Sistema	Dilución	Absorbancia	Concentración
1	1:1		300 mg/dL
2			
3			
4			
5			
6			

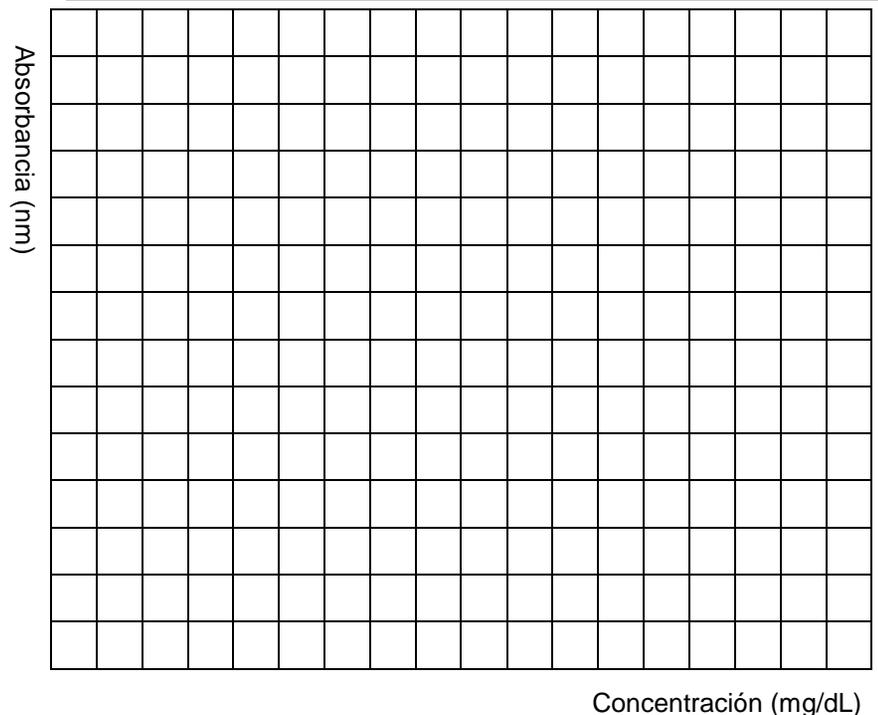
- Para conocer la concentración de cada sistema, es necesario aplicar la fórmula que se expresa a continuación:

$$[\text{Sistemas}] = \frac{[\text{Solución Glucosa}] * \text{Volumen soln Glucosa añadido}}{\text{Volumen total}}$$

- Por ejemplo para conocer la concentración del Sistema 1 la ecuación queda de la siguiente manera:

$$[\text{Sistema 1}] = \frac{300\text{mg/dL} * 3\text{mL}}{3\text{mL}} = 300 \text{ mg/dL}$$

- Cuando se conocen las diluciones así como las concentraciones de los sistemas y las absorbancias de cada uno de ellos es necesario realizar la construcción de un Gráfico, con ayuda de la cuadrícula que se encuentra a continuación; Esto le ayudará a conocer si la Curva de Calibración tiene linealidad, con lo que es posible dar paso a la realización de la ecuación de la Curva de Calibración.



A continuación, es importante conocer la ecuación de la Curva de Calibración, que se obtendrá tras sustituir los valores antes obtenidos de m y b.

$$y = mx + b.$$

Colocar la ecuación sustituida en la siguiente ecuación:

$$y = \underline{\hspace{2cm}}x + \underline{\hspace{2cm}}$$

- Por último es necesario despejar a la incógnita “x” para conocer la concentración de alguna solución problema de Glucosa que se encuentre dentro de los rangos de la Curva de calibración antes obtenida. Problema.

Realizar los cálculos necesarios en el siguiente espacio:

- Para comprobar que los puntos del Gráfico anterior son “Confiables” o bien que la Curva de Calibración tiende a la linealidad, que es el modelo matemático de una ecuación de primer grado, es necesario obtener los valores de la ordenada al origen, la pendiente y el coeficiente de correlación (r^2). En la ecuación $y = mx + b$.

Donde “m” es igual a la pendiente de la recta.

“x” es igual a la incógnita y “b” es la ordenada al origen o bien el punto en “x” de donde parte la curva.

Dichos puntos se obtendrán tras un procedimiento matemático utilizando la calculadora científica.

$$m = \underline{\hspace{2cm}}. \quad r = \underline{\hspace{2cm}}.$$

$$b = \underline{\hspace{2cm}}. \quad r^2 = \underline{\hspace{2cm}}.$$

Referencias.

- Duymovich, C., Acheme, R., Sesini, S. y Mazziotta, D. (2005) PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DE CALIDAD, Espectrofotómetros y Fotocolorímetros, Guía práctica de actualización. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. v.39 n.4 La Plata sept./dic.



Práctica 1.5 Manejo de Centrifuga

Objetivo.

Que el alumno conozca y aplique la normatividad para el funcionamiento de los laboratorios de Análisis Clínicos, verificando la limpieza, mantenimiento y conservación de materiales, reactivos y equipos de laboratorio utilizados en la práctica diaria como lo es la Centrifuga, para que adquiera destreza y habilidad en el manejo de los mismos.

Introducción.

La palabra centrífuga proviene de la palabra latina *centrum* que significa centro y *fugare* que significa huir. La centrifuga es el equipo que nos proporciona la técnica de separación basada en el movimiento de partículas por rotación y aceleración centrífuga de modo que, sometidas a altas velocidades durante cortos periodos de tiempo, permiten la sedimentación de los componentes de una suspensión homogénea según sus diferentes densidades.

Los movimientos rotacionales permiten generar fuerzas mucho más grandes que la gravedad, en periodos controlados de tiempo. Las unidades de esta fuerza se expresan en número de veces que la fuerza centrífuga supera a la fuerza de gravedad (Facultad de Química, s.f.)

Cabe mencionar que las siglas mayormente utilizadas cuando se habla de centrifugación RPM, significa revoluciones por minuto, que son el número de giros que genera la centrifugan, por minuto.

De esta manera, dicha suspensión queda finalmente separada en dos fracciones, la fracción sobrenadante y la fracción sedimentada que queda depositada en el fondo del tubo de centrifugación. Extensamente empleada en los campos de la Biología, la Bioquímica o la Medicina. La centrífuga es un equipo básico en los laboratorios de análisis para la separación y purificación de numerosas macromoléculas (proteínas, DNA, RNA, células o fracciones celulares) y la separación sanguínea en plasma o suero y el paquete globular).

Esencialmente la centrifugación es una decantación selectiva de los componentes insolubles de una mezcla bajo condiciones de gravedad artificial. En los laboratorios existe una gran variedad de centrifugas las cuales pueden ser clasificadas de muy diversas formas.

Cabe mencionar que las siglas mayormente utilizadas cuando se habla de centrifugación RPM, significan Revoluciones Por Minuto, que

son también el número de giros que da el rotor de la centrifuga por minuto y que depende de su diámetro, a mayor diámetro son menores las revoluciones que ocurren por minuto y en caso contrario a menor diámetro es mayor el número de revoluciones por minuto.

Materiales, equipos y reactivos.

- Centrifuga de 500-3500rpm.
- Balanza de dos platos.
- Camisas para centrifuga.
- Muestra sanguínea en tubos con anticoagulante y sin anticoagulante debidamente rotulados.

Procedimiento experimental.

- Calibrar el peso de los tubos y las camisas, colocándolos en una balanza de dos platos y añadiendo agua para obtener pesos similares.
- Ya con las camisas calibradas y con los tubos dentro, colocarlos en los soportes del rotor de la centrifuga, frente a frente para equilibrar el peso.
- Programar la Centrifuga seleccionando la velocidad de la centrifugación (2500rpm/ 5minutos), cronometrar el tiempo con un dispositivo independiente al aparato de centrifugación.
- Dar marcha a la centrifuga, girando la perilla, teniendo en cuenta que cada marca equivale a 500rpm (revoluciones por minuto). Esperar a que termine el tiempo, en caso de que el equipo marque un error, es necesario retirar las camisas con los tubos y verificar que se encuentren correctamente equilibradas.
- Una vez terminado el tiempo de centrifugado, girar la perilla en retroceso y esperar a que el equipo se detenga por completo y retirar los tubos teniendo cuidado de no resuspender el contenido.
- Colocar en la sección de resultados el centrifugado obtenido e indicar si se trata de suero o plasma.



Resultados.

Sangre centrifugada con anticoagulante Tapón lila.	Sangre centrifugada sin anticoagulante. Tapón rojo
	
Observaciones.	

Referencias.

- Facultad de Química. (s.f.) Procesos de Separación Prácticas de Laboratorio. Laboratorio de Ingeniería Química UNAM. Recuperado el 04 de febrero de 2018.
- Ávila, I., Campos, M., et al. (2015) Manual de Prácticas de Laboratorio de Análisis Bioquímicos Clínicos Generales., UNAM- Departamento de Ciencias Biológicas.

Práctica 1.6 Manejo de Microscopio Óptico Compuesto.

Objetivo.

Que el alumno aplique los conocimientos adquiridos en la teoría para una correcta manipulación de los equipos de laboratorio utilizados en la práctica diaria, como es el microscopio óptico, con la finalidad de adquirir habilidad y destreza.

Introducción.

La microscopia directa es indispensable en el Laboratorio de Análisis Clínicos. El uso correcto del microscopio implica conocer al menos, en lo general sus componentes y el papel que éstos desempeñan.

Los sistemas presentes en un microscopio son:

- 1.- Sistema de soporte
- 2.- Sistema de Óptico
- 3.- Sistema de Iluminación
- 4.- Sistema de Ajuste.

El sistema de soporte también conocido como sistema mecánico es el esqueleto o armazón del microscopio, el cual proporciona soporte y estabilidad al equipo. Está integrado por:

- 1.1** Tubo de microscopio: El cual es de forma cilíndrica, en su parte superior sostiene a la lente o lentes oculares y en la parte inferior se encuentra el sistema de lentes objetivos.
- 1.2** Revólver: Es la parte circular en la que se encuentran atornilladas las diferentes lentes objetivos, al girar el revolver cambian las lentes objetivos sin que se desenfoque la preparación.
- 1.3** Platina: Pieza metálica cuadrada o circular, con un orificio central sobre el que se colocan las preparaciones a observar y por el que atraviesa el rayo luminoso. Puede ser fija o estar provista de tornillos de desplazamiento que nos permiten centrar la preparación o buscar diferentes campos de observación.
- 1.4** Base o Pie: Es la base sobre la que descansa el aparato y le da estabilidad.



1.5 Brazo o columna: Es la parte que sostiene el tubo y su mecanismo de desplazamiento vertical formado por los tornillos macrométrico y micrométrico.

El sistema óptico es un conjunto de lentes que se dividen en dos grupos:

2.1 Los lentes del extremo inferior del tubo los cuales se denominan Objetivos, se encuentran inmediatamente arriba de la preparación y u objeto a determinar; En la superficie de los tubos de los objetivos se encuentra una línea de un color diferente para cada Objetivo, ésta identifica el número de aumentos que produce así el color amarillo identifica al objetivo de 10x que aumenta 100 a 150 veces el tamaño de la preparación vista al microscopio dependiendo del aumento que tenga el ocular, en consecuencia el 40x de color azul y 100x (de inmersión) identificado en color blanco.

2.2 Y los lentes del extremo superior, se llaman oculares, que son los lentes por donde mira el investigador y tendrán un aumento de 10x. (De ahí que el aumento con objetivo de 10x sea llamado de 1,000 aumentos) (Pérez, M. s.f.)

El sistema de iluminación está constituido por las partes del microscopio que producen, captan, reflejan y regulan la intensidad de la luz que se utiliza para la observación microscópica:

Uno de los aspectos críticos a considerar en la microscopía óptica es la fuente de luz que se emplea para iluminar a la muestra. Si la muestra es iluminada de manera inadecuada, la calidad de la imagen que se obtiene se verá afectada, aun cuando se disponga de un excelente sistema óptico. La iluminación óptima debe ser brillante, sin resplandores y en lo posible debe dispersarse de manera uniforme en el campo de observación. (Pérez, M. s.f.)

El sistema de Ajuste que comprende las siguientes partes de microscopio: Al sistema de ajuste de los oculares, el tornillo que permite mover el cabezal, tornillos reguladores de la platina, tornillos del condensador y la palanca de cierre del diafragma; los cuales funcionan básicamente para enfocar la muestra que se está observando y obtener una imagen nítida, que pueda servir para orientar en el diagnóstico médico. En general, un microscopio óptico de un ocular se observa como el que se muestra en la *Imagen 7.- Componentes del Microscopio Óptico Compuesto*.

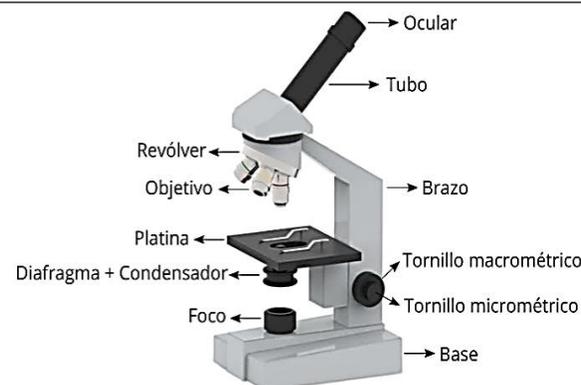


Imagen 7.- Componentes del Microscopio Óptico Compuesto.
Tomado de goo.gl/S7Hh7H

Materiales, equipos y reactivos.

- 1 Microscopio Óptico Compuesto.
- 2 Frotis sanguíneos teñidos con Wright.
- Aceite de inmersión.
- 1 paño de microfibra.

Procedimiento experimental.

- Comentar en grupo sobre el uso adecuado y cuidados del Microscopio Óptico Compuesto.
- Verificar que la platina se encuentre en el tope inferior.
- Limpiar los lentes de los objetivos con un paño de microfibra (Paño para lentes) sin ningún líquido o solución limpiadora.
- Una vez limpios los objetivos, conectar y encender el equipo; colocar la cámara de Neubauer y ubicar la cuadrícula con el objetivo de 10x.
- Comenzar a enfocar utilizando el objetivo mencionado.
- Subir la platina empleando el tornillo macrométrico hasta visualizar la cuadrícula de la cámara, posteriormente enfocar nítidamente la muestra con el torillo micrométrico.
- Ajustar la iluminación mediante el control de intensidad de luz y de la palanca de apertura del condensador.



- Después de observar con el objetivo de 10x, cambiarlo por el de 40x, girando el revólver. Si el microscopio está bien ajustado no deberá desenfocarse con el cambio de objetivo.
- Observar la cuadrícula en 40x identificando las partes y características de la misma, para que la imagen sea más nítida, utilice el tornillo micrométrico.
- Posterior a la observación, bajar la platina unos centímetros para retirar la cámara de Neubauer.
- Colocar una laminilla con muestra sanguínea fijada y teñida.
- Comenzar a enfocar con el objetivo de 10x y utilizando el tornillo macrométrico hasta obtener una imagen, a partir de este momento ya no es necesario utilizar este tornillo, con ayuda del tornillo micrométrico enfocar nítidamente la muestra. Después de observar a ese aumento cambiar y observar con el objetivo de 40x enfocando nítidamente de nuevo con ayuda del tornillo micrométrico.
- Una vez visualizada con el objetivo de 40x, pasar del objetivo de éste al de 100x, es necesario girar nuevamente el revólver.
- Detenerse entre el objetivo de 40x y 100x, para colocar una gota de aceite de inmersión, que formará un “puente” por donde pase la luz entre el objetivo y la laminilla, tal y como se muestra en la *Imagen 8.- Esquema de la dispersión de la luz procedente de una muestra sin y con aceite de inmersión*. Como se mencionó anteriormente, solo es necesario mover el tornillo micrométrico para obtener una imagen nítida de la muestra. En esta parte si lo considera necesario puede aumentar la intensidad de la luz, girando el botón de intensidad.
- Una vez visualizado con el objetivo de inmersión, bajar la platina unos centímetros para retirar la laminilla.
- Limpiar los lentes de los objetivos con un paño de microfibra (Paño para lentes) sin ningún líquido o solución limpiadora.

- Una vez limpios los objetivos, apagar el equipo y guardarlo en el área asignada.
- Colocar los resultados obtenidos en la sección de resultados en la *Tabla 8. Manejo de Microscopio Óptico Compuesto visualizando la Cámara de Neubauer* y la *Tabla 9.- Resultados del Manejo de Microscopio Óptico Compuesto visualizando la laminilla con muestra sanguínea*.

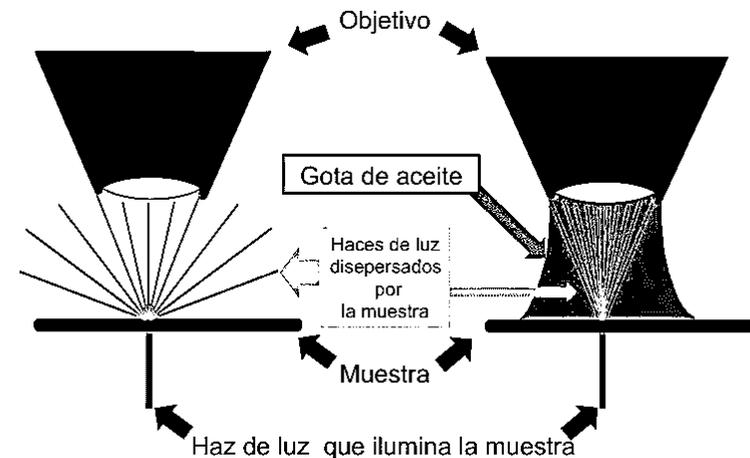


Imagen 8.- Esquema de la dispersión de la luz procedente de una muestra sin y con aceite de inmersión. Tomado de goo.gl/CmB51d.

Resultados.

Tabla 8.- Resultados del Manejo de Microscopio Óptico Compuesto visualizando la Cámara de Neubauer.

Objetivo	Cámara de Neubauer, Generar un dibujo de lo que se observó en los diferentes aumentos.
10x	



40x	
------------	--

Referencias.

- Ávila, I., Campos, M., et al. (2015) Manual de Prácticas de Laboratorio de Análisis Bioquímicos Clínicos Generales., UNAM- Departamento de ciencias Biológicas.
- Lavado de manos propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (s.f) Tomado de goo.gl/v3XFyJ.
- NOM-007-SSA1-2011 Y NOM-087-ECOL-SSA1-2002.
- Partes del Microscopio Óptico compuesto. (s.f) Tomado de goo.gl/S7Hh7H.
- Pérez, M. (s.f.) El microscopio: Equipo fundamental en el laboratorio de Biología. UAEH. [En línea]. Recuperado el 06 de febrero de 2018. De goo.gl/Y6XTBp.

Tabla 9.- Resultados del Manejo de Microscopio Óptico Compuesto visualizando la laminilla con muestra sanguínea.

Objetivo	Laminilla, Generar un dibujo de lo que se observó en los diferentes aumentos.
10x	
40x	
100x	



MÓDULO 2. EXAMEN GENERAL DE ORINA.

Práctica 7. Examen General de Orina.

Objetivo.

Con base en los principios anatómicos y fisiológicos del sistema urinario, que el alumno conozca y realice las pruebas que conforman el Examen General de Orina (examen físico, químico y microscópico) y conozca las alternativas actuales de los métodos automatizados, como un recurso de apoyo diagnóstico del médico con la finalidad de obtener resultados confiables que le permitan integrar e interpretar los resultados para evaluar el estado patológico del paciente.

Introducción.

Los análisis de orina realizados en el laboratorio clínico, pueden proporcionar una información amplia, variada y útil del Sistema Renal de un individuo y de las enfermedades sistémicas que pueden afectar este órgano excretor. Por medio de este análisis, es posible dilucidar tanto desórdenes estructurales (anatómicos) como desórdenes funcionales (fisiológicas) del riñón y del tracto urinario inferior, sus causas, y su pronóstico.

La realización cuidadosa del examen de orina, por parte del laboratorio, ayuda al diagnóstico diferencial de numerosas enfermedades del sistema urinario. Usualmente, los datos de laboratorio obtenidos por medio de este análisis, se logran sin dolor, invasión o tensión para el paciente. Esta es la razón por la cual, éste análisis permanecerá siempre como una herramienta esencial en la práctica clínica. (Velázquez, R., 2009).

En la actualidad se practican tres tipos de análisis a la orina: físico, químico y microscópico o Citodiagnóstico; En éste examen, el procedimiento se compone de:

- 1) Un análisis físico (o macroscópico), en el cual se determinan las características físicas de la muestra como: Apariencia o Aspecto, Color, Olor y Densidad.
- 2) Un análisis químico que involucra la medición de constituyentes

químicos por medio de colchones impregnados con distintos reactivos a lo largo de la tira reactiva para uroanálisis.

3) Un análisis microscópico o citodiagnóstico es un estudio esencial para la detección de estructuras como presencia de hematíes en orina (hematuria), presencia de leucocitos en orina (piuria), presencia de estructuras cilíndricas formadas por mucoproteína precipitada por diversos factores como presencia de sales y el pH, en orina (cilindruria), presencia de estructuras formadas por varios constituyentes químicos que se saturan o sufren cambios en su solubilidad, en orina (cristaluria), otras células en orina como: células epiteliales de dos tipos: de descamación y células de transición de la vejiga, entre otros (Velázquez, R., 2009).

Desde hace varios años, el citodiagnóstico de la orina ha ganado aceptación médica como un análisis, más sensible en el diagnóstico de ciertas patologías renales y del tracto urinario; Como este análisis requiere mayor inversión de tiempo debido a la preparación de coloraciones, debe reservarse para pacientes sintomáticos con enfermedades renales, del tracto urinario inferior, o neoplasias (Kaplan, A., Lawrence, A. y Pesce, J., 1996). Dicho análisis debe ser realizado por un profesional especialista en el área, que ubique y reconozca por completo las estructuras que se puedan encontrar en la muestra de orina. El uso de la tira reactiva para uroanálisis a lo largo del tiempo ha permitido que este estudio se realice de manera sencilla y con costos cada vez más accesibles. Por medio de este simple examen de orina, un especialista puede detectar y monitorear muchas entidades que afectan al riñón y al tracto urinario inferior. Es indispensable conocer las partes de la nefrona y como se lleva a cabo la reabsorción de nutrientes por lo cual se presenta la siguiente *Imagen 9.- Partes y funciones de la nefrona.*

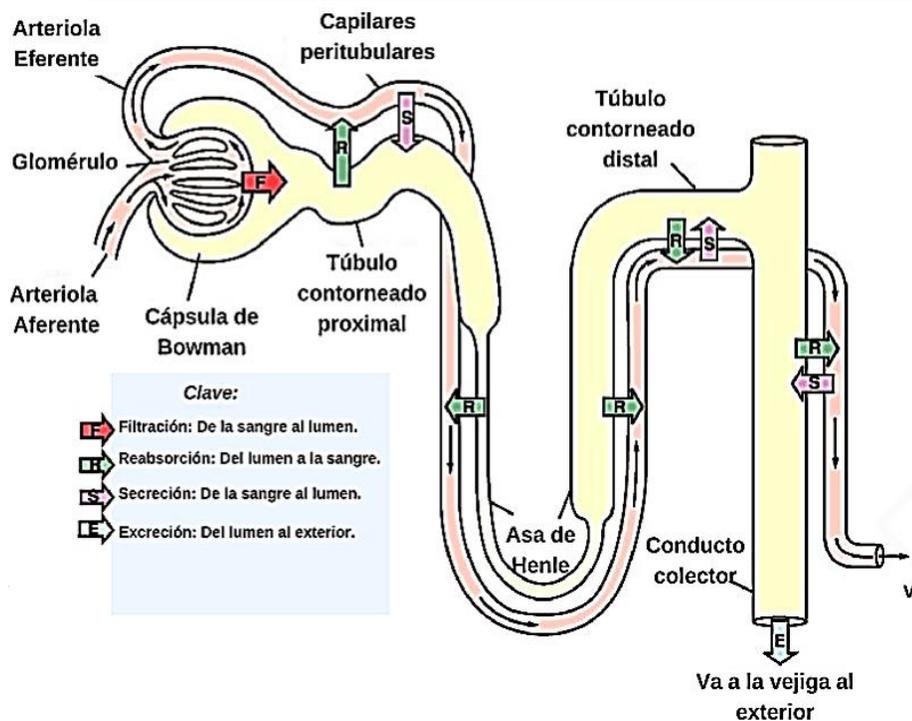


Imagen 9.- Partes y funciones de la nefrona. Tomado de goo.gl/W5Ybgk.

Equipos reactivos y materiales.

Muestras biológicas.

- 5-10mL de orina con menos de 2 horas tras su obtención.

Material por grupo.

- 1 Gradilla de unicel.
- Tubos de ensaye de 13x100 mm
- Servitoallas
- Recipiente con solución de hipoclorito de sodio al 5%.
- Gasas
- **Reactivos.**
- Tiras reactivas para uroanálisis.

Procedimiento experimental.

Indicaciones para el paciente:

- Obtener la primera orina de la mañana.
- Lavarse correctamente las manos con agua y jabón antibacterial. Es importante la adquisición de un frasco de boca ancha, de plástico nuevo, limpio, transparente e identificado correctamente con los datos del paciente.
- En el caso de varones, en caso no se estar circuncidado, retraer el prepucio usando un pañuelo desechable que no genere pelusa, limpiar la cabeza del pene incluyendo la uretra. Como se indica en la *Imagen 10.- Método adecuado de obtención de muestra urinaria para mujer y hombre.*
- Destapar el frasco para obtener la muestra, teniendo cuidado de no tocar la parte interior de la tapa del recipiente.
- En el caso de mujeres se debe sentar en el inodoro y separar los labios vaginales con una mano, manteniendo los pliegues separados, limpiar la zona entre los labios y la uretra, con movimientos de adelante hacia atrás. Como se indica en la *Imagen 10.- Método adecuado de obtención de muestra urinaria para mujer y hombre*
- Permitir la micción, desechando una pequeña porción del líquido en el inodoro. Después de pasar uno o dos segundos, depositar el chorro intermedio de la primera micción matutina, que se obtiene como se indica en el punto anterior.
- Recolectar aproximadamente de 30-50mL (La mitad del frasco que se utiliza comúnmente) de muestra y terminar de orinar en el inodoro.
- Cerrar herméticamente y almacenar para su transporte.
- La identificación del frasco con la muestra se realizará en el Laboratorio que solicita dicha evaluación.

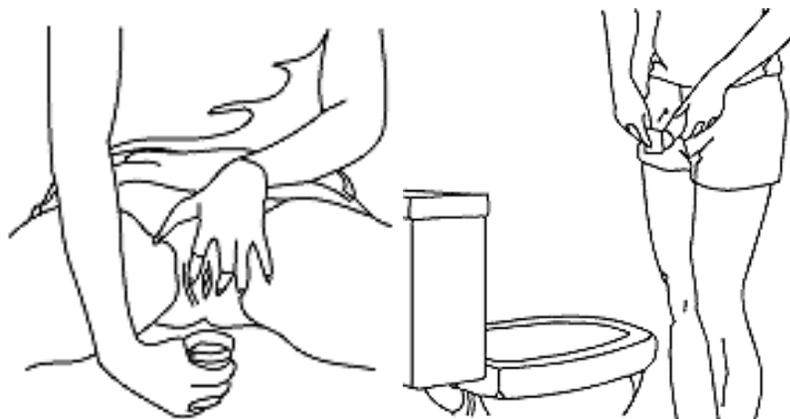


Imagen 10.- Método adecuado de obtención de muestra urinaria para mujer y hombre. Tomado de goo.gl/GerjBM.

Estabilidad de la muestra.

- Para que los resultados del examen general de orina sean precisos, es esencial que la orina sea examinada dentro de las dos horas siguientes a su recolección o preservada de alguna manera, usualmente por refrigeración (2° a 8 °C). Por lo cual se pueden usar fijadores o conservadores, éstos actúan impidiendo los cambios químicos asociados a la descomposición y previniendo el crecimiento y metabolismo de los microorganismos, pero favorecen la precipitación de cristales urinarios.

2.1.1 Examen Físico o análisis macroscópico (Color, Olor, Aspecto y Densidad)

Fundamento:

El color de la orina está determinado, en gran medida, por su grado de concentración. La coloración de la orina está dada por pigmentos urocromicos (urobilina y uroeritrina). Una orina normal con menos de dos horas de haber sido obtenida y proveniente de una persona sana tiene un olor característico, que es denominado: *sui generis*; Un olor desagradable, puede indicar diversas situaciones, como que el espécimen tenga mucho tiempo de haber sido recolectado y no ser adecuado para obtener un análisis preciso o una patología por la que se encuentre cursando el paciente. La turbidez de la orina depende de los solutos suspendidos en la muestra.

Técnica:

- Mezclar la orina suavemente en el recipiente donde se encuentra, teniendo precaución de no derramarla, vaciar a tres cuartas partes en un tubo de ensaye de 13x100 mm.
- Evaluar las características de la orina como son: Color, Olor, la presencia o ausencia de turbidez (Aspecto) y Densidad (evaluada en la tira reactiva para uroanálisis).
- Registrar en la *Tabla 11.- Resultados experimentales para el análisis Físico*. Localizada en la sección de Resultados de esta práctica.

Valores de Referencia del Examen Físico.

Color: Desde incolora hasta amarillo oscuro.

Olor: *sui generis*.

Aspecto: Translucido.

Densidad: 1.003-1.030g/mL.

Significado Clínico:

Color: Las variaciones en esta determinación se deben a la dieta, estilo de vida, la actividad física que se realice o bien diversas situaciones patológicas.

Olor: El olor puede también dar señales de ciertas anormalidades de la orina. Un olor parecido al amoniac, es sugestivo de presencia de bacterias degradadoras de la urea, un olor a frutas indica la presencia de acetona (cetona), un olor dulce es sugestivo de la presencia de glucosa u otros azúcares, un olor fétido es sugestivo de infección.

Aspecto: Cuando la orina se deja reposar, se precipitan cristales amorfos, generalmente uratos, produciendo turbidez.

Densidad: Valores de densidad específica iguales o superiores a 1.035 indican la presencia de solutos extraños, lo cual debe ser investigado. Una disminución de la misma se observa en pacientes quienes usan diuréticos (Ávila, I., Campos, M., et al. 2015).



2.1.2 Examen Químico.

Fundamento:

Tiras reactivas para uroanálisis, que al sumergirlas en orina del paciente, pondrán de manifiesto reacciones químicas de tipo semicuantitativo; llevadas a cabo en las almohadillas de la tira para la determinación de sustancias presentes en la misma, que desempeñan un papel importante en el diagnóstico de trastornos renales, urinarios, hepáticos y metabólicos.

Gravedad específica: El ensayo detecta la concentración de iones en la orina. En presencia de cationes, un formador de complejos libera a los protones que producen un cambio cromático en la solución indicadora azul de bromotimol, el cual cambia del azul al amarillo pasando por el azul verdoso.

pH: El papel de ensayo contiene los indicadores rojo de metilo, fenolftaleína y azul de bromotimol y reacciona específicamente con los iones H^+ . El pH de la orina fresca de personas sanas se sitúa normalmente entre 5 y 6.

Leucocitos (LEU): Los leucocitos en la orina se detectan por acción de la esterasa presente en los leucocitos granulados que catalizan la hidrólisis de un éster de ácido indoxilcarbónico a indoxilo. El indoxilo formado reacciona con una sal de diazonio produciendo un colorante púrpura.

Nitrito (NIT): El test se basa en el principio del ensayo de Griess y es específico para el nitrito. La reacción revela la presencia de nitrito y por lo tanto indirectamente la existencia en orina de bacterias formadoras de nitrito tiñendo la zona reactiva de color rosa rojizo. La más leve coloración rosada indica una bacteriuria significativa.

Proteína (PRO): El test se basa en el principio de error proteico de un indicador del pH. De particular sensibilidad frente a la albúmina. Un pH de hasta 9, no afecta el test.

Glucosa (GLU): La determinación de glucosa se basa en la reacción específica de la glucosaoxidasa/peroxidasa (método GOD/POD). El ensayo no depende del pH ni de la densidad específica de la orina ni se ve afectado por la presencia de cuerpos cetónicos.

Cuerpos cetónicos (KET): El ensayo se basa en el principio del test de Legal y presenta una mayor sensibilidad frente al ácido acetoacético que a la acetona.

Urobilinógeno (UBG): Una sal de diazonio estable reacciona casi inmediatamente con el urobilinógeno dando lugar a la formación de un colorante azoico rojo. La presente prueba es específica para el urobilinógeno y no se ve afectada por los factores interferentes que se sabe afectan el ensayo de Ehrlich.

Bilirrubina (BIL): El ensayo se basa en la unión de la bilirrubina a una sal diazoica. La más leve coloración rosada indica un resultado positivo, es decir, patológico. Otros elementos de la orina producen una coloración amarilla de diversa intensidad.

Sangre (ERY/Hb): La hemoglobina y la mioglobina actúan de forma similar a la peroxidasa catalizando específicamente la oxidación del indicador por el hidróperóxido orgánico contenido en la tira de papel que proporciona una coloración azul-verdosa.

Área de compensación (COMP): Esta zona blanca, sin reactivos, permite al instrumento compensar el color intrínseco de la orina durante el análisis de leucocitos, nitrito, proteína, glucosa, cuerpos cetónicos, urobilinógeno, bilirrubina y eritrocitos (Cobas®).

Técnica

- Use orina fresca sin centrifugar. Mezcle bien la muestra de orina. Analice la muestra a temperatura ambiente y dentro de las dos horas posteriores a la extracción.
- Saque una tira reactiva del tubo. Tape el tubo inmediatamente con el tapón desecante original para evitar que, debido a la entrada de humedad, se obtengan resultados erróneos por zonas de test descoloridas.
- Sumerja brevemente la tira en la orina (aproximadamente 2 segundos) asegurándose de mojar todas las zonas del test.
- Al retirar la tira, escurra el exceso de orina en el borde del recipiente o en papel absorbente.



- En caso de lectura visual, espere 60 segundos (60-120 segundos para la zona de test de leucocitos) y compare los colores de reacción de las zonas de test con la escala cromática indicada en la etiqueta del frasco. Asigne al color de reacción observado el color más parecido del bloque de colores. Como se muestra en la *Imagen11.- Técnica de uso de las Tiras Reactivas para Uroanálisis*, sin que la tira toque la etiqueta del frasco.

En el caso de la última determinación, compare la zona de test para sangre con ambas referencias cromáticas, puesto que para los eritrocitos y la hemoglobina se indican dos escalas cromáticas diferentes (Cobas®)

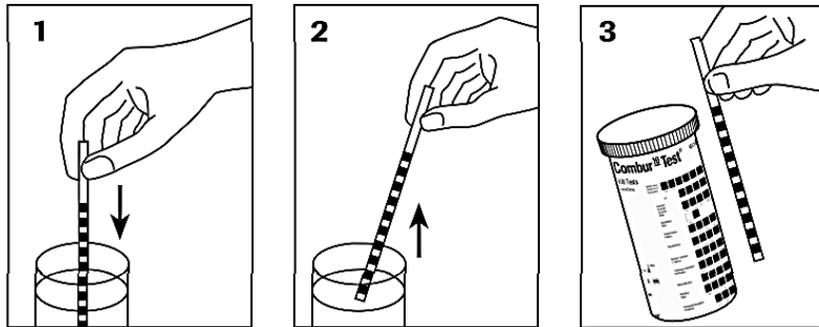


Imagen 11.- Técnica de uso de las Tiras Reactivas para Uroanálisis. Tomado de Cobas®

- Reportar los resultados en el orden que indica en la etiqueta del frasco, y reportándolo en la *Tabla 12.- Resultados experimentales, para el análisis Químico*. Localizada en la sección de Resultados de esta práctica.

Valores de Referencia.

Gravedad Específica / Densidad: 1.003 – 1.030 g/mL.
Proteínas: Menor a 100 mg/dL.
Glucosa: Negativo.
Cetonas: Negativo.
Sangre: Negativo.

Bilirrubinas: Negativo.
Urobilinógeno: 0.1 y 1 mg/dL
Nitritos: No deben estar presentes.
pH: 4.7-7.8

Leucocitos: Negativo.

Significado Clínico:

Proteínas: Una vez filtradas las proteínas son casi completamente reabsorbidas en el túbulo proximal. La proteinuria, por lo tanto, puede ser el resultado tanto de un incremento en la filtración como de una disminución en la reabsorción (función tubular).

Glucosa: Al alcanzarse una concentración plasmática superior a 180 mg/dL derivado principalmente por diabetes se rebasa el umbral renal para este carbohidrato y comienza a ser excretado, ya que no es reabsorbido en el microtúbulo proximal; Otra causa es la pérdida de la función renal, ya que al no existir una función adecuada, tampoco está presente la reabsorción normal.

Cetonas: La determinación de cetonas es importante en el monitoreo de la diabetes y de la cetoacidosis y debe realizarse siempre que se determinen azúcares.

Sangre: La hematuria gruesa o macroscópica implica hemorragia o sangrado fresco, lo que en un medio de orina ácida, da como resultado una apariencia de roja a parda, turbia, o ahumada.

Bilirrubina: Los pacientes ictericos con enfermedades como hepatitis o enfermedad obstructiva como cirrosis biliar, pueden tener bilirrubina conjugada en la orina.

Urobilinógeno: Se encuentra disminuido en niños deficientes en bacterias intestinales; en pacientes después de la administración de antibióticos que reducen la flora intestinal, y en pacientes con enfermedades obstructivas hepáticas. Se encuentra un aumento del urobilinógeno en pacientes con anemias hemolíticas (aumento de formación de bilirrubina) y disfunción hepática.

Nitritos: En orinas que se analizan después de cuatro horas tras su obtención, el ensayo de nitritos puede ser positivo como resultado de la contaminación con bacterias después de la micción. La prueba de nitritos es específica para organismos Gram negativos, sin embargo, se pueden obtener resultados sí están presentes otros tipos de microorganismos.



pH: El rango de pH urinario es 4.7 a 7.8. Las muestras de orina extremadamente ácidas o alcalinas, usualmente indican especímenes mal recolectados. El pH es importante para el manejo clínico de las piedras o cristales.

Leucocitos: Indicador de inflamación clínicamente importante (Ávila, I., Campos, M., et al. 2015)

2.1.3 Examen Microscópico.

Fundamento:

Una identificación microscópica precisa del sedimento urinario es importante para el reconocimiento temprano de infecciones, procesos inflamatorios, y neoplasias que pueden afectar el tracto urinario.

Técnica:

- En un tubo para EGO cónico, centrifugar aproximadamente 5 mL de orina a 2000 rpm/5min.
- Eliminar el sobrenadante y dejar alrededor de 0.5 mL del mismo, para resuspender el sedimento.
- Colocar en un portaobjetos una gota de sedimento.
- Enfocar en 40x y revisar 15 campos con luz tenue, para la búsqueda de cristales, células (bacterias, células epiteliales, eritrocitos, leucocitos, entre otros.) y cilindros.
- Colocar los resultados obtenidos en la *Tabla 13. Resultados experimentales de la observación del sedimento urinario*

Valores de Referencia.

Es normal encontrar en el sedimento células escasas de descamación del epitelio; 1-2 eritrocitos por campo y 1-3 Leucocitos por campo (Ávila, I., Campos, M., et al. 2015)

Significado Clínico:

Cristales: Los tipos de cristales urinarios dependen del pH de la orina fresca. La cistina, ácido úrico, leucina, y tirosina son los cristales de mayor importancia diagnóstica y por tanto deben ser identificados.

Microorganismos: En un espécimen de orina bien recolectado y procesado, la presencia de organismos es importante desde el punto

de vista clínico. Se reportan, frecuentemente, bacterias, hongos, parásitos.

Bacterias: La orina de individuos normales es estéril y no contiene bacterias. Algunas bacterias pueden estar presentes por contaminación durante la recolección o por almacenamiento prolongado.

Eritrocitos: Una orina normal, examinada con objetivo de alto aumento, no debe contener más de unos cuantos eritrocitos. Estas células aparecen en la orina después de lesiones vasculares o trastornos del riñón o del tracto urinario inferior. La presencia de eritrocitos acompañada de cilindros hemáticos o eritrocitos sin forma, es sugestiva de sangrado del parénquima renal o del glomérulo.

Leucocitos: Un elevado número de leucocitos (piuria) está asociado a numerosos procesos inflamatorios e infecciosos del tracto urinario. La mayoría de los leucocitos vistos por microscopía de campo claro son neutrófilos segmentados.

Células del epitelio tubular renal. En la nefrona están alineados varios tipos de células del epitelio tubular renal y las células enfermas o viejas están constantemente siendo arrojadas a la orina.

Espermatozoides. Los espermatozoides pueden ser fácilmente reconocidos en la orina de un hombre después de la eyaculación o en la orina de una mujer por contaminación vaginal después del coito.

Cilindros renales: Los cilindros renales o urinarios son estructuras cilíndricas que se organizan en la nefrona y su importancia proviene de su localización. Están formados por mucoproteína de Tamm-Horsfall, que está siempre presente en la orina, usualmente en suspensión. Esta mucoproteína es producida por las células del epitelio tubular renal de la sección ascendente del asa de Henle. Los cilindros se forman como consecuencia del estancamiento de la orina y de la precipitación de. El incremento en la concentración de proteínas, sales, y un pH urinario bajo son algunos de los factores que contribuyen a su formación (Velázquez, R., 2009).

Resultados.

Tabla 10.- Datos del paciente.

Nombre:		Edad:	Sexo:
Horas de ayuno:	Dx presuntivo:	Fecha de evaluación:	



Tabla 11.- Resultados experimentales para el análisis físico.

Determinación	Resultado	Valores de Referencia	Analista
Color			
Olor			
Aspecto			
Densidad			

Tabla 12.- Resultados experimentales para el análisis químico.

Determinación	Resultado	Valores de Referencia	Analista

Tabla 13.- Resultados experimentales de la observación del sedimento urinario.

Campo y Objetivo	Laminilla con sedimento urinario. Generar un dibujo de lo que se observó en 3 diferentes campos microscópicos.
Campo 1 40x	

Campo 2 40x	
Campo 3 40x	

Referencias.

- Ávila, I., Campos, M., et al. (2015) Manual de Prácticas de Laboratorio de Análisis Bioquímicos Clínicos Generales. PRÁCTICA 6 UROANÁLISIS. UNAM- Departamento de Ciencias Biológicas.
- Kaplan, A., Lawrence, A. y Pesce, J. (1996). Química Clínica Teoría, Análisis y Correlación. 3ª Ed. Ciudad de México. Traducción: Carreón, T. Ed. Javier Ortega Ceseña.
- Método adecuado de obtención de muestra urinaria para mujer y hombre. Tomado de goo.gl/GerjbM.
- Partes y funciones de la nefrona. Tomado de goo.gl/W5Ybgk.
- Velázquez, R., (2009). Manual de Prácticas de Bioquímica Clínica. Ciudad de México. UNAM Facultad de Química.
- Cobas®.



MODULO 3. HEMATOLOGÍA.

Práctica 3.1 Obtención de muestras sanguíneas por punción venosa, mediante jeringa y sistema al vacío.

Objetivo.

Adquirir habilidades necesarias para la realización de la venopunción de manera correcta, mediante la adquisición de los conocimientos básicos de anatomía y fisiología del sistema circulatorio, así como el conocimiento de los componentes de la sangre cuando es centrifugada en sus fracciones correspondientes.

Introducción.

El Sistema Cardiovascular también conocido como aparato circulatorio que está integrado por venas, vénulas, arterias, arteriolas, vasos capilares y el corazón. Este último tiene la función de bombear sangre a dos principales circuitos. Uno es el circuito pulmonar encargado de llevar a la sangre a los pulmones y el circuito sistémico que distribuye a la sangre a todos los órganos y tejidos del cuerpo (Sánchez, A., s.f.).

En los vasos capilares la sangre desempeña tres funciones principales, entre otras: libera oxígeno hacia los tejidos, proporciona a las células del organismo nutrientes y otras sustancias esenciales que transporta y capta los productos de desecho de los tejidos. Después los capilares se unen para formar vénulas. A su vez, las venas se unen para formar venas mayores, hasta que, por último, la sangre se une en la vena cava superior e inferior y confluye en el corazón completando el circuito (Aguilar, J., s.f.)

La sangre se encuentra compuesta por dos elementos principales, uno es la parte líquida y otra es la parte sólida o forme:

- Plasma o suero (dependiendo del uso de anticoagulantes) es un líquido amarillado o amarillento, en el cual están suspendidas células como: glóbulos rojos, glóbulos blancos y fragmentos celulares: plaquetas. Está compuesta por productos orgánicos como: hormonas (esteroides, peptídicas, tiroideas, etc.); proteínas (factores de la coagulación, albúmina, inmunoglobulinas, etc.); carbohidratos (glucosa, galactosa, lactosa); Electrolitos (Sodio, Potasio, Magnesio, Calcio, Carbonatos, Fosfatos, etc.); Lípidos (Lipoproteínas, LDH y LDL); Vitaminas (vitamina K, complejo B y vitaminas hidrosolubles); además

de CNNP (Compuestos Nitrogenados No Proteicos). Su principal componente es agua, alrededor de 90% de su volumen.

La otra parte sólida o forme, está formada por: fragmentos celulares llamados plaquetas ó trombocitos, glóbulos rojos (Hematíes o Eritrocitos); glóbulos blancos (Leucocitos), y sus precursores, que son células inmaduras (reticulocidos) que derivan en las estructuras formes principales. Una muestra sanguínea es una alícuota de sangre del paciente extraída por métodos que permitan considerarla como representativa del mismo, empleada para fines de diagnóstico, comprobación o investigación, no utilizable para fines terapéuticos. (NOM-253-SSA1-2012)

En los servicios hospitalarios como urgencias, consulta externa y pacientes en recuperación, es muy frecuente la práctica de venopunción para la extracción de muestras de sangre venosa periférica, valorando el estado de salud de los pacientes mediante el análisis de laboratorio de estas muestras (Agós, M., Lizarraga, R., et al, 2008).

Los métodos de extracción más utilizados son: la punción directa con jeringa y el uso de agujas de doble punta del sistema al vacío, como la imagen que se muestra a continuación, en la que, mediante un adaptador conocido como camisa que permite conectar un tubo al vacío a la aguja de dos puntas, generalmente de la marca Vacutainer® para la extracción de sangre venosa. Estos dispositivos son de un solo uso, desechables y se tratan según las especificaciones que indica la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.



Imagen 12.- Componentes del Sistema al vacío para la obtención de muestras sanguíneas venosas. Tomado de goo.gl/RQLA4t

Los anticoagulantes son sustancias que impiden la coagulación sanguínea, por diferentes mecanismos, principalmente la sustracción



del calcio del plasma. Cuando la sangre se obtiene agregando algún anticoagulante o aditivo, se inhibe la cascada de la coagulación obteniendo, después de la centrifugación, elementos formes separados del sobrenadante que se conoce como plasma. En cambio, si se permite que la muestra coagule, se obtendrá un coagulo y el sobrenadante que se genere tras la centrifugación de denomina suero. (Lynch, M., 1972)

Los tubos con anticoagulante y sin él, que se utilizan con mayor frecuencia en el Laboratorio de análisis Clínicos son los siguientes y el orden que se utiliza para la toma se muestra en la siguiente imagen.

Orden de Toma			
Tapón	Contenido de tubo	Área de uso	Inversiones
	Hemocultivo	Microbiología	5 veces
	Citrato de sodio	Coagulación (Tiempos de coagulación fibrinógeno, agregación plaquetaria)	3 a 4 veces
	Gel separador	Química clínica	5 veces
	Sin anticoagulante, con activador de coagulación, con silicón	Química clínica, banco de sangre serología	8 a 10 veces
	Gel separador y trombina	Obtención de suero rápido	5 a 6 veces
	Gel separador y heparina de litio	Química clínica en plasma	5 veces
	Heparina de sodio/litio	Química clínica (urgencias) hematología (fragilidad osmótica)	8 a 10 veces
	EDTA K ₂	Hematología, banco de sangre	8 a 10 veces
	Gel separador y EDTA K ₂	Determinaciones de carga viral	8 a 10 veces
	Oxalato de Potasio/NaF	Química clínica, pruebas de lactato y glucosa	8 veces

Información con base a extractos de los insertos técnicos e información de los productos BD Vacutainer®
Referencia en CLSI: (H3-A6, Vol. 27 N 26, 2007 y H04-A6, Vol. 28 N25, 2008)

Imagen 13.- Orden sugerido para la toma de muestra de sangre venosa. Tomado de goo.gl/RQLA4t

Materiales, equipos y reactivos.

Muestras biológicas.

4 mL de sangre completa anticoagulada con EDTA potásico (tapón morado).

7 mL de sangre completa sin anticoagulante (tapón rojo).

1 Gradilla de unicel.

1 jeringa de 5 mL.

1 Pipeta de vidrio de 2 mL.

Tubos de ensaye de 15x100 mm.

Tubos de ensaye de 15x150 mm.

1 Adaptador para extracción de sangre por sistema al vacío.

Agujas de punta doble, calibre 21x33 para sistema al vacío.

Torundas

Tubos al vacío con anticoagulante EDTA, tapón morado.

Pipetas Pasteur con bulbo.

Parafilm (Recortado en cuadros de 1cm²).

1 Centrifuga.

Procedimiento experimental.

Indicaciones previas para el Paciente:

- Será necesario obtener por lo menos tres muestras, dos se realizarán mediante sistema al vacío usando tubos con vacío de la marca Vacutainer®, uno sin anticoagulante (tapón rojo) y otro con anticoagulante (tapón lila, verde o azul) y por último, se tomará una muestra con jeringa de 5 mL.

- Armar equipos de tres personas para la punción de acuerdo a lo siguiente: A puncionará al compañero B; B puncionará al compañero C; C puncionará al compañero A.

- Se debe preparar todo el material, incluidos los tubos, la ligadura, torundas con alcohol para la asepsia de la piel, las jeringas; cuando sea necesario, la aguja estéril de doble filo y el dispositivo para fijarla.

- Se solicita al paciente que cierre el puño para que las venas resulten más palpables y visibles. Para la extracción de sangre el paciente estará sentado y deberá apoyar bien el brazo en una superficie plana.



3.1.1 Venopunción con Jeringa.

Fundamento:

La extracción de muestra sanguínea es un procedimiento por medio del cual se realiza una punción venosa con jeringa, para la obtención de una muestra de sangre, que es utilizada para la evaluación diagnóstica del paciente.

Técnica:

- Se selecciona la zona adecuada para la punción.
- Se aplica un torniquete varios centímetros por encima de la zona de punción. Es importante no dejarlo más de un minuto, ya que pasado este tiempo la muestra se torna hemolizada.
- Realizar asepsia en la zona de la punción con una torunda humedecida con alcohol etílico al 70%.
- Se comienza en el punto de la punción y se prosigue la limpieza hacia fuera siguiendo un movimiento en espiral.
- Se fija la vena tanto por encima como por debajo del lugar de punción, con ayuda de los dedos pulgar y medio o índice y pulgar, como se indica en la *Imagen 14. Punción venosa con jeringa.*
- Se realiza la venopunción penetrando la piel con la aguja, con el bisel hacia arriba formando un ángulo de 15° con el brazo, siguiendo la dirección de la vena (se introduce la aguja con suavidad pero con rapidez para reducir las molestias, aproximadamente un tercio del largo de la aguja).
- Al subir espontáneamente la sangre (se observa una ligera gota en el pabellón hipodérmico de la aguja de la jeringa).
- Jalar el embolo de la jeringa constantemente hasta obtener los mililitros solicitados.
- Cuando se tenga la cantidad suficiente de sangre, retirar el torniquete, se retira la aguja rápidamente y simultáneamente se aplica una torunda.

- Para el manejo de la muestra, se retira la aguja de la jeringa y la sangre se vacía lentamente en un tubo de ensayo, limpio y seco.
- Posteriormente se desecha la aguja en el contenedor rojo rígido (para Punzocortantes) y tanto el tapón de la aguja como el de la jeringa se desechan en el bote de basura común.



Imagen 14.- Punción venosa con jeringa. Tomado de goo.gl/xUbZKU

3.1.2 Venopunción por Sistema al Vacío.

Fundamento:

La extracción de muestra sanguínea es un procedimiento por medio del cual se realiza una punción venosa con sistema al vacío, para la obtención de una muestra de sangre, que es utilizada para la evaluación diagnóstica del paciente.

Técnica:

- Preparación del material (En presencia del paciente, romper el sello de seguridad de la aguja “doble filo” calibre 21x33, sin quitar el protector de la misma y colocarla en el adaptador).
- Se selecciona la zona adecuada para la punción.
- Realizar asepsia en la zona de la punción con una torunda humedecida con alcohol etílico al 70%.



- Se aplica un torniquete varios centímetros por encima de la zona de punción. Es importante No dejarlo más de un minuto.
- Se comienza en el punto de la punción y se prosigue la limpieza hacia fuera siguiendo un movimiento espiral.
- Se fija la vena tanto por encima como por debajo del lugar de punción, con ayuda de los dedos medio o índice.
- Para realizar la venopunción: se penetra la piel con la aguja con el bisel hacia arriba formando un ángulo de 15° con el brazo, siguiendo la dirección de la vena (se introduce la aguja con suavidad pero con rapidez para reducir las molestias, aproximadamente un tercio del largo de la aguja).
- Con ayuda del dedo pulgar y hacer presión con las pestañas de la camisa, capuchón o adaptador para introducir el tubo al vacío.
- En caso de toma múltiple, insertar los tubos de acuerdo al orden sugerido: que se indica en la *Imagen 13.- Orden de Toma*.
- Retirar el torniquete en cuanto la sangre comience a fluir.
- Dejar llenar el tubo hasta el volumen preestablecido y retirar el tubo.
- Insertar el siguiente tubo en caso de toma múltiple.
- Agitar por inversión los tubos que así lo requieran, por lo menos 5 veces suavemente.
- Cuando se finaliza la recolección, primero se debe retirar el tubo y posteriormente la aguja.
- Se retira la aguja rápidamente y simultáneamente se aplica una torunda.
- Posteriormente, se desecha la aguja en el contenedor rojo rígido y tanto el tapón de la aguja como la jeringa se desechan en el bote de la basura común, como se muestra en la *Imagen 15.- Recolección de sangre venosa con sistema al vacío, Vacutainer®*.

Sistema BD Vacutainer® Recolección de sangre venosa

Técnica para recolección de sangre venosa con Aguja de toma múltiple BD Vacutainer® Eclipse™.

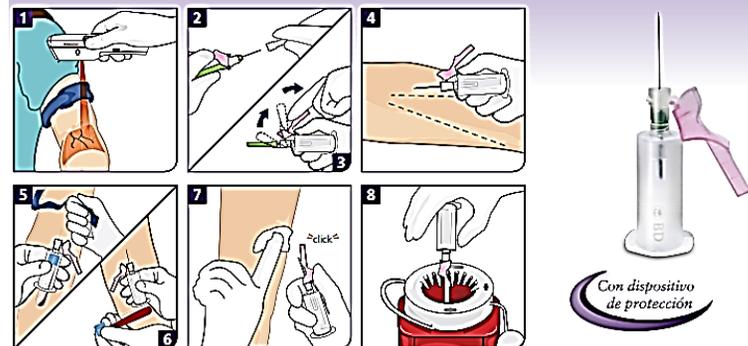


Imagen 15.- Recolección de sangre venosa mediante sistema al vacío, Vacutainer®. Tomado goo.gl/RQLA4t

3.1.3 Obtención de plasma sanguíneo.

Fundamento:

Cuando a la sangre recién extraída se le procesa para evitar la coagulación (adición de sustancias anticoagulantes como heparina, citrato de sodio o de potasio, ácido etildiaminotetracético o EDTA) y se deja en reposo, entonces las células sedimentan y en la parte superior queda un líquido denominado plasma (Pasos, F. y Hernández, R., s.f.).

Técnica:

- Al tubo con la muestra de sangre entera anticoagulada se le retira el tapón y se coloca parafilm, se centrifuga a 2500 rpm/5 minutos.
- Terminada la centrifugación, se retira el tubo de la centrífuga para observar las características físicas de la muestra.
- El plasma (parte superior líquida) en ocasiones suele presentarse turbio blanquecino o lechoso (Lípemico), rojizo (Hemolizado) o amarillento (Ictérico), características que deben ser colocadas en la *Tabla 15.- Resultados experimentales de la centrifugación de tubos del sistema Vacutainer®* En la columna de Observaciones físicas de la muestra.



3.1.4 Obtención de suero sanguíneo.

Fundamento:

Cuando la sangre es extraída de los vasos sanguíneos en tubos sin anticoagulante permanece poco tiempo en estado líquido, (aproximadamente 5 minutos). Ya que el tubo contiene un acelerador de la coagulación (polvo de vidrio) y silicón que evita la adherencia del coágulo a las paredes del mismo, se coagula y adquiere una consistencia sólida; el volumen se retrae (coágulo) y se libera un líquido denominado suero sanguíneo, mediante centrifugación.

Técnica:

- Al tubo con la muestra de sangre entera sin anticoagulante (tapón rojo o amarillo) se le retira el tapón y se coloca parafilm, se centrifuga a 2500 rpm/5 minutos.
- Terminada la centrifugación se retira el tubo de la centrifuga para observar las características físicas de la muestra.
- El suero (parte superior líquida) en ocasiones suele presentarse turbio blanquecino o lechoso (lípemico), rojizo (hemolizado) o amarillento (ictérico), características que deben ser colocadas en la *Tabla 16.- Resultados de la punción venosa por sistema al vacío y jeringa.* En la columna de observaciones físicas de la muestra.

Resultados.

1.- Defina ¿Qué es suero?

2.- Defina ¿Qué es plasma?

Tabla 14.- Datos del paciente

Nombre:		Edad:	Sexo:
Horas de ayuno:	Dx presuntivo:	Fecha de evaluación:	

Tabla 15.- Resultados experimentales de la centrifugación de tubos del sistema Vacutainer®

Sangre centrifugada con anticoagulante Tapón lila.	Sangre centrifugada sin anticoagulante. Tapón rojo o amarillo.
	

Tabla 16.- Resultados de la punción venosa por sistema al vacío y jeringa.

Nombre del paciente.	Nombre del flebotomista.	Técnica y/o tubo utilizado.	Muestra obtenida.	Observaciones físicas de la muestra.



Referencias.

- Agós, M., Lizarraga, R., et al., (2008) Factores relacionados con la hemólisis en la extracción de muestras sanguíneas. Anales Sis. San Navarra vol.31 no.2 Pamplona.
- Ávila, I., Campos, M., et al. (2015) Manual de Prácticas de Laboratorio de Análisis Bioquímicos Clínicos Generales. PRÁCTICA 2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS. UNAM- Departamento de Ciencias Biológicas.
- BD (2018). Sitio web. Recuperado el 03 de enero de 2017. De goo.gl/pvkr7M.
- Lynch, M., (1972). Métodos de Laboratorio.
- Montalvo, C., T Pasos, F. y Hernández, R. (s.f). Tejido Sanguíneo y Hematopoyesis. UNAM, Facultad de Medicina, Departamento de Biología Celular y Tisular, Biología Celular e Histología Médica [en línea] Recuperado el 03 de enero de 2018. De goo.gl/tgXNjb.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.
- Sánchez, A., (s.f.). Sistema circulatorio. [En línea] Recuperado el 03 de enero de 2018. De goo.gl/M6Cn1Z.
- Sánchez, A., (s.f.). Sangre y Hematopoyesis. [En línea] Recuperado el 03 de enero de 2018. De goo.gl/ewtR7x.
- Aguilar, J. (s.f.) Aparato Circulatorio [En línea] Recuperado el 03 de enero de 2018.

Práctica 9. "Citometría Hemática"

Objetivo.

Con base en los conocimientos básicos de anatomía y fisiología del aparato circulatorio y hematología conocer y aplicar los métodos específicos para la realización de la Citometría Hemática, como un recurso de apoyo diagnóstico para el médico.

Introducción.

La sangre es un tejido especializado compuesto por el plasma y un conjunto de células suspendidas en él. El plasma comprende el 55% del volumen total de la composición sanguínea. Es de un color ambarino claro, con pH ligeramente alcalino 7.3 a 7.4. Está constituido por sustancias inorgánicas y orgánicas, tales como agua, minerales, proteínas (albúmina en su mayoría), productos del metabolismo como glucosa, aminoácidos, ácidos grasos, glicerol, vitaminas, hormonas y anticuerpos, CNNP (Compuestos Nitrogenados No Proteicos), electrolitos, principalmete.

Las células de la sangre son: glóbulos rojos (eritrocitos o hematíes), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas (trombocitos). Los eritrocitos al microscopio se observan como discos bicóncavos; en los vertebrados mamíferos y en la especie humana carecen de núcleo; En otros animales vertebrados como peces, anfibios, reptiles y aves son células nucleadas.

Los eritrocitos se forman en la médula ósea, situada en el interior de los huesos, principalmente en los huesos largos de nuestro cuerpo, como clavícula, cadera, fémur, radio, húmero entre otros. La vida útil de los eritrocitos es de 120 días aproximadamente, después son destruidos por células especializadas del bazo, su valor normal en sangre en hombres es de 4.7 a 6.1 x10⁶ eritrocitos/uL y en mujeres de 4.2 a 5.4 x10⁶ eritrocitos/uL. Miden de 6 a 8 micrómetros de diámetro aproximadamente. Las alteraciones de los eritrocitos, con respecto al tamaño, las células de dimensión normal poseen diámetro de 6 micrometros (normocitos); algunos suelen ser de menor tamaño (microcitos) y otros exceder el diámetro mencionado (macrocitos). En estos dos últimos casos se dice que existe anisocitosis en los eritrocitos o variación en su diámetro.



Los eritrocitos poseen varias funciones, la principal es transportar oxígeno de los pulmones a las células y tejidos. En los alvéolos pulmonares, la hemoglobina contenida en los eritrocitos capta el oxígeno transformándose en oxihemoglobina; en los tejidos, libera este oxígeno y capta el bióxido de carbono que, en el interior de los eritrocitos (mediante una enzima conocida como *anhidrasa carbónica*), cataliza la acción del agua con el bióxido de carbono, formándose ácido carbónico que se disocia rápidamente en iones hidrógeno y bicarbonato, manteniendo el pH sanguíneo.

Una pequeña cantidad de bióxido de carbono se une a la hemoglobina y se transforma en carbamilhemoglobina. Así son conducidos por la sangre a los pulmones, liberan el bióxido de carbono y el bicarbonato y vuelven a oxigenarse. También colaboran en mantener el pH sanguíneo y la viscosidad de la sangre. Estas reacciones se llevan a cabo de la siguiente manera, dentro del eritrocito, al llevarse a cabo el "Intercambio Gaseoso". Como se muestra a continuación.

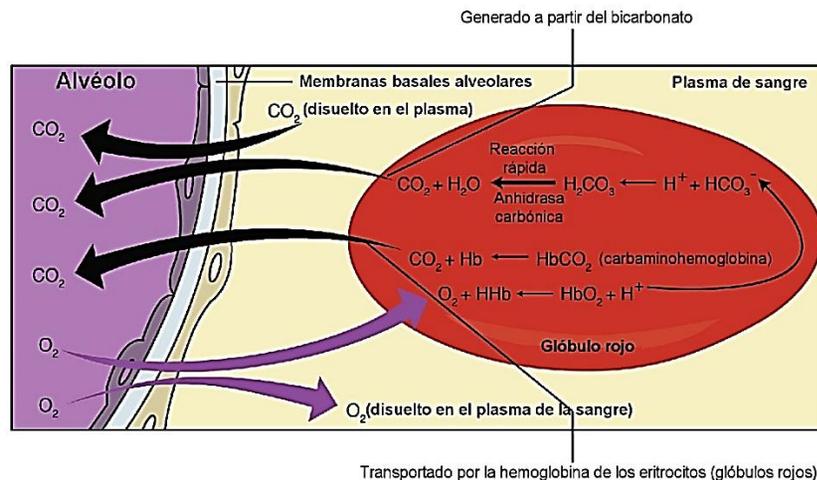
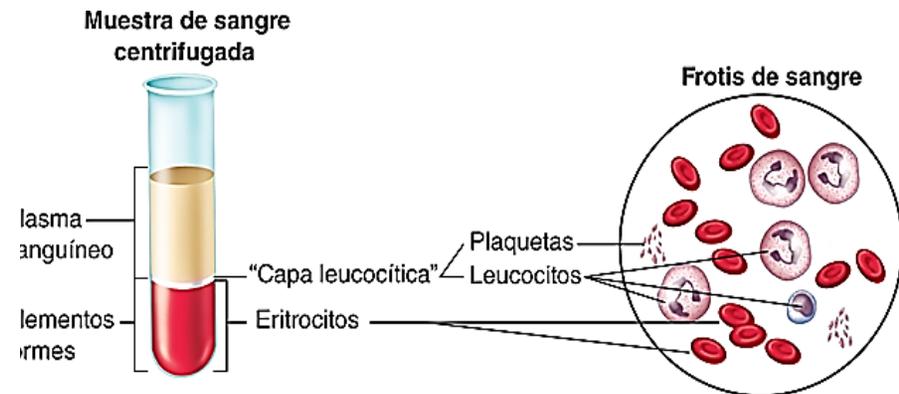


Imagen 16.- Cómo funciona el intercambio gaseoso. Tomado de goo.gl/3yxzME

Los leucocitos son células que cuando están suspendidas en el plasma sanguíneo, tienen forma esférica que suele modificarse a formas ameboides (estructuras que generan proyecciones temporales) o pleomórficas (variación en su morfología) cuando salen del torrente

circulatorio y ejercen sus funciones en el tejido, o cuando se les coloca en láminas portaobjetos. Los leucocitos son células, que poseen núcleo y una serie de orgánulos citoplasmáticos. Se les conoce también como glóbulos blancos porque carecen de pigmentos, como la hemoglobina presente en los hematíes.

Cuando están agrupados en la capa intermedia entre los eritrocitos y el suero o plasma, exhiben un color blanquecino cremoso, como en la imagen que se muestra a continuación en la *Imagen 17.- Muestra sanguínea tras centrifugación*.



fuente: Stuart Ira Fox: *Fisiología humana*, 14e: www.accessmedicina.com
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

Imagen 17.- Muestra sanguínea tras centrifugación. Tomado de goo.gl/1yNPTe

Existen cinco tipos de leucocitos: Linfocitos y Monocitos, también conocidos como Agranulocitos; Eosinófilos, Basófilos y Neutrófilos, conocidos como Granulocitos.

Cada uno tiene una función específica en la eliminación de diversos patógenos como los virus, bacterias, hongos y esporas. Son células ejecutoras de la respuesta inmunitaria contra estructuras desconocidas para el organismo, en su interior poseen enzimas tóxicas para la erradicación total contra cualquier agresión del ambiente externo, están presentes en la sangre, los ganglios linfáticos, el bazo, las amígdalas, las adenoides y en el sistema linfático.

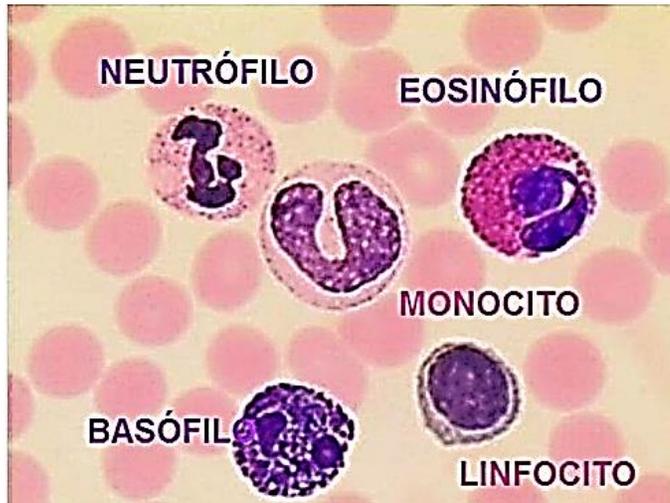


Imagen 18.- Tipos de Glóbulos Blancos. Tomado de goo.gl/E1ZNJg

Los valores normales de leucocitos en sangre son por lo general de 4,000 a 12,000 leucocitos/uL. El número de leucocitos puede aumentar en las enfermedades infecciosas agudas como la apendicitis, neumonía y abscesos, etc. Este incremento es un signo evidente de infección, que ayuda al médico para diagnosticar alguna de esas enfermedades. Al aumento se le conoce con el nombre de leucocitosis. También pueden disminuir en número, en enfermedades crónicas, enfermedades degenerativas, durante el cáncer, a este estado se le conoce como leucopenia.

En general las células antes mencionadas provienen de una en común, que es la Célula Madre Sanguínea o Pluripotencial (Stem Cell), como se muestra en la Imagen 20.

Las plaquetas son pequeñas porciones del citoplasma de los megacariocitos, que se fragmentan al atravesar los capilares sanguíneos de la médula hematopoyética. El número normal es de 150 000 a 450 000 plaquetas / uL de sangre. Pueden medir de 1 a 3 micrómetros de diámetro y permanecen en la circulación sanguínea alrededor de siete días, las plaquetas desempeñan un papel básico en la coagulación sanguínea, formando una estructura conocida como trombo blanco, evento conocido como hemostasia primaria. (Montalvo, C., Pasos, F. y Hernández, R., s.f).

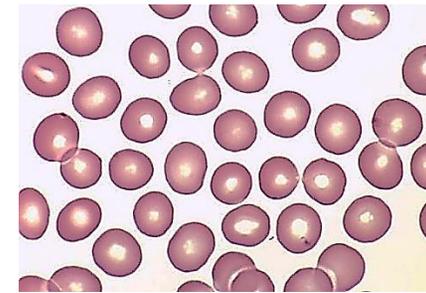


Imagen 19.- Glóbulos rojos en extendido sanguíneo. Tomado de goo.gl/ZfrscF.

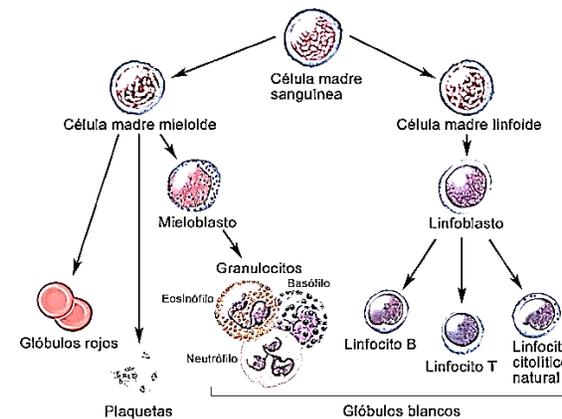


Imagen 20.- Esquema de diferenciación celular. Tomado de goo.gl/gU1B12

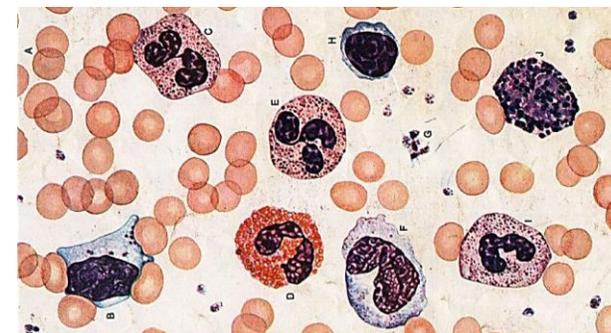


Imagen 21.- Frotis Sanguíneo-Tinción de Wright. Muestra la morfología celular sanguínea. Tomado de goo.gl/Ka3Ufn



Equipos, reactivos y materiales.

Muestra biológica: 6 mL de sangre anticoagulada.
Gradilla de unicel.
Tubos de ensayo de 15x100 mm.
1 Micropipeta de 10 a 100 uL.
Capilares nuevos sin heparina.
1 Adaptador para extracción de sangre por sistema al vacío.
Agujas de punta doble, calibre 21x33 para sistema al vacío.
Torundas
Tubos al vacío tapón lila.
1 Estuche de Hemocitómetro.
Tubo de Wintrobe.
1 Microscopio compuesto.
Portaobjetos limpios o nuevos.
1 Mechero Bunsen
Parafilm (Recortado en cuadros de 1 cm²).
1 Centrifuga y 1 Microcentrifuga para microhematócrito
Fotocolorímetro.
Gradilla de Sedimentación.
1 Agitador de pipetas de Thoma.
Aceite de inmersión.
Solución de Turk.
Solución Modificada de Drabkin
Colorante de Wright.
Buffer de fosfatos pH = 7 ± 0.2
Solución de Turk.
Solución de Hayem.
Oxalato de amonio al 1% frío

Procedimiento experimental.

Obtención de la muestra sanguínea.

- Armar sistema de extracción por método al vacío, utilizando aguja calibre 21x33 (color verde).
- Rotular con marcador indeleble negro los tubos con vacío y, tapón color lila, que se van a utilizar para la recolección de la muestra.
- Realizar la venopunción como lo indica el procedimiento experimental, *punción mediante sistema al vacío*, de la **Práctica 3.1 "Obtención de**

muestras sanguíneas por punción venosa mediante jeringa y sistema al vacío". Utilizando el tubo con anticoagulante

- Por otra parte: Realizar en la sección de Resultados los cálculos, para cada una de las determinaciones.

3.2.1 Determinación de la Fórmula Roja.

3.2.1.1 Determinación de Hemoglobina (Hb).

Fundamento:

Mediante el método de Drabkin la hemoglobina es oxidada por acción del ferricianuro a metahemoglobina y mediante el cianuro se convierte en cianometahemoglobina. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de hemoglobina presente en la muestra ensayada (SPINREACT).

Técnica:

- Homogeneizar la sangre entera, por inversión (ascendiendo y descendiendo la muestra en el tubo 4 a 5 veces), como se muestra a continuación, lentamente para evitar la hemólisis de las células.

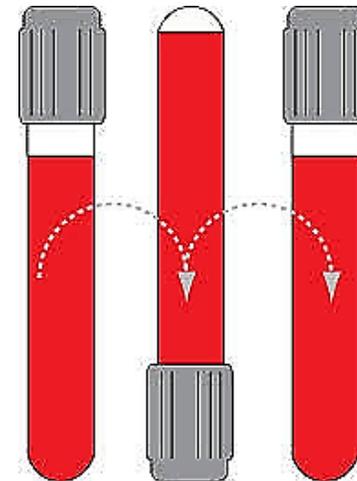


Imagen 22.- Homogeneización por inversión. Tomado de goo.gl/ZNCbDN



- En tubos de ensayo pipetear con ayuda de una micropipeta de 10 a 100 uL y puntas diferentes, los reactivos como se indica a continuación:

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	5.0	5.0	5.0
Patrón (uL)		20	
Muestra (uL)			20

Nota: RT = Reactivo total.

- Ajustar las condiciones del ensayo a: 540 nm; Temperatura 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro/fotocolorímetro a 0 de Absorbancia con el Tubo 1 o Blanco.
- Mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente (15-25°C).
- Leer la absorbancia del Patrón y la Muestra, frente al Blanco de reactivo, realizar los cálculos en la sección de resultados y llenar la tabla correspondiente

Cálculos:

$$[Hb] = \frac{\text{Absorbancia Muestra}}{\text{Absorbancia del Patrón}} \times \text{Concentración Patrón} = \text{Conc. de Hb.}$$

[Hb] =

Valor de Referencia:

Hombres 14 – 18 g/dL = 8,7 – 11,2 mmol/L

Mujeres 12 – 16 g/dL = 7,5 – 9,9 mmol/L

Significado clínico:

Cuando el nivel de hemoglobina aparece por debajo de los niveles normales indica anemia que puede obedecer a diferentes causas: anemia primaria, cáncer, embarazo, enfermedades renales o hemorragias. Si el nivel de hemoglobina es alto puede deberse a cardiopatías, deshidratación o estancia en lugares de gran altitud. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio (SPINREACT).

3.2.1.2 Determinación de Hematocrito (Hto).

Fundamento:

El hematocrito es el porcentaje de glóbulos rojos presentes en la sangre total. El espacio ocupado por los eritrocitos se mide y se expresa como un porcentaje del volumen sanguíneo total, tras ser centrifugado a 11,000 rpm/ 5min.

Técnica:

Técnica del Microhematócrito

- Homogeneizar la sangre entera del tubo de tapón lila, por inversión (ascendiendo y descendiendo la muestra en el tubo 4 a 5 veces) como en la *Imagen 22.- Homogeneización por inversión*
- Llenar un tubo capilar con sangre (por capilaridad), hasta aproximadamente las dos terceras partes de su capacidad, inclinando el tubo, teniendo precaución de no derramar la sangre.
- Sellarlo con material de arcilla (tomando una porción minúscula de plastilina y formar un tapón en el extremo contrario por el que se llenó el tubo capilar) o mediante calor (acercando el extremo contrario del tubo capilar a la flama del mechero bunsen hasta fundir el vidrio y quede sellado por acción del calor). Colocar los tubos capilares, en los canales de la placa de la microcentrifuga para microhematócrito, uno frente al otro (con el extremo sellado hacia afuera) como se muestra en la siguiente imagen. Colocar la tapa y cerrarla, dejándola en funcionamiento durante 5 minutos a 11,000 rpm.



Imagen 23.- Centrifuga para microhematócrito. Tomado de goo.gl/tPBjZy



- Terminada la centrifugación, retirar de inmediato cada tubo capilar y proceder a medirlo en el lector del microhematócrito, considerando solo el paquete eritroide, como se muestra a continuación en las siguientes imágenes. Llenar la tabla correspondiente en la sección de resultados



Imagen 24.- Capilar de hematocrito ya centrifugado. Foto obtenida Curso 2018-I Análisis Clínicos CCH-Azc.



Imagen 25.- Lectura manual del tubo de hematocrito. Tomado de goo.gl/bWkdR7

Cálculo:

Para leer el resultado, se lleva a cabo una regla de tres, midiendo el volumen total de plasma y eritrocitos o por medio de la regla, mostrada en la imagen anterior.

- Se coloca el tubo frente a la escala de manera que el fondo de la columna de eritrocitos, quede exactamente al mismo nivel de la línea horizontal correspondiente al cero
- Desplazar el tubo a través de la escala hasta que la línea marcada con el 1.0 quede al nivel del tope del plasma. El tubo debe de encontrarse completamente en posición vertical.

Valores de Referencia:

Mujeres: 38% a 45%
Hombres: 45% a 55%

Significado clínico:

Aumento: En diversas formas de poliglobulia, como: policitemia vera, enfisema pulmonar, polio y enfermedades renales.

Disminución: En distintos tipos de anemia, hemorragias, entre otros (Ávila, I., Campos, M., et al. 2015).

3.2.1.3 Conteo Eritrocitario manual (Hemocitómetro).

Fundamento:

La sangre anticoagulada es diluida en una solución isotónica que destruye a los leucocitos y plaquetas, manteniendo la integridad de los eritrocitos para su conteo en Hemocitómetro o Cámara de Neubauer.

Técnica:

- Homogeneizar la sangre entera, por inversión (ascendiendo y descendiendo la muestra en el tubo 4 a 5 veces) como se muestra en la: *Imagen 22.- Homogeneización por inversión.*
- Con la boquilla y la pipeta de Thoma para dilución de glóbulos rojos, aspirar sangre hasta la marca 0.5 (SIN BURBUJAS) y limpiar la parte exterior de la pipeta de Thoma con papel absorbente.
- Aforar de manera adecuada con diluyente (Hayem o Dacie) hasta la marca 101 de la pipeta y limpiar la parte exterior de pipeta nuevamente con papel absorbente, procurando no formar burbujas.
- Agitar la pipeta suavemente durante 1 min.
- Desechar las 5 o 6 primeras gotas de la pipeta de Thoma.
- Antes de depositar la muestra sobre el Hemocitómetro o cámara de Neubauer es importante cerciorarse de que la cámara se encuentre limpia y seca, para esto es necesario humedecer una torunda con alcohol al 70% y frotar suavemente las cuadrículas del hemocitómetro, posteriormente secar con una torunda nueva o limpia sin alcohol cuidando de no dejar algún residuo de algodón o pelusa.
- Repetir el mismo procedimiento con el cubreobjetos de la cámara de Neubauer, teniendo mayor precaución ya que es más frágil.



- Colocar el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer.
- En la cámara de recuento llenar (por difusión) dejando caer una gota del interior de la cámara (solo de un lado). Colocando la punta de la pipeta de Thoma, entre el cubreobjetos y el hemocitómetro, tratando que fluya libremente el líquido y cuidando que no se derrame a los canales, como se muestra en la imagen 26.

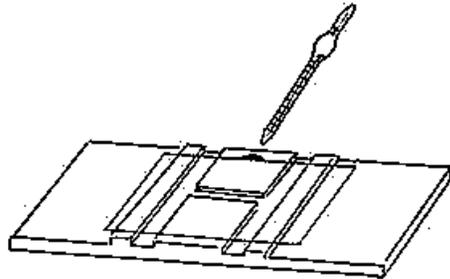


Imagen 26.- Llenado del Hemocitómetro o Cámara de Neubauer.
Tomado de goo.gl/mG2TWK.

- Dejar en reposo 2 o 3 minutos el Hemocitómetro con el fin de que los eritrocitos sedimenten.
- Colocar sobre la platina del microscopio el Hemocitómetro.
- Localizar la cuadrícula del hemocitómetro y enfocar con el objetivo de 10X, a fin de tener certeza de que se está enfocando la zona adecuada; Enseguida enfocar con el objetivo de 40X, haciendo uso únicamente del tornillo micrométrico, y proceder a realizar la Lectura de la siguiente manera:
- Localizar la cuadrícula en la que se lleva acabo el conteo eritrocitario. Se pueden ver en la *Imagen 27.- Cuadrícula del Hemocitómetro; indica los cuadros usados para el conteo de eritrocitos.*
- El recuento se realizara en los cuadros más pequeños del hemocitómetro, contando los hematíes localizados en los 4 cuadros de

los extremos y en el del centro, haciendo un total de 5 cuadros. Como se muestra en la siguiente imagen antes citada.

- Comenzar con cualquiera de los cuadros seleccionados y contar el número de células que se encuentran dentro de él. Es necesario colocar el número de células que se encontraron en cada cuadro, en la siguiente tabla:

Cuadro 1	Cuadro 2	Cuadro 3	Cuadro 4	Cuadro 5	Total

- Realizar los cálculos para determinar la cantidad de eritrocitos presentes en la muestra.

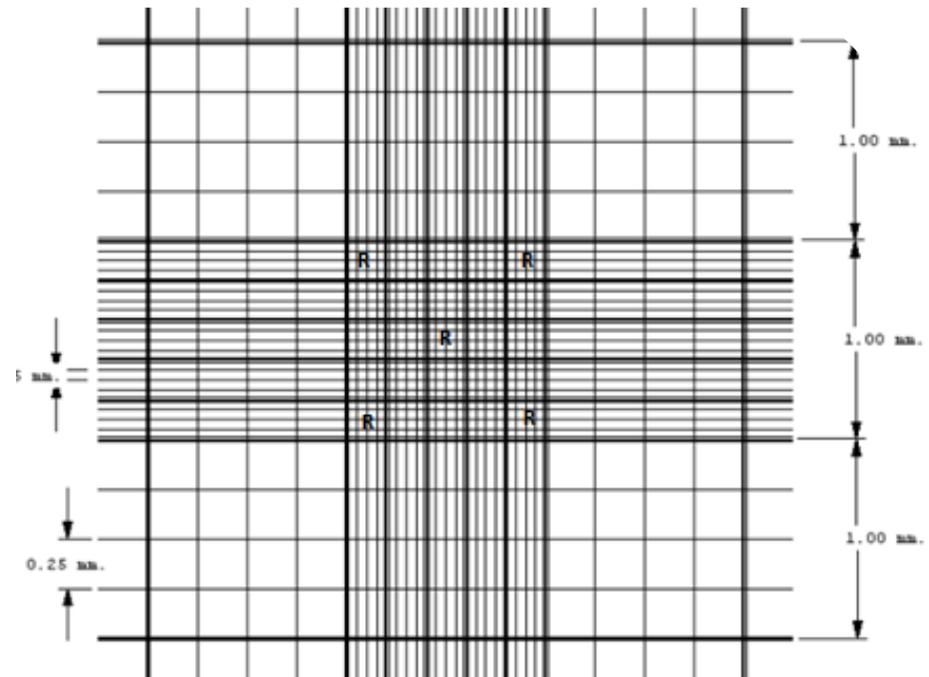


Imagen 27.- Cuadrícula del Hemocitómetro o Cámara de Neubauer; indica los cuadros usados para el conteo de eritrocitos ®. Tomado de goo.gl/2kMSmz.



Cálculos:

De los 25 cuadrados en que se encuentra subdividido el centro del Hemocitómetro, se cuentan los cuatro angulares y el central, con un recuento total representativo de 1/5 de milímetro cuadrado.

Sobre la base de una dilución de 1:200, de un recuento de $1/5 \text{ mm}^2$ y una profundidad de 0.1 mm, el cálculo se efectúa como sigue:

Eritrocitos / mm^3 = (Total de eritrocitos contabilizados) (5) (200) (10)

Realizar los cálculos en la sección de resultados y llenar la tabla correspondiente

Valores de Referencia:

Hombres es de 4.7 a 6.1×10^6 células/ mm^3 o $(4.7$ a $6.1) \times 10^{12}$ células/ L.

Mujeres de 4.2 a 5.4×10^6 células/ mm^3 o $(4.2$ a $5.4) \times 10^{12}$ células/ L.

Significado Clínico:

No obstante, los valores disminuidos se conoce como anemia pueden deberse a: alteraciones dietéticas, anemias ocasionadas por varias causas, cáncer, enfermedades sistémicas, embarazo, fibrosis de médula ósea o Hemorragias, entre otras.

Los valores aumentados hacen alusión a poliglobulia causada por: cardiopatías, enfermedades pulmonares crónicas, por permanecer en lugares de gran altitud o poliglobulia de diferentes causas (Echave, J. 2012).

3.2.1.4 Determinación de la Velocidad de Sedimentación Globular (VSG).

Fundamento:

Consiste en medir la velocidad (distancia / tiempo) en milímetros / hora, con la que sedimentan los glóbulos rojos o eritrocitos de la sangre.

Técnica:

Método de Wintrobe

- Homogeneizar la sangre entera, por inversión (ascendiendo y descendiendo la muestra en el tubo 4 a 5 veces) como se muestra en la Imagen 22.- Homogeneización por inversión.

- Llenar con la muestra sanguínea una pipeta Pasteur de punta larga.
- Posteriormente introducir la punta de la pipeta Pasteur hasta el fondo del tubo de Wintrobe.
- Lentamente vaciar la sangre e ir retirando la pipeta, dejando caer la muestra por la pared interna del tubo EVITANDO la formación de burbujas.
- El tubo se llena hasta la marca cero y se coloca en una gradilla de sedimentaron o gradilla de eritrosedimentación, específica para tubos de Wintrobe, en posición vertical, como se muestra en la imagen número 28.
- Al colocar el tubo de Wintrobe en la gradilla cronometrar una hora. Tiempo en el que se lee la prueba, procurando no mover la gradilla, ya que esto podría ocasionar la alteración de los resultados.
- Transcurrida la hora, se leerán los milímetros que haya sedimentado la muestra de sangre.
- La escala se lee hacia abajo, representando cada número 10 mm o 1 cm. Y colocar el resultado obtenido en la sección de resultados.

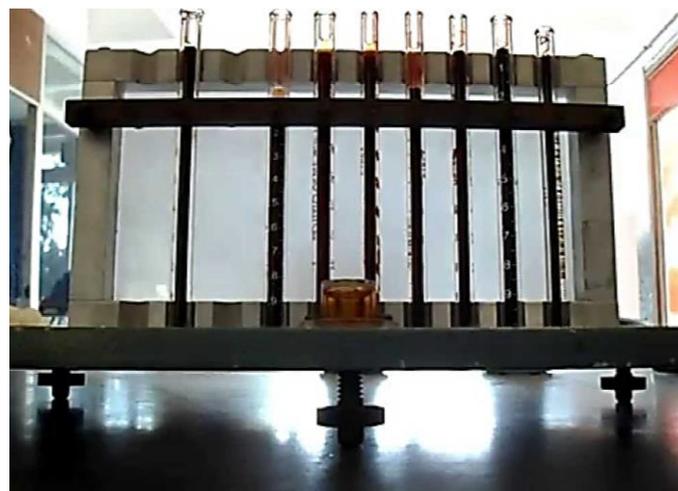


Imagen 28.- Gradilla de sedimentación. Tomado de goo.gl/vbquvx



Valores de Referencia:

Mujeres y niños: 0 – 15 mm/hr.
Hombres: 0 – 9 mm/hr.

Significado Clínico:

La VSG es un buen índice de la presencia de procesos infecciosos activos como la tuberculosis o la endocarditis bacteriana subaguda, el lupus eritematoso diseminado, las carditis reumáticas, ciertas neoplasias, embarazo ectópico, entre otros. Sirve igualmente para controlar la actividad evolutiva de las infecciones mencionadas (Echave, J. 2012).

3.2.1.5 Determinación de Índices de Wintrobe.

Fundamento:

Los cálculos aritméticos de los Índices de Wintrobe o Índices Eritrocitarios son evaluaciones que determinan el tamaño, contenido y concentración de Hemoglobina de cada glóbulo rojo. Estos índices eritrocitarios resultan ser útiles para la caracterización morfológica de las anemias, y pueden calcularse a partir del conteo total de eritrocitos, de la cantidad de Hemoglobina presente en la muestra y de la determinación del Hematocrito.

Cálculos:

- Colocar los cálculos y resultados obtenidos en la sección de resultados.
- Para obtener los Índices de Eritrocitos, también denominados Índices Eritrocitarios o Índices de Wintrobe, se utilizan las siguientes formulas:

Volumen Corpuscular Medio (VCM o VGM): da idea del tamaño promedio de cada eritrocito, se calcula con la siguiente fórmula:

$$VCM = \frac{(\text{Hematocrito}) (10)}{\text{Número de eritrocitos}} = \text{femtolitros/eritrocito}$$

Hemoglobina Corpuscular Media (HCM): Es la cantidad hemoglobina presente en los eritrocitos, y se calcula con la siguiente fórmula:

$$HCM = \frac{(\text{Hemoglobina}) (10)}{\text{eritrocitos}} = \text{picogramos/eritrocito}$$

Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM): Es la concentración media de hemoglobina en un volumen determinado de eritrocitos, y se calcula con la siguiente fórmula:

$$CHCM = \frac{(\text{Hemoglobina}) (100)}{\text{Hematocrito}} = \text{gramos/decilitro}$$

Valores de Referencia:

VCM= 80 a 100 femtolitros /eritrocito o fL/e.

HCM= 27 a 31 picogramos / eritrocito o pg /e.

CHCM= 31 a 36% o 31 a 36 gramos/decilitro o g/dL

Significado Clínico:

VCM. Un valor < 80fL indica anemia microcítica; mientras que por arriba de 100 fL indica anemia macrocítica. Está relacionado con la anisocitosis.

HCM. Un valor subnormal implica hipocromía, mientras que un valor elevado, indica hipercromía.

CHCM. Valores menores al de referencia indican anemia hipocrómica. (Ávila, I., Campos, M., et al. 2015).

3.2.2 Determinación de la Fórmula Blanca.

3.2.2.1 Conteo Leucocitario Total (Hemocitómetro).

Fundamento:

En el método de Turk se utiliza una solución de ácido acético al 2% que tiene como finalidad lizar los eritrocitos y plaquetas para evitar interferencias en el recuento de los glóbulos blancos, en hemocitómetro.



Técnica:

- Homogeneizar la sangre entera, por inversión (ascendiendo y descendiendo la muestra en el tubo 4 a 5 veces) como se muestra en la *Imagen 22.- Homogeneización por inversión.*
- Con la boquilla y la pipeta de Thoma para dilución de glóbulos blancos, aspirar sangre hasta la marca 0.5 (SIN BURBUJAS) y limpiar la parte exterior de la pipeta de Thoma con papel absorbente.
- Aspirar reactivo de Turk hasta la marca 11, evitando crear burbujas y limpiar la parte exterior de pipeta nuevamente con papel absorbente.
- Agitar la pipeta suavemente durante 1 min.
- Desechar las 3 primeras gotas de la dilución de la pipeta de Thoma.
- Antes de depositar la muestra sobre el Hemocitómetro es importante cerciorarse de que la cámara se encuentre limpia y seca, para esto es necesario humedecer una torunda con alcohol al 70% y frotar suavemente las cuadrículas del hemocitómetro, posteriormente secar con una torunda nueva o limpia sin alcohol cuidando de no dejar algún residuo de algodón o pelusa.
- Repetir el mismo procedimiento con el cubreobjetos de la cámara de Neubauer, teniendo mayor precaución ya que es más frágil.
- Colocar el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer.
- En la cámara de recuento llenar la cuadrícula elegida de solo un lado, colocando la punta de la pipeta de Thoma, entre el cubreobjetos y el hemocitómetro, tratando que fluya libremente por difusión el líquido y cuidando que no se derrame a los canales, como se muestra en la *Imagen 26.- Llenado del Hemocitómetro o Cámara de Neubauer.*
- Dejar en reposo 2 o 3 minutos el Hemocitómetro con el fin de que los leucocitos sedimenten.
- Colocar sobre la platina del microscopio el hemocitómetro.

- Localizar la cuadrícula del hemocitómetro y enfocar con el objetivo de 10X, a fin de tener certeza de que se está enfocando la zona adecuada; Enseguida enfocar con el objetivo de 40X, haciendo uso únicamente del tornillo micrométrico, y proceder a realizar la Lectura de la siguiente manera:

- Localizar la cuadrícula en la que se lleva acabo el conteo leucocitario. Se pueden ver en la *Imagen 29.- Cuadrícula de Hemocitómetro o Cámara de Neubauer, indica los cuadros usados para el Conteo leucocitario total.*

- El recuento se realizará en los cuadros más grandes del hemocitómetro, contando los leucocitos localizados en los 4 cuadros de los extremos.

- Comenzar con cualquiera de los cuadros seleccionados y contar el número de células que se encuentran dentro de él. Es necesario colocar el número de células que se encontraron en cada cuadro, en la siguiente tabla:

Cuadro 1	Cuadro 2	Cuadro 3	Cuadro 4	Total

- Realizar los cálculos para determinar la cantidad de leucocitos presentes en la muestra en el siguiente espacio. Y llenar la tabla correspondiente al conteo Leucocitario Total en la sección de resultados.

I.- Conteo Leucocitario Total. _____ **Leucocitos/uL o mm³**

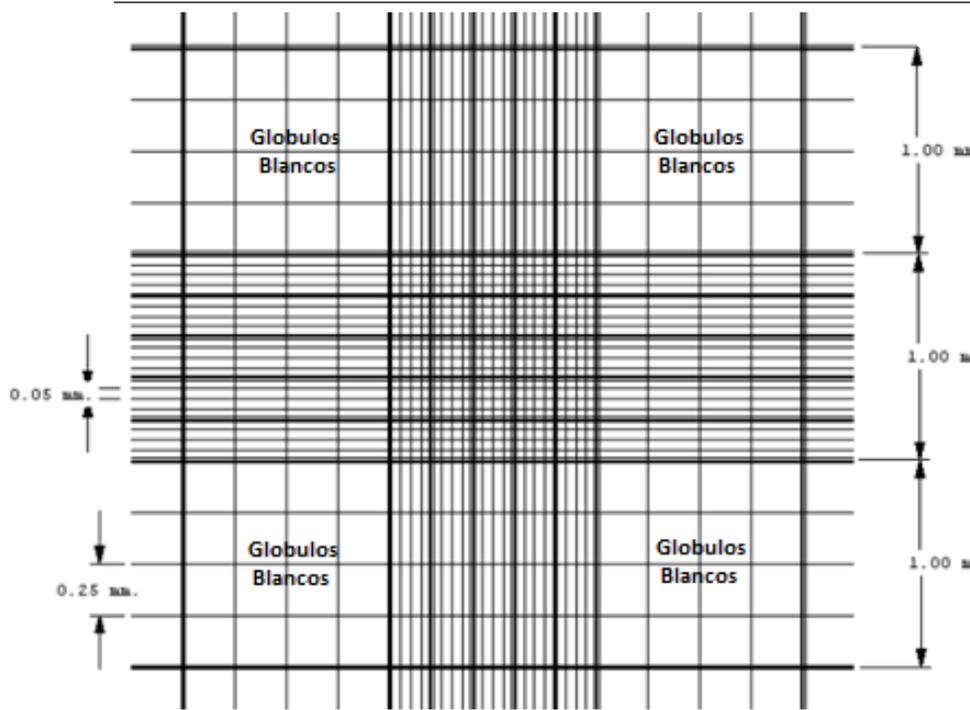


Imagen 29.- Cuadrícula de Hemocitómetro o Cámara de Neubauer, indica los cuadros usados para el conteo leucocitario total. (Glóbulos Blancos)
Tomado de goo.gl/2kMSmz.

Cálculos:

De los cuadrados en que se encuentra dividido el Hemocitómetro, se cuentan los cuatro angulares con un recuento total representativo de 0.4 de milímetros cuadrados.

Ya que la profundidad de la cámara que es de 0.1 mm multiplicado por el recuento total 0.4 mm² es igual a 0.4 mm³, por los cuatro cuadros (Glóbulos Blancos), debiéndose multiplicar por 2.5 para corregir a 1 mm³.

Sobre la base de una dilución de 1:20, y la corrección de 2.5, el cálculo se efectúa como sigue:

$$\# \text{ Leucocitos / mm}^3 \text{ o uL} = (\text{Total de Leucocitos contabilizados}) (20) (2.5)$$

Valores de Referencia:

4,500 – 12,000 Leu /mm³
4.5 – 12.0 X10⁹ Leu /L

Significado Clínico:

Un bajo número de glóbulos blancos se denomina leucopenia y puede deberse a:

- Insuficiencia de la médula ósea (por ejemplo: debido a infección, tumor o cicatrización anormal)
- Enfermedades vasculares del colágeno (como el lupus eritematoso)
- Enfermedad del hígado o el bazo
- Radioterapia o exposición a la radiación

Un alto número de glóbulos blancos se denomina leucocitosis y puede deberse a:

- Anemia
- Enfermedades infecciosas
- Enfermedad inflamatoria (como artritis reumatoide o alergia)
- Leucemia
- Estrés emocional o físico severos
- Daño tisular (como, por ejemplo, quemaduras), entre otros (Echave, J. 2012).

3.2.2.2 Elaboración y tinción de frotis sanguíneo.

Fundamento:

La tinción de Wright está constituida por una mezcla de dos colorantes, el azul de metileno oxidado (azur B) y eosina Y, preparados en metanol. Se denomina tinción policromática porque producen múltiples colores cuando se aplican a células y a sus componentes; lo que se logra cuando se adiciona la solución Buffer de fosfatos a la tinción, sucediendo la ionización de los colorantes, por lo que los iones de eosina que están cargados negativamente, tiñen a los componentes básicos celulares en color naranja hasta rosa, en tanto que el colorante azul de metileno oxidado que está cargado positivamente, tiñe en tonos desde azul hasta púrpura a las estructuras ácidas de las células (Ávila, I., Campos, M., et al. 2015)



Técnica:

- Homogeneizar la sangre entera, por inversión (ascendiendo y descendiendo la muestra en el tubo 4 a 5 veces) como se muestra en la *Imagen 22.- Homogeneización por inversión.*
- Para preparar la extensión sanguínea, colocar con ayuda de un tubo capilar, una gota pequeña de sangre en el extremo de un portaobjetos, como se observa en la *Imagen 30.- Pasos para la elaboración de un extendido o frotis sanguíneo* en el paso 1.
- Apoyar delante de la gota, otro portaobjetos, que se identifica en la misma imagen, y que se llama extensor o portaobjetos guía, recorrerlo hasta que el borde toque la gota, inclinándolo lo necesario, menos de 45° para dispersarla a lo ancho del borde del mismo, como se muestra en el paso 2 en la imagen número 30.
- Posteriormente y sin separar el portaobjetos extensor de la gota dispersa, hacer un ángulo entre ambos portaobjetos, paso 3.
- Desplazar el portaobjetos extensor con un movimiento suave y continuo a lo largo de la superficie del portaobjetos para hacer una película de sangre, lo más delgada posible, ocupando aproximadamente a $\frac{3}{4}$ partes del portaobjetos, paso 4.
- Secar la laminilla o frotis sanguíneo al aire rápidamente para evitar ruptura de células, manteniendo el portaobjetos entre los dedos pulgar e índice. (Ávila, I., Campos, M., et al., 2015)

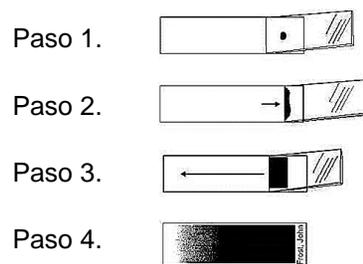


Imagen 30.- Pasos para la elaboración de un extendido o frotis sanguíneo. Tomado de goo.gl/UpQVG1

Tinción del frotis sanguíneo.

- Cubrir la extensión sanguínea con colorante de Wright y dejar reposar durante 5 minutos (el tiempo puede variar dependiendo de la fecha de preparación del colorante)
- Sin remover el colorante, añadir sobre el portaobjetos un volumen igual de solución amortiguadora de fosfatos, haciendo que se mezclen bien las dos soluciones sobre el portaobjetos; dejar reposar durante 7 minutos. Un brillo verde metálico debe formarse en la parte superior.
- Una vez transcurrido el tiempo eliminar la mezcla colorante-buffer (en charola) y usando un piseta con agua, lavar para eliminar el excedente de colorante del portaobjetos, dejarlo recargado, para que se seque; y limpiar el dorso del portaobjetos con un pedazo de papel absorbente o con algodón impregnado de etanol.
- Una vez seco el frotis, colocar la preparación en la platina del microscopio óptico, observar primero con el objetivo de 10x para revisar si la preparación se tiñó adecuadamente y que la distribución celular permite su identificación individual, después observar con el objetivo 40x, para seleccionar la mejor área de la extensión sanguínea, solamente deberá usarse el tornillo micrométrico del microscopio; finalmente con el objetivo de inmersión 100x, colocar el aceite y llevar a cabo la evaluación morfológica correspondiente (Ávila, I., Campos, M., et al., 2015).

3.2.2.3 Recuento Leucocitario Diferencial.

Fundamento:

Los leucocitos son parte fundamental del tejido hemático y presentan las siguientes características: son células que tienen un mayor diámetro que los eritrocitos, presentan un núcleo de forma irregular, su citoplasma presenta algunas granulaciones las cuales son teñidos con diferentes colorantes, y la cromatina del núcleo puede ser de diferentes densidades.



Pueden distinguirse 5 tipos de leucocitos maduros: Neutrófilos, Linfocitos, Monocitos, Eosinófilos y Basófilos.

Basándose en general en las siguientes características: Tamaño de la célula, forma del núcleo, contenido de gránulos, consistencia de la cromatina nuclear, coloración de los gránulos.

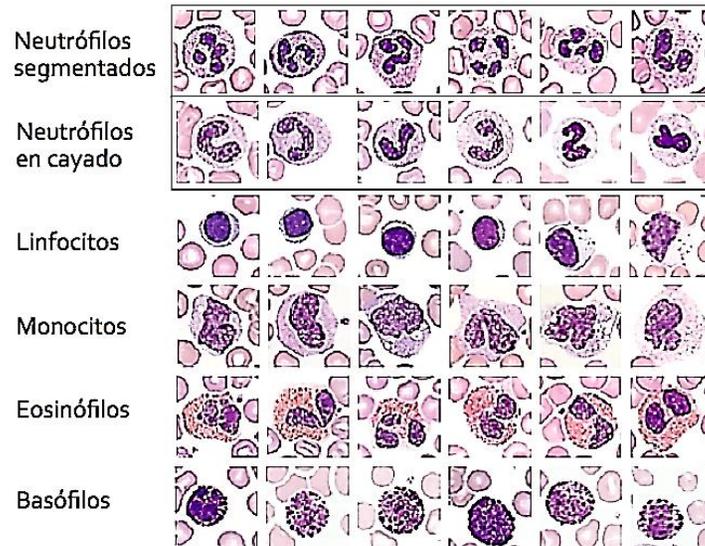


Imagen 31.- Tipos de Glóbulos Blancos o Leucocitos. Tomado de goo.gl/J2ydgP

3.2.2.3.1 Características morfológicas de las Células Blancas.

Neutrófilo segmentado:

Tamaño de 9 a 15 micras, gránulos específicos abundantes, de color rosa violeta, pocos gránulos no específicos están presentes, núcleo: normalmente dos a cinco lóbulos, asimétricos, conectados por finos filamentos de cromatina (Ávila, I., Campos, M., et al., 2015). Como se muestra en la imagen número 31

Neutrófilo en Banda:

En la maduración, es la etapa previa al neutrófilo segmentado; mide 9 a 5 micras, El núcleo es elongado o en forma de banda. La cromatina es áspera, citoplasma, de moderado a abundante, los gránulos son rosa violeta y muy numerosos. (Ávila, I., Campos, M., et al., 2015) Como se muestra en la imagen 31.

Eosinófilo:

De 9 a 15 micras de diámetro, citoplasma con gránulos de forma esférica, que tienen afinidad por la eosina (por la proteína básica presente), tomando un tono anaranjado brillante distribución homogénea, de tamaño uniforme (más grandes que los del neutrófilo), generalmente no cubren al núcleo. El núcleo suele bilobularse de manera simétrica, con cromatina áspera (Ávila, I., Campos, M., et al., 2015) Como se muestra en la imagen 31.

Basófilo:

De 9 a 15 micras de diámetro, Citoplasma: contiene gránulos nespecíficos, que se tiñen de morado oscuro a negro azulado, (principalmente por la heparina presente). Tiene menos gránulos que los eosinófilos, suelen verse por encima a los lados del núcleo que es de tinte relativamente pálido; con frecuencia están rodeados por una zona débilmente teñida. Núcleo: En ocasiones no se visualiza por el color intenso de los gránulos, tiene forma irregular y se lobula totalmente, su cromatina no es áspera como en los neutrófilos o en los eosinófilos (Ávila, I., Campos, M., et al., 2015). Como se muestra en la imagen 31

Linfocito:

En sangre periférica está presente en varios tamaños, con propósito de descripción se dividen en tres categorías pequeño, mediano y grande. Con una variación en el tamaño de 8 a 16 micras de diámetro.

Linfocito pequeño: 8 a 10 micras de diámetro, su citoplasma forma un delgado anillo alrededor del núcleo y tiene un color azul oscuro. Su núcleo es de forma redonda u oval.

Linfocito mediano: mide de 10 a 12 micras el citoplasma es más abundante que el anterior de color pálido a un moderado azul, puede o no tener pocos gránulos azurófilos; su núcleo es redondo u oval.

Su cromatina no es tan densa como el pequeño linfocito.

Linfocito grande: diámetro de 12 a 16 micras; citoplasma abundante de color claro a azul pálido, puede presentar escasos gránulos azurófilos no específicos. Su núcleo es redondo u oval, con cromatina áspera (Ávila, I., Campos, M., et al., 2015). Como se muestra en la imagen 31.



Técnica:

- Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la laminilla con el extendido sanguíneo, teñida y seca, anteriormente elaborada, leer al microscopio con el objetivo de 100x.
- Se hará un recuento de 100 células blancas en total, diferenciando cada una de ellas según sus características antes citadas.

Cálculos:

Cada subpoblación celular leucocitaria identificada corresponde al porcentaje de ella (%) en la muestra sanguínea (dato denominado valor relativo).

La concentración de cada subpoblación leucocitaria por unidad de volumen (uL o mm³) se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{células blancas/uL} = \left(\frac{\text{Leucocitos Totales/uL}}{100} \right) (\% \text{ de la célula})$$

Valores de Referencia:

Tabla 17.- Valores de Referencia de las subpoblaciones de leucocitos.

Nombre del Leucocito	% (Relativo)	Células / uL (Absoluto)
Neutrófilos totales	40 a 60	1500 a 700
Neutrófilos en banda (NB)	0 a 10	0 a 800
Neutrófilos segmentados (NS)	20 a 40	2000 a 6000
Linfocitos (Li)	10 a 40	1000 a 4200
Monocitos (Mo)	0 a 10	0 a 800
Eosinófilos (Eo)	0 a 7	0 a 350
Basófilos (Ba)	0 a 3	0 a 150

3.2.2.4 Evaluación morfológica Eritrocitaria y Plaquetaria.

Fundamento:

Los eritrocitos son los encargados de transportar oxígeno de los pulmones al resto del cuerpo, mediante un proceso enzimático. Éstos poseen un diámetro aproximado de 6 a 8 µm, son de color rojo pálido, de morfología bicóncava; Mientras que las plaquetas forman parte del sistema de hemostasia o coagulación de la sangre, derivan del fraccionamiento de los megacariocitos, presentando diversas morfologías. A partir del frotis de sangre periférica debidamente preparado y teñido se evalúa microscópicamente a las células sanguíneas. De esta manera se puede obtener una cantidad considerable de información valiosa, como tamaño, color, forma y cantidad de las células sanguíneas como los glóbulos rojos y las plaquetas.

3.2.2.4.1 Características morfológicas de células Eritrocitarias y Plaquetarias.

Eritrocito:

Es un disco bicóncavo, 6 a 8 micras de diámetro, no presenta núcleo, 1.5 a 2.5 micras de espesor, volumen/eritrocito (VCM), de 80 a 100 fL (femtolitros), corpúsculos circulares con borde liso, eosinofílico por la hemoglobina (proteína básica), observándose teñido de rosa a naranja, en el centro presenta palidez (cerca de un tercio de la superficie de la célula (Ávila, I., Campos, M., et al., 2015).

Plaquetas:

Son fragmentos citoplasmáticos de los megacariocitos, diámetro de 1 a 4 micras, su forma puede ser: redonda, ovalada, fusiformes o discoides, con bordes lisos, presenta numerosos filamentos o prolongaciones en forma de tentáculos, contiene pequeños gránulos azules que se localizan en el centro.

Técnica:

- Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la laminilla teñida y seca, leer al microscopio con el objetivo de 100x.



- Identificar las características antes citadas, evaluando la morfología de eritrocitos y plaquetas, y reportar anomalías.
- Colocar los resultados en la *Tabla 21.- Tabla de resultados experimentales para la determinación de la Citometría Hemática.*

3.2.3 Determinación de la Fórmula Plaquetaria.

3.2.3.1 Cuento Plaquetario Manual (Hemocitómetro).

Fundamento:

La sangre anticoagulada con EDTA se mezcla con Oxalato de amonio para lisar hematíes y leucocitos, y realizar el conteo de plaquetas (Ávila, I., Rodríguez, B., et al., 2017).

Técnica:

- Homogeneizar la sangre entera, por inversión (ascendiendo y descendiendo la muestra en el tubo 4 a 5 veces) como se muestra en la *Imagen 22.- Homogeneización por inversión.*
- Con la boquilla y la pipeta de Thoma para dilución de glóbulos rojos, aspirar sangre hasta la marca 1.0 (SIN BURBUJAS) y limpiar la parte exterior de la pipeta de Thoma con papel absorbente.
- Aspirar reactivo Oxalato de amonio al 1 % frío, hasta la marca 101, evitando crear burbujas y limpiar la parte exterior de pipeta nuevamente con papel absorbente.
- Agitar la pipeta suavemente durante 1 min.
- Desechar las 3 primeras gotas de la dilución de la pipeta de Thoma.
- Antes de depositar la muestra sobre el Hemocitómetro es importante cerciorarse de que la cámara se encuentre limpia y seca, para esto es necesario humedecer una torunda con alcohol al 70% y frotar suavemente las cuadrículas del hemocitómetro, posteriormente secar con una torunda nueva o limpia sin alcohol cuidando de no dejar algún residuo de algodón o pelusa.

- Repetir el mismo procedimiento con el cubreobjetos de la cámara de Neubauer, teniendo mayor precaución ya que es más frágil.
- Colocar el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer.
- En la cámara de recuento llenar la cuadrícula elegida de solo un lado, colocando la punta de la pipeta de Thoma, entre el cubreobjetos y el hemocitómetro, tratando que fluya libremente por difusión el líquido y cuidando que no se derrame a los canales, como se muestra en la *Imagen 26.- Llenado del Hemocitómetro o Cámara de Neubauer.*
- Posterior al llenado de la cámara, colocar el hemocitómetro en una cámara húmeda durante 10 minutos. Esta cámara será elaborada con ayuda de una caja Petri y una base de algodón humedecida con agua corriente, tal y como se muestra en la imagen 31.



Imagen 31.- Cámara húmeda para hemocitómetro. Foto obtenida Curso 2018-I Análisis Clínicos CCH-Azc.

- Pasado el tiempo colocar sobre la platina del microscopio el hemocitómetro.
- Localizar la cuadrícula del hemocitómetro y enfocar con el objetivo de 10X, a fin de tener certeza de que se está enfocando la zona adecuada. Enfocar con el objetivo de 40X, haciendo uso únicamente del tornillo micrométrico, y proceder a realizar la lectura.
- Localizar la cuadrícula en la que se lleva a cabo el conteo plaquetario. Se pueden ver en la *Imagen 32.- Cuadrícula de Hemocitómetro o*



Cámara de Neubauer, indica los cuadros usados para el conteo plaquetario total.

- El recuento se realizará en el cuadro más central del hemocitómetro, contando las plaquetas localizadas en los 25 cuadros de los centrales. Como se muestra en la imagen 32.- Cuadrícula de Hemocitómetro o Cámara de Neubauer.
- Comenzar por el extremo seleccionado y contar el número de células que se encuentran dentro de él. Es necesario colocar el número de células que se encontraron en cada cuadro, en la siguiente tabla.
- Es importante que las plaquetas se observen con baja intensidad de luz, y caracterizarlas de acuerdo a su forma redonda u ovalada y saber que son células que presentan el fenómeno de refringencia.
- Para bajar la intensidad de luz, es posible hacerlo de dos maneras:
 - 1.- Girando la palanca del condensador a la intensidad de luz adecuada
 - 2.- O al girar el botón de la intensidad de luz que controla la lámpara.

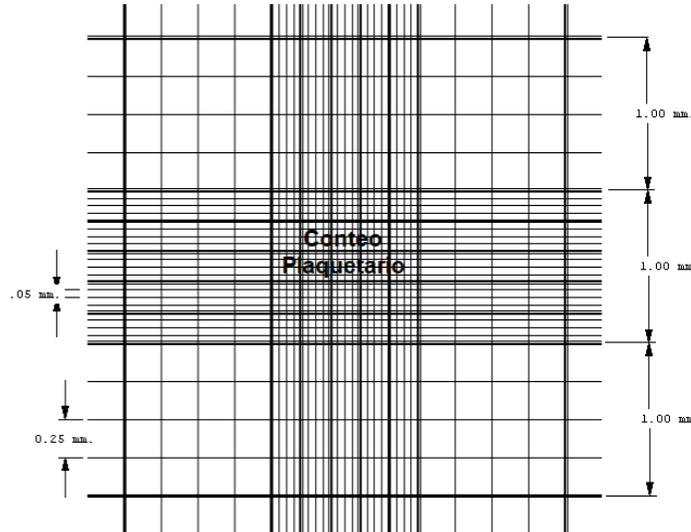


Imagen 32.- Cuadrícula de Hemocitómetro o Cámara de Neubauer, indica los cuadros usados para el conteo plaquetario total. Tomado de goo.gl/2kMSmz.

Cálculos:

Cuadro Central	Total

De los 25 cuadrados en que se encuentra subdividido el centro del Hemocitómetro, se cuentan todos, con un recuento total representativo de 1 mm².

Ya que la profundidad de la cámara que es de 0.1 mm, multiplicado por el recuento total de 1 mm² es igual a 0.1 mm³, por los 25 cuadros (Conteo Plaquetario) debiéndose multiplicar por 10 para corregir a 1 mm³.

Sobre la base de una dilución de 1:100 y la corrección de 10, el cálculo se efectúa como sigue:

$$\# \text{ Plaquetas / mm}^3 \text{ o uL} = (\text{Total de plaquetas contabilizadas}) (100) (10)$$

Valores de Referencia:

150,000 a 450,000 plaquetas / mm³

Significado Clínico:

La Trombocitopenia (<150,000 plaquetas/mm³) se presenta por disminución de la producción o de la vida media, secuestro (esplenomegalia) o después de transfusiones de sangre.

La Trombocitosis (>450,000 plaquetas/mm³) puede deberse a desordenes de tipo mieloproliferativo y pueden asociarse con complicaciones trombóticas y/o sangrados (Ávila, I., Rodríguez, B., et al., 2017).

3.2.3.2 Conteo Plaquetario Manual (Extensión sanguínea)

Fundamento:

Determinar el número de plaquetas presentes en sangre anticoagulada con EDTA, al realizar una extensión sanguínea, fijarla, teñirla y observarla al microscopio óptico, con lo que también es posible evaluar su morfología.



Técnica:

- Utilizando la extensión sanguínea realizada en el punto 9.2.2, realizar lo que se solicita a continuación.
- Observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100x)
- Contar el número de plaquetas en 10 campos diferentes, elegidos al azar y calcular el promedio, realizar los cálculos en la sección de resultados.

Cálculos:

$$\text{Número de plaquetas / mm}^3 = (\text{Número de plaquetas por campo}) (20,000)$$

Valores de referencia:

150,000 a 450,000 plaquetas / mm³

Significado Clínico:

La Trombocitopenia (<150,000 plaquetas/mm³) se presenta por disminución de la producción o de la vida media, secuestro (esplenomegalia) o después de transfusiones de sangre.

La Trombocitosis (>450,000 plaquetas/mm³) puede deberse a desordenes de tipo mieloproliferativo y pueden asociarse con complicaciones trombóticas. Ávila, I., Rodríguez, B., et al., 2017).

Resultados.

Tabla 18.- Datos del Paciente.

Nombre:		Edad:	Sexo:
Horas de ayuno:	Dx presuntivo:	Fecha de evaluación:	

Realizar los cálculos para la determinación de la Fórmula Roja en los siguientes espacios:

1.- Determinación de Hemoglobina (Hb) _____ g/dL.

	Blanco	Patrón	Muestra
Absorbancia			

2.- Determinación de Hematocrito (Hto) _____ %

3.- Conteo Eritrocitario Manual _____ eritrocitos/ uL o mm³

4.- Determinación de la VSG _____ mm/ hr

5.- Determinación de Índices de Wintrobe

VCM= _____ fL/ e

HCM= _____ pg/ e

CHCM= _____ g/ dL.

Realizar los cálculos para la determinación de la Fórmula Blanca en los siguientes espacios:

6.- Conteo Leucocitario Total. _____ Leucocitos/uL o mm³

7.- Recuento Leucocitario Diferencial.
Neutrófilo Segmentados= _____ NS/uL



Neutrófilo Banda= _____ NB/uL

Linfocito= _____ Li/uL

Monocito= _____ Mo/uL

Eosinófilos= _____ Eo/uL

Basófilo= _____ Ba/uL

Neutrófilo en banda		
Linfocito		
Monocito		
Eosinófilo		
Basófilo		

Tabla 19.- Resultados de la evaluación de las características Morfológicas de células Leucocitarias.

Donde realizará un dibujo de cada célula observada.

Célula	Aumento	Dibujo de la célula observada.
Neutrófilo Segmentado		



Observaciones:

Tabla 20.- Resultados de la evaluación de las características morfológicas de células eritrocitarias y plaquetarias

Dónde realizará un dibujo de cada célula observada.

Célula	Aumento	Dibujo de la célula observada.
Eritrocito		
Observaciones:		
Plaqueta		
Observaciones:		

Realizar los cálculos para la determinación de la Fórmula Plaquetaria en los siguientes espacios:

Calcular:

8.- Conteo Plaquetario Manual (Hemocitómetro)
_____ plaquetas/ mm³

9.- Conteo Plaquetario Manual (Extensión Sanguínea)
_____ plaquetas/ mm³

Tabla 21.- Tabla de resultados experimentales para la determinación de la Citometría Hemática.

Determinación	Resultado	Valores de Referencia
Hemoglobina		
Hematocrito		
VSG		
Recuento Eritrocitos		
HCM		
VCM		
CHCM		
Recuento de Plaquetas		
Recuento de Leucocitos. Relativo (%)		
Neutrófilo Segmentado		
Neutrófilo Banda		
Eosinófilos		
Basófilos		
Linfocitos		
Monocitos		
Recuento de Leucocitos. Absoluto (células/ uL)		
Neutrófilo Segmentado		
Neutrófilo Banda		
Eosinófilos		
Basófilos		
Linfocitos		
Monocitos		
Analista:		

Nota: Cada subpoblación celular leucocitaria identificada corresponde al porcentaje de ella (Relativo %) en la muestra analizada.



Evaluación Realizada por: _____
(Colocar nombre y firma del analista)

Fecha de la evaluación: _____
(DD/MM/AA)

Referencias.

- Ávila, C., Rodríguez, B., Reyes, M., Arellano, G. y Galván, M. (2017). Manual de prácticas de Laboratorio de Hematología. PRÁCTICA No. 8 PRUEBAS BÁSICAS PARA EVALUAR EL PROCESO HEMOSTÁTICO. UNAM Departamento de Ciencias Biológicas.
- Ávila, I., Campos, M., et al. (2015). Manual de Prácticas de Laboratorio de Análisis Bioquímicos Clínicos Generales. PRÁCTICA 2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS. UNAM- Departamento de Ciencias Biológicas.
- Ávila, I., Campos, M., et al. (2015) Manual de Prácticas de Laboratorio de Análisis Bioquímicos Clínicos Generales. PRÁCTICA 3 BIOMETRÍA HEMÁTICA DE MUESTRAS NORMALES. UNAM-Departamento de Ciencias Biológicas.
- Montalvo, C., T Pasos, F. y Hernández, R. (s.f) Tejido Sanguíneo y Hematopoyesis. UNAM, Facultad de Medicina, Departamento de Biología Celular y Tisular, Biología Celular e Histología Médica [en línea]. Recuperado el 03 de enero de 2018. De goo.gl/tgXNjb.

MODULO 4. INMUNOLOGÍA.

Práctica 4.1 Pruebas inmunológicas básicas.

Objetivo.

Con base en los principios inmunológicos de formación del complejo Antígeno-Anticuerpo, aplicar y conocer las técnicas para el desarrollo de las pruebas inmunológicas: Antiestreptolisinas, Factor reumatoide, Grupos sanguíneos, Proteína C reactiva, Prueba inmunológica de embarazo, Pruebas febriles y RPR, como un recurso de apoyo diagnóstico para el médico.

Introducción.

“Inmunología”, es una palabra de origen latino, que etimológicamente significa privilegio o exención. Actualmente, la Inmunología ya no puede limitarse al estudio de los medios de lucha contra los agentes infecciosos: su dominio, mucho más amplio, reagrupa las diversas reacciones que utiliza el organismo para mantener su integridad (Martínez, A. y Ortega, J., 2011)

Por definición, la Inmunología tiene como objetivo el estudio de los fenómenos relacionados con la inmunidad. Que se entiende como el conjunto de mecanismos de defensa que protegen contra los agentes extraños que se encuentran en el medio ambiente como hongos, virus y bacterias e incluso contra algunos agentes propios o cualquier agente que pueda causar daño. Este mecanismo se lleva a cabo mediante una secuencia de reacciones bien organizadas; el organismo ataca y destruye a los microorganismos infecciosos, que ya dentro del cuerpo se conocen como antígenos.

Las Barreras Físicas, forman parte de las Barreras Primarias externas, de la inmunidad innata, inespecífica o natural; Dichas barreras comprenden en primer lugar a la piel, que genera una cobertura impermeable para la mayoría de los microorganismos patógenos; la temperatura, entre otras.

Las barreras químicas, al igual que las anteriores componen a la inmunidad innata; las más importantes son las mucosas, que recubren sitios anatómicos como boca, las fosas nasales, vías respiratorias altas y moco gástrico; el pH, entre otras.

Las barreras biológicas, también conforman a la Inmunidad innata. Dentro de las cuales se encuentra en primer sitio la flora bacteriana de cada organismo, también conocida como microbiota,



tiene la función de impedir que otros tipos de bacterias patógenas colonicen y causen infección. La lisozima, con función antimicrobiana, se encuentra en la saliva, lágrimas, sudor, etc. La β -Lisina y la espermina, sustancias que también actúan como antimicrobianas.

Dentro del sistema de inmunidad innata también se encuentran las barreras secundarias, llamadas barreras internas, estas son las defensas internas del organismo, se encuentran en sangre y actúan principalmente frente a virus, dichas barreras son activadas cuando los microorganismos patógenos logran atravesar a las barreras primarias y llegar a tejidos profundos o a la sangre, causando una infección severa. Para combatirlos se tiene elementos como:

La Inmunidad Celular: Son células sanguíneas con capacidad fagocítica, como los macrófagos, granulocitos y polimorfonucleares (PMN), en sangre; y en los tejidos a macrófagos, que se diferencian a partir de los monocitos. Las células NK (también llamadas Asesinas Naturales o Natural Killer) que son leucocitos activados por interferones generados mediante de la respuesta a los virus.

Factores solubles incluyen a: las moléculas inactivadoras, como el sistema del Complemento; las citocinas, que reaccionan indiscriminadamente frente a cualquier estructura extraña al organismo; y las Proteínas de Fase Aguda, complejo de aproximadamente 20 proteínas que reaccionan con los sistemas de inmunidad innata y de inmunidad adquirida.

La inflamación es una reacción que se desencadena tras la entrada de un microorganismo a los tejidos. En dicha reacción hay dolor (debido a la presencia de las prostaglandinas y leucotrienos, importantes, ya que favorecen la quimiotaxis de los PMN y la dilatación de los vasos sanguíneos) y enrojecimiento o edema.

La inmunidad adaptativa o específica, se activa cuando los microorganismos patógenos, no son detenidos por las barreras antes mencionadas, que tampoco son eliminados tras la activación del complemento y por ende tampoco fueron eliminados por las citocinas.

En esta inmunidad se dan dos tipos de respuesta, una es la Inmunidad Específica Humoral que consiste en la generación de un tipo de estructuras que funcionan como “adaptadores flexibles”, los llamados Anticuerpos. Los Anticuerpos se unen por una parte a los microorganismos patógenos y por la otra se anclan a los fagocitos, no importando de qué tipo de microorganismo se trate, con ello neutralizan

a los agentes extraños e inducen a su fagocitosis y destrucción.

Los anticuerpos son moléculas que poseen dos sitios de reacción, uno de ellos reconoce al agente extraño (antígeno) y el otro es reconocido por las células fagocíticas, esta unión entre Ag y Ac generará:

- La activación del complemento por una vía conocida como la vía clásica, que lleva a la destrucción del microorganismo patógeno.
- La opsonización (recubrimiento de moléculas conocidas como opsoninas) de los fagocitos con complejos Antígeno-Anticuerpo que favorecen a la fagocitosis.
- Neutralización directa de toxinas de virus o bacterias por la simple unión generada entre en Antígeno y el Anticuerpo.

El otro tipo de inmunidad adaptativa o específica es la inmunidad celular, en esta inmunidad participan células del linaje linfocitario, dichas células se conocen como Linfocitos T, parecidos genéticamente a los Linfocitos B pero diferenciados en el Timo.

Los Linfocitos T reconocen al antígeno extraño, situado sobre la superficie de las células del propio organismo hospedador. El receptor de los Linfocitos T, es diferente al de los Anticuerpos, aunque comparten estructuras similares. Estos Linfocitos se subdividen en Linfocitos T citotóxicos o matadores (Linfocitos T_C) principales efectores de la inmunidad específica celular. Los T_C destruyen a las células del propio organismo infectadas por virus ya que en el cuerpo existen múltiples clones de ellos.

Los Linfocitos colaboradores o coadyuvantes (Linfocitos T_H) no tienen actividad matadora, ocupan un papel central en el sistema inmune activando a otras células como: macrófagos, Linfocitos T_C y B (Iáñez, E., 2003)

De esta manera es como el cuerpo humano y en general el de los vertebrados y más específicamente el de los mamíferos es capaz de combatir a los agentes y microorganismos patógenos contra las infecciones.

Equipos reactivos y materiales

Muestra biológica.

6 mL de sangre venosa sin anticoagulante, extraída mediante sistema al vacío, en un tubo de tapón de color amarillo o rojo.

10 mL aproximadamente de orina recién obtenida.



Material por grupo.

Gradillas y propipetas.
Tubos de ensayo de 15x100 mm.
Servitoallas y Torundas.
Micropipeta de 10 a 100 uL.
Adaptador para extracción de sangre por sistema al vacío.
Agujas de punta doble de calibre 20 para sistema al vacío.
Tubos al vacío Topón Rojo o Amarillo.
Pipeta Pasteur (Punta larga) con Bulbo.
Placa para visualización de precipitados o placa inmunológica.

Reactivos

1 Kit para determinación de Antiestreptolisinas O.
1 Kit para determinación de Factor reumatoide.
1 Kit para determinación de Proteína C.
1 Kit para determinación de Prueba de embarazo.
1 Kit para determinación de RPR.
1 Kit para determinación de VDRL.
1 Kit de sueros hemotipificadores.

Procedimiento experimental.

Obtención de la muestra sanguínea.

- Armar el sistema de extracción por método al vacío, utilizando aguja calibre 21x33 (color verde).
- Rotular con marcador indeleble negro los tubos con vacío, tapón color rojo o amarillo, que se van a utilizar para la recolección de la muestra.
- Realizar la venopunción como lo indica el procedimiento experimental, *punción mediante sistema al vacío*, de la **Práctica 8. "Obtención de muestras sanguíneas venosa mediante jeringa y sistema al vacío"**.
- Permitir la coagulación de la muestra esperando por lo menos 5 minutos después de la extracción.
- Centrifugar a 2500 rpm/5 minutos. Para la obtención de suero sanguíneo.
- Rotular un tubo con nombre del paciente y separa el suero con ayuda de una pipeta Pasteur sin generar espuma.

Obtención de la muestra urinaria

- En caso de muestra urinaria, seguir las recomendaciones de la Práctica 7. "**Examen General de Orina**", en las *Indicaciones para el Paciente*:

4.1.1 Antígenos Febriles (Reacciones Febriles).

4.1.1.1 Introducción a las Reacciones Febriles.

Las reacciones febriles, ayudan al diagnóstico de infecciones bacterianas que causan fiebre fácilmente, tales como la Salmonelosis o Fiebre de Tifoidea, Brucelosis también conocida como Fiebre Ondulante, ya que aparece en determinadas horas del día.

El sistema inmune de los humanos responde produciendo anticuerpos en contra de los patógenos, en especial de las estructuras químicas que los componen, éstas se conocen como pirógenos. Dichos anticuerpos de defensa son identificados en la muestra sanguínea del paciente y también son clasificados de acuerdo al tipo de infección que producen y la cantidad presente de cada uno, en el suero sanguíneo. En la Determinación de las Reacciones Febriles las pruebas que se realizan son: *Tífico O*, *Tífico H*, *Paratífico A* y *Paratífico B*, *Proteus OX 19* y *Brucella abortus*.

Las reacciones de aglutinación que se llevan a cabo durante el ensayo se fundamentan bajo lo siguiente:

Reacción de Widal:

Antígeno tífico "O"; Antígenos tífico "H"

Antígeno paratífico "A"; Antígeno paratífico "B"

Reacción de Weil-Félix: Para el Diagnóstico de Rickettsias.

Antígeno Proteus OX-19

Reacción de Huddleson:

Antígeno *Brucella abortus*

Fundamento:

La prueba de antígenos bacterianos es una técnica de aglutinación en placa de vidrio inmunológica y tubo para la detección y semicuantificación de anticuerpos anti-Salmonella, anti-Brucella y anti-Proteus en suero humano. Los reactivos, suspensiones bacterianas, coloreadas y estandarizadas, aglutinan en presencia del anticuerpo homólogo correspondiente en las muestras ensayadas (SPINREACT).

Técnica:

4.1.1.2 Método de aglutinación en placa (Cualitativo).

- Dejar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente ya que la sensibilidad del ensayo disminuye a temperaturas bajas.



- Identificar correctamente los antígenos: *Tífico O*, *Tífico H*, *Paratífico A* y *Paratífico B*, *Proteus OX 19* y *Brucella abortus*, tal y como se muestra en la *Imagen 35.- Determinación de los Antígenos Febriles*.

- En el caso de los controles positivo y negativo, es necesario montarlos en una placa distinta con los mismos antígenos que se utilizarán para la determinación.

- Mezclar el reactivo vigorosamente o con el agitador vortex antes del ensayo.

- Sobre círculos distintos de una placa inmunológica, como la que se muestra en la *Imagen 33.- Placa de vidrio para Inmunología, 5x6 pocillos*. Con ayuda de una micropipeta, depositar de 50 µL de la muestra del paciente.

- Añadir 50 µL de cada uno de los Antígenos (el gotero de cada uno de los frascos está diseñado para dispensar este volumen),

- Mezclar las gotas con un palillo o aplicador de madera limpio, procurando extender la mezcla por toda la superficie interior del círculo. Emplear palillos distintos para cada muestra o determinación, como se muestra en la *Imagen 37.- Forma de mezclar con palillos de madera los reactivos sobre el porta o placa para inmunología*.

- Situar la placa sobre un agitador rotatorio a 80-100 r.p.m., durante 5 minutos ó agitar durante 5 minutos manualmente e interpretar inmediatamente como se indica a continuación.

- Examinar macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación inmediatamente después de retirar la placa de la agitación y comparar los resultados con los sueros control positivo y negativo.

4.1.1.3 Método de aglutinación en placa (Cuantitativo). En caso de presentar resultados positivos.

- Del antígeno que haya resultado positivo, realizar el siguiente procedimiento en una placa de vidrio para inmunología, como la

mostrada en la *Imagen 33.- Placa de vidrio para Inmunología, 5x6 pocillos*.

- Utilizando una micropipeta, dispensar 80, 40, 20, 10 y 5 µL del suero del paciente, en círculos separados de la placa.

- Para cada Antígeno a utilizar que resultaron positivos en la prueba anterior (*Tífico O*, *Tífico H*, *Paratífico A* y *Paratífico B*, *Proteus OX 19* o *Brucella abortus*). Como se muestra en la *Imagen 34.- Placa de vidrio para inmunología, Método de aglutinación en placa Cuantitativo para las Reacciones Febriles*.

- Depositar 50 µL del antígeno en cada círculo próximo a la muestra a ensayar. En total son 5 gotas de cada antígeno (para conocer la última dilución a la que aglutina la muestra).

- Mezclar con ayuda de un palillo, procurando extender la mezcla por toda la superficie interior del círculo, como se muestra en la *Imagen 37.- Forma de mezclar con palillos de madera los reactivos sobre el porta o placa para inmunología*. Procurando usar un palillo diferente para cada círculo de la placa.

- Situar la placa sobre un agitador rotatorio a 80 - 100 r.p.m. o agitar manualmente durante 5 minutos, moviendo en círculos continuamente.

- Interpretar como se indica a continuación: Examinar macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación inmediatamente después de retirar la placa de la agitación y comparar los resultados con los sueros control Positivo y Negativo.

Tabla de interpretación de la Técnica Cualitativa.

Suero (uL)	80	40	20	10	5
Dilución	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320

- Dependiendo del último pocillo dónde se presente aglutinación, identificar la cantidad de suero añadido y así obtener el título haciendo uso de la tabla anterior.



- Registrar los resultados obtenidos en la *Tabla 23.- Tabla de resultados experimentales para la determinación de Reacciones Febriles* en la sección de resultados.

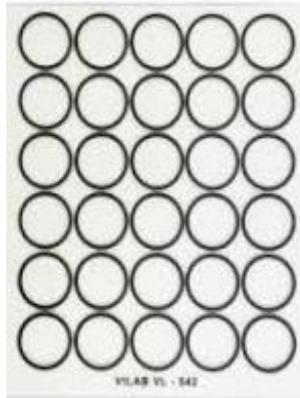


Imagen 33.- Placa de vidrio para Inmunología, 5x6 pocillos. Foto obtenida Curso 2018-I Análisis Clínicos CCH-Azc

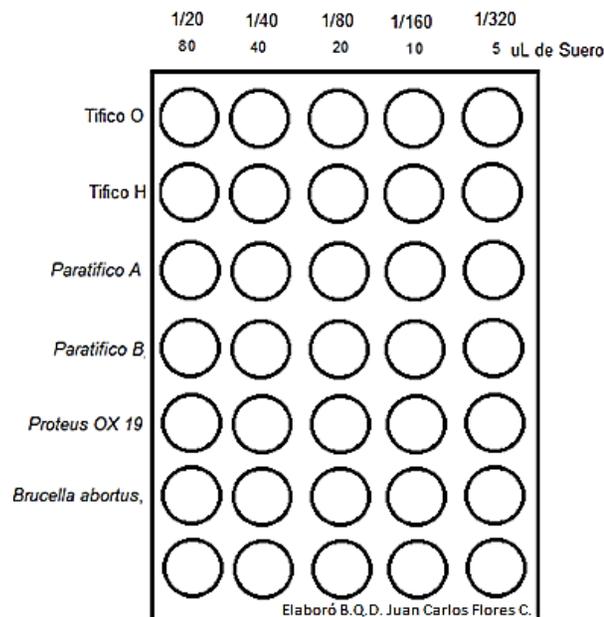


Imagen 34.- Placa de vidrio para inmunología, Método de aglutinación en placa Cuantitativo para las Reacciones Febriles.



Imagen 35.- Determinación de los Antígenos Febriles. Foto obtenida del curso 2018-I Análisis Clínicos CCH-Azc

Valores de Referencia:

Niveles de anticuerpos con títulos superiores a 1/80 en suero, es indicativo de infección por estos microorganismos. Títulos menores no tienen relevancia diagnóstica.

Significado Clínico:

El diagnóstico de enfermedades febriles puede establecerse bien sea por el aislamiento del microorganismo en sangre, orina o heces o por la demostración del título de anticuerpos específicos, somáticos (O) y flagelares (H) en el suero del paciente. La determinación de estos anticuerpos forma las bases para el ensayo de Widal que establece que altos niveles de anticuerpos O y H superiores a 1/100 en suero, es indicativo de infección por estos microorganismos (SPINREACT)

4.1.2 Determinación cualitativa de anti-Estreptolisina O.

4.1.2.1 Introducción a la determinación de ASLO.

La determinación de anti-Estreptolisina O, es una prueba en la que se mide y se puede comprobar la existencia de anticuerpos generados en contra de la Estreptolisina O (ASLO), toxina que es producida por las bacterias del género Streptococcus del grupo A. De esta manera es como se asegura que el paciente contrajo la infección estreptocócica de dicho grupo, ya que el sistema inmune del organismo generó estas proteínas de defensa (anticuerpos) en contra de la toxina específica Estreptolisina O.

Fundamento:

El ASO-Látex es una técnica de aglutinación en placa para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos anti-estreptolisina O



(ASLO) en suero humano. Las partículas de látex recubiertas con estreptolisina O (ASLO) son aglutinadas por anticuerpos ASLO presentes en la muestra del paciente (SPINREACT).

Técnica:

- Dejar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente ya que la sensibilidad del ensayo disminuye a temperaturas bajas.
- Depositar 50 µL de la muestra a ensayar y una gota de cada uno de los controles positivo y negativo, sobre tres círculos distintos de la tarjeta o placa de fondo negro, como la que se muestra a continuación incluida en el kit.

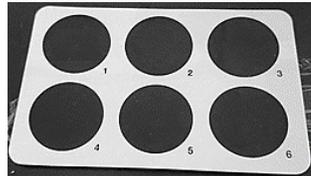


Imagen 36.- Tarjeta de fondo negro. Foto obtenida del curso 2018-I Análisis Clínicos CCH-Azc.

- Homogeneizar el reactivo de ASLO- látex vigorosamente o con el agitador vortex, antes de usar y colocar 50 µl (el gotero de cada uno de los frascos está diseñado para dispensar este volumen), junto a cada una de las gotas anteriores.
- Mezclar las gotas con un palillo de madera limpio, procurando extender la mezcla por toda la superficie interior del círculo de la tarjeta de fondo negro. Es importante emplear palillos distintos para cada muestra o determinación. Como se muestra en la siguiente imagen:



Imagen 37.- Forma de mezclar con palillos de madera los reactivos sobre tarjeta fondo negro. Tomado de goo.gl/RybZV4

- Situar la tarjeta de fondo negro sobre un agitador rotatorio de 80 – 100 r.p.m. y agitar durante 2 minutos o agitar manualmente durante 2 minutos, realizando movimientos circulares. Tener en cuenta que el exceso de tiempo puede originar la aparición de falsos positivos.
- Interpretar los Resultados de acuerdo a la siguiente imagen.

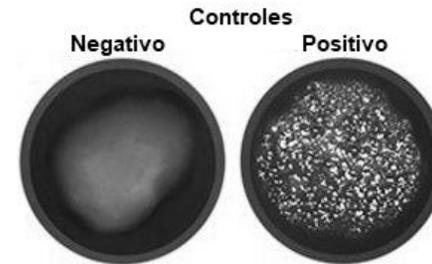


Imagen 38.- Controles negativo y positivo de una aglutinación látex en tarjeta de fondo negro. Un resultado positivo se presenta como aglutinación delicada parecida a una fina arenilla. Tomado de goo.gl/cgJSgt.

- Examinando macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación, inmediatamente después de retirar la placa del agitador.
- Nota:** La presencia de aglutinación indica una concentración de ASLO igual o superior a 200 UI/mL
- Registrar los resultados obtenidos en la *Tabla 25.- Tabla de resultados experimentales de pruebas Inmunológicas básicas* en la sección de resultados.

Significado Clínico:

La estreptolisina O es un exoenzima inmunogénica tóxica producida por los Estreptococos Hemolíticos de los grupos A, C y G. La cuantificación de los anticuerpos ASLO se utiliza para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades como las fiebres reumáticas, glomerulonefritis aguda, y otras infecciones estreptocócicas. La fiebre reumática es una enfermedad inflamatoria que afecta al tejido conectivo de diversas zonas del cuerpo humano (piel, corazón, articulaciones, entre otras) y la glomerulonefritis aguda es una inflamación del riñón que afecta principalmente a los glomérulos renales (SPINREACT).



4.1.3 Determinación del Factor Reumatoide (FR).

4.1.3.1 Introducción a la determinación del FR.

El factor reumatoide es una determinación que se realiza en el suero de los pacientes. Tiene la función de evidenciar la presencia de un autoanticuerpo que se genera en contra de la fracción Fc de la Inmunoglobulina G (Ig G) y en general se utiliza para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (AR) o el Síndrome de Sjögren.

Fundamento:

El Factor Reumatoide-Látex es una técnica de aglutinación en placa para la detección cualitativa y semicuantitativa de factores reumatoides (FR) en suero humano. Las partículas de látex recubiertas con gamma-globulina humana son aglutinadas por factores reumatoides presentes en la muestra del paciente (SPINREACT).

Técnica:

- Dejar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente ya que la sensibilidad del ensayo disminuye a temperaturas bajas.
- Depositar 50 µL de la muestra a ensayar y una gota de cada uno de los controles positivo y negativo sobre círculos distintos de una tarjeta de fondo negro como la que se muestra en la *Imagen 36- Tarjeta de fondo negro*.
- Homogeneizar suavemente el reactivo de Factor Reumatoide-Látex antes de usar y colocar 50 µL junto a cada una de las gotas anteriores, (el gotero de cada uno de los frascos está diseñado para dispensar este volumen)
- Mezclar con un palillo de madera limpio, procurando extender la mezcla por toda la superficie interior del círculo. Emplear palillos distintos para cada muestra o determinación. Como se muestra en la *Imagen 37- Forma de mezclar con palillos de madera los reactivos sobre tarjeta de fondo negro*.

- Situar la tarjeta de fondo negro o la placa para inmunología sobre un agitador rotatorio a 80 – 100 r.p.m. durante 2 minutos o agitar manualmente 2 minutos, realizando movimientos circulares. El exceso de tiempo puede originar la aparición de falsos positivos.

- Interpretar los resultados de acuerdo a la *Imagen 38.- Controles negativo y positivo, de una aglutinación látex en tarjeta de fondo negro*.
- Examinando macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación inmediatamente después de retirar la tarjeta o placa para inmunología del agitador.

Nota: La presencia de aglutinación indica una concentración de FR igual o superior a 8 UI/mL.

- Colocar el resultado obtenido en la *Tabla 23.- Tabla de resultados experimentales de pruebas Inmunológicas Básicas* en la sección de Resultados.

Valores de referencia:

Hasta 8 UI/mL. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia (SPINREACT).

Significado Clínico:

Los factores reumatoides son un grupo de anticuerpos dirigidos contra la fracción Fc de las inmunoglobulinas G (IgG). Aunque se hallan presentes en un gran número de desórdenes reumáticos, tales como el lupus eritematoso sistémico (SLE) y el síndrome de Sjögren, su principal interés clínico radica en el diagnóstico de la artritis reumatoide (SPINREACT).

4.1.4 Determinación de Grupo Sanguíneo (SABO) y Factor Rh o D.

4.1.4.1 Introducción al Sistema ABO y determinación del Factor Rh o D.

En cuanto a la determinación del grupo sanguíneo mediante el sistema ABO, es necesario conocer que en la membrana de los glóbulos rojos existen complejos químicos, que representan los llamados grupos o



factores sanguíneos. Fue Landsteiner quien realizó en 1900 el importante descubrimiento de que los eritrocitos del hombre pertenecen a varios sistemas antigénicos diferentes.

Las técnicas usadas para demostrar la presencia de diferentes grupos sanguíneos son inmunológicas, y se basan principalmente en la detección de los antígenos eritrocitarios mediante su reacción con anticuerpos específicos. La reacción positiva antígeno-anticuerpo, produce el fenómeno de aglutinación de los glóbulos rojos, que habitualmente se puede observar a simple vista en un portaobjetos o en un tubo de ensaye. Los sistemas más importantes desde el punto de vista médico, son ABO y Rh en la población latinoamericana ya que en ambos es necesaria la compatibilidad para poder efectuar transfusiones sanguíneas y trasplantes sin dificultades.

El suero tipificador anti-D provoca una aglutinación en caso de presentar la proteína Rh, que rodea al eritrocito. Cada tipo de sangre puede ser positivo "+" (tiene la proteína Rh) o negativo "-" (sin proteína Rh). Por ejemplo, una persona cuyo tipo de sangre es "A positivo" (A +), se unen las proteínas de tipo A y Rh en la superficie de glóbulos rojos (Bonilla, R., 2016)

Fundamento:

Los sueros hemotipificadores provocarán una aglutinación directa de los hematíes que lleven el correspondiente antígeno A o B.

La no aglutinación indica en general la ausencia de alguno de estos antígenos. Los reactivos ABO IgM monoclonales para grupaje sanguíneo contienen anticuerpos monoclonales de ratón diluidos en tampón fosfato, que contiene cloruro sódico, EDTA y albúmina bovina. Azul: anti-A; Amarillo: anti-B. El grupo sanguíneo se clasifica de acuerdo con el sistema de tipificación ABO. Este método separa a los grupos de sangre en cuatro: Tipo A, Tipo B, Tipo AB, Tipo O (SPINREACT).

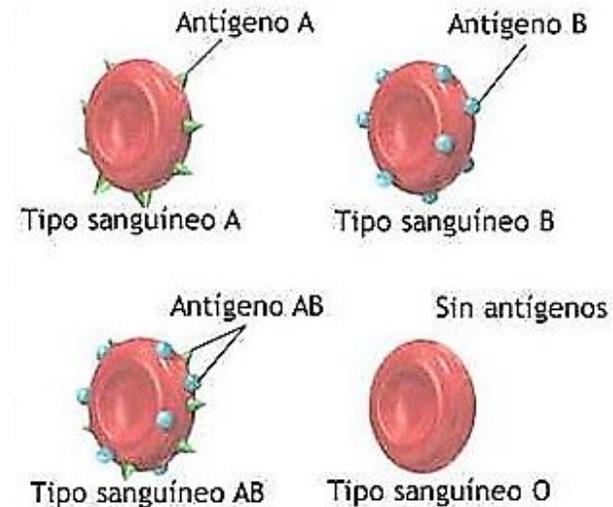


Imagen 39.- Superficie de los Grupos Sanguíneos. Tomado de goo.gl/qMBR1w.

Técnica:

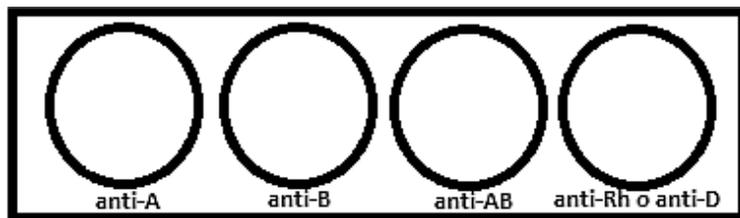
- Para esta determinación se utilizarán 4 reactivos o sueros hemotipificadores (anti-A, anti-B, anti-AB y anti-D), **Nota:** anti-D, es el anti-suero que identificará a la proteína del Factor Rh.

4.1.4.2 Toma de muestra mediante punción capilar.

- Limpie con una torunda humedecida con alcohol la yema de los dedos anular o medio del paciente, y permitir que seque el exceso de alcohol sin soplar con la boca.
- Puncione con una lanceta estéril la parte lateral de la yema de cualquiera de los dos dedos para obtener la sangre.
- Coloque 4 gotas de sangre en una placa de vidrio como la que se muestra en la *Imagen 33.- Placa de vidrio para inmunología, 5x6 pocillos*. Para realizar la hemotipificación.
- En seguida, añadir una gota de cada uno de los sueros hemotipificadores indicado en cada caso, que suero se añadió.



- Rotular con un plumón de tinta indeleble que suero se trabajará (anti-A, anti-B, anti-AB y anti-D)
- Dejar reposar por un momento, mover la placa para inmunología ocasionalmente en círculos, para mezclar correctamente los sueros hemotipificadores con la muestra y observar si se presentó aglutinación.
- Interpretación De la determinación del grupo sanguíneo (SABO) y el factor Rh; en un resultado positivo la aglutinación constituye un resultado positivo, indica la presencia apropiada de los antígenos A y/o B en los hematíes y la ausencia de aglutinación de hematíes, constituye un resultado negativo, esto indica la ausencia de los antígenos apropiados A y B en los hematíes, por lo tanto se interpretará como un grupo sanguíneo O del sistema SABO, también conocido como 0 (cero).
- Para el caso del Factor Rh o D, la aglutinación constituye un resultado positivo lo que indica la presencia apropiada del factor Rh, proteína integral de la membrana eritrocitaria. Mientras que la ausencia de aglutinación indica la ausencia del factor Rh, proteína integral de la membrana eritrocitaria.
- Dibujar en el siguiente esquema los resultados que obtuvo en la prueba de aglutinación.



- Colocar el resultado obtenido en la *Tabla 24.- Tabla de resultados experimentales de la determinación de Grupo Sanguíneo y Factor Rh* en la sección de Resultados.

- Interpretar el resultado de acuerdo a la siguiente imagen:

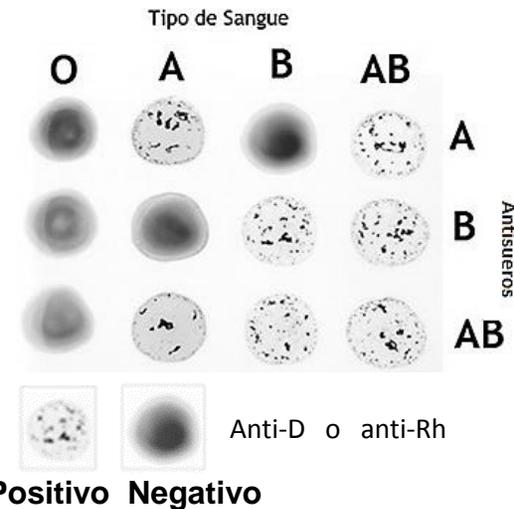


Imagen 40.- Interpretación de la hemaglutinación. Tomado de goo.gl/cdeKfX

Significado Clínico:

Actualmente están reconocidos cuatro fenotipos: O, A, B, y AB. También se han identificado subgrupos de A y B; Tales como A₁ y A₂.

**4.1.5 Determinación de Proteína C Reactiva (PCR).
4.1.5.1 Introducción a la determinación de la PCR.**

La determinación de Proteína C Reactiva (PCR), es una prueba que se realiza a pacientes para comprobar la presencia de inflamación que no se detecta fácilmente. Esta es una proteína de fase aguda, generada en el hígado y eleva su concentración al presentarse la inflamación que involucra a su vez a otras proteínas conocidas como citocinas, que son producidas por los Glóbulos Blancos.

Los valores normales de la PCR en pacientes sanos son inferiores a 8mg/ L. La razón principal por la que se realiza esta determinación es para conocer si los pacientes cursan por enfermedades inflamatorias como el Lupus, Artritis Reumatoide, fiebre reumática, infección, entre otras; o si los antiinflamatorios prescritos por



el médico están funcionando de manera adecuada.

Fundamento:

La determinación de Proteína C Reactiva (PCR) es una técnica de aglutinación en tarjeta de fondo negro, para la detección cualitativa y semicuantitativa de PCR en suero humano. Las partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-PCR humana son aglutinadas por moléculas de PCR presentes en la muestra del paciente (SPINREACT).

Técnica:

- Dejar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente ya que la sensibilidad del ensayo disminuye a temperaturas bajas.

- Depositar 50 µL de la muestra a ensayar y una gota de cada uno de los controles positivo y negativo sobre círculos distintos de una tarjeta de fondo negro como la que se muestra en la *Imagen 36.- Tarjeta de fondo negro* o una placa inmunológica.

Nota: Una concentración muy elevada de PCR en la muestra del paciente puede dar lugar a un resultado falsamente negativo debido al efecto *prozona*. Se recomienda reensayar la muestra utilizando un volumen de 20 µL.

- Mezclar el reactivo de PCR- látex vigorosamente o con el agitador vortex antes de usar y depositar 50 µL (el gotero del frasco está diseñado para dispensar este volumen).

- Mezclar con un palillo de madera limpio, procurando extender la mezcla por toda la superficie interior del círculo. Emplear palillos distintos para cada muestra o determinación. Como se muestra en la *Imagen 37.- Forma de mezclar con palillos de madera los reactivos sobre tarjeta de fondo negro*.

- Situar la placa de vidrio para inmunología sobre un agitador rotatorio a 80 – 100 r.p.m. o agitar durante 2 minutos manualmente, realizando movimientos circulares. El exceso de tiempo puede originar la aparición

de falsos positivos.

- Interpretar los Resultados de acuerdo a la *Imagen 38.- Controles negativo y positivo, de una aglutinación látex en tarjeta de fondo negro*.

- Examinando macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación, inmediatamente después de retirar la palca del agitador.

Nota: La presencia de aglutinación indica una concentración de PCR igual o superior a 6 mg/L

- Registrar los resultados obtenidos en la *Tabla 25.- Tabla de resultados experimentales de pruebas Inmunológicas Básicas* en la sección de resultados.

Valores de Referencia:

Hasta 6 mg/L. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia (SPINREACT).

Significado Clínico:

La proteína C reactiva es una proteína de fase aguda, presente en el suero de pacientes sanos, la cual puede incrementarse significativamente en la mayoría de procesos infecciosos bacterianos y virales, tejidos dañados, inflamación y neoplasias malignas. El incremento de concentración de esta proteína se produce después de unas horas de desarrollarse la inflamación, pudiendo alcanzar niveles de 300 mg/L en 12-24 horas (SPINREACT).

4.1.6 Determinación de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) o Prueba Inmunológica de Embarazo.

4.1.6.1 Introducción a la Prueba de Embarazo.

La Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) es una hormona de origen glicoproteico, producida durante el embarazo por el embrión, su principal función es evitar la desintegración del cuerpo lúteo en el ovario, manteniendo la producción de otra hormona conocida como progesterona, indispensable durante el desarrollo embrionario de los mamíferos.



La pronta aparición de hCG después de la concepción y su subsecuente elevación en concentración al inicio de una gestación, la convierten en un excelente indicador para la detección temprana de embarazo; En hombres no se presentan niveles detectables por esta prueba, excepto en casos como cáncer de próstata.

Fundamento:

Es un inmunoensayo cromatográfico con partículas de oro coloidal cualitativo, que detecta rápidamente la hormona Gonadotropina Coriónica Humana fracción β -hCG, presente en suero y orina. Agente de diagnóstico para uso *In vitro* de embarazo. (Gravidanza II)

Técnica:

- Poner a temperatura ambiente, entre 15 y 30°C, previo análisis y antes de abrir la prueba de embarazo, muestras y controles.
- Sacar la tira reactiva de su empaque individual e identificar con el nombre del paciente.
- Tomar la tira reactiva por el extremo de color y sumergirla en el suero o la orina por 3 segundos, con las flechas apuntando hacia el fondo del recipiente hasta la línea de MARK o MAX como se indica en la *Imagen 41.- Forma de realizar el análisis cualitativo de determinación de hCG.*
- Retirar la tira reactiva de la muestra y colocarla horizontalmente sobre una superficie limpia, plana y no absorbente.
- Dependiendo de la concentración de hCG, se observarán bandas de color después de 40 segundos en la zona de reacción, ubicada en la parte media de la tira.
- Para confirmar resultados negativos, espere de 5 a 10 minutos, las bandas de color. Es importante que el fondo de la tira esté claro antes de interpretar un resultado.
- La interpretación de los resultados se realizará de la siguiente manera:

Positivo: Bandas en la zona de control, y prueba. La presencia de las

bandas de color, indica el embarazo. La intensidad del color de las bandas dependerá de la concentración de hCG.

Negativo: Banda de color en la zona de control y ausencia de la banda en la zona de prueba. Esto indica que no se ha detectado embarazo.

- Colocar los resultados en la *tabla 26.- Resultados para la determinación de la prueba inmunológica de embarazo.* En la sección de Resultados.

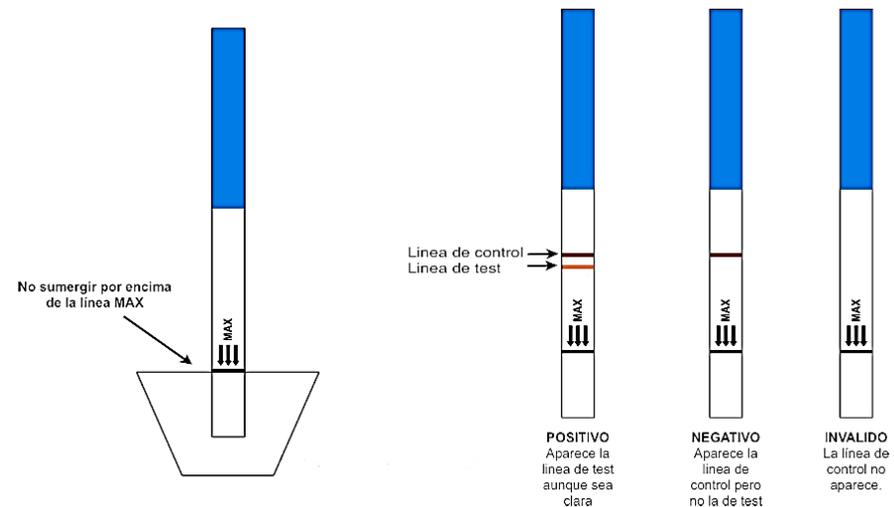


Imagen 41.- Forma de realizar el análisis cualitativo de determinación de hCG. Tomado de goo.gl/X7BBK5

Valores de Referencia:

Hombres y en mujeres sanas no embarazadas, no poseen niveles detectables de la hormona hCG por la prueba.

Significado Clínico:

En embarazos normales la Gonadotropina Coriónica Humana puede detectarse en suero y en orina, 7 días después de la concepción duplicando su concentración cada 2 días. Para el momento en el que falta el primer periodo menstrual, la concentración de hCG es aproximadamente 100 mUI/mL. Observándose niveles pico de 200,000 mUI/mL o más para el final del primer trimestre del embarazo. Es



posible encontrarla en circulación ya que como cualquier hormona se encuentra de forma libre en sangre. Su cuantificación en orina es posible debido a que la eliminación de dicha hormona se efectúa vía renal.

Por otra parte también es posible encontrar niveles considerables de dicha glicoproteína en hombres, esto se debe a que también es producida por ciertos tipos de tumores, principalmente tumores carcinogénicos de próstata, conociéndose en este caso como marcador tumoral.

4.1.7 Prueba serológica para la Sífilis (VDRL)

4.1.7.1 Introducción a la determinación de VDRL.

La prueba serológica para la Sífilis, VDRL, por su siglas en inglés, Venereal Disease Research Laboratory; y como su nombre lo indica, va encaminada a la búsqueda de anticuerpos generados contra el *Treponema pallidum*, dicha determinación es más específica ya que utiliza una suspensión de antígeno altamente purificado y el agregado de cloruro de colina. Es de suma importancia la detección y el tratamiento de la enfermedad en sus estadios tempranos, ya que resulta fundamental a fin de evitar complicaciones severas como sífilis cardiovascular, neurosífilis o sífilis congénita (SPINREACT)

Fundamento:

La prueba de VDRL es una técnica no treponémica de aglutinación en placa para la detección cualitativa y semicuantitativa de reagentes plasmáticos. La suspensión antigénica, una mezcla de lípidos complejos, es aglutinada en presencia de reagentes presentes en la muestra del paciente afectado por sífilis.

Técnica:

-Temperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente ya que la sensibilidad del ensayo disminuye a temperaturas bajas.

- Depositar 50 µL del suero del paciente y una gota de cada uno de los controles positivo y negativo, sobre círculos distintos de una placa de vidrio para inmunología como la que se muestra en la *Imagen 33.- Placa de vidrio para Inmunología, 5x6 pocillos.*

- Homogeneizar suavemente la suspensión de antígeno VDRL antes de usar y dispensar 20 µL sobre cada una de las gotas anteriores (el gotero está diseñado para dispensar este volumen).

- Mezclar las gotas con un aplicador plástico (incluido en el kit de la determinación), procurando extender la mezcla por toda la superficie interior del círculo. Emplear aplicadores distintos para cada muestra o determinación, como se muestra en la *Imagen 37.- Forma de mezclar con palillos de madera los reactivos sobre tarjeta de fondo negro.*

- Situar la placa de vidrio sobre un agitador rotatorio a 160 - 180 r.p.m. durante 4 minutos o agitar manualmente durante 5 minutos, moviendo en círculos. El exceso de tiempo de agitación puede originar la aparición de falsos positivos.

- Interpretar los Resultados de la floculación de acuerdo a la siguiente imagen:

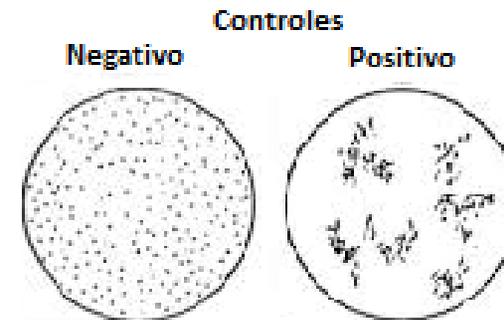


Imagen 42.- Controles negativo, y positivo que muestra la presencia de floculos, similar a una aglutinación menos evidente.

- Examinando microscópicamente la presencia o ausencia de floculos, inmediatamente después de retirar la palca del agitador. La presencia o ausencia de aglutinación es visible inmediatamente después de la agitación.

- Registrar los resultados obtenidos en la *Tabla 25.- Resultados experimentales de pruebas Inmunológicas Básicas.*



Valores de Referencia:

En individuos sanos no es normal la presencia de anticuerpos dirigidos a combatir la infección por Sífilis.

Significado Clínico:

Las reaginas son un grupo de anticuerpos dirigidos contra componentes del propio organismo, en pacientes que sufren infección por *Treponema pallidum*, agente causal de la sífilis. Este microorganismo produce lesiones en el hígado y corazón, liberando al torrente circulatorio pequeños fragmentos de estos órganos no reconocidos por el propio individuo. El sistema inmunológico del paciente reacciona dando lugar a la formación de reaginas, anticuerpos frente a estos fragmentos. El ensayo es útil para seguir la respuesta a la terapia antibiótica.

4.1.8 Determinación de Reagina Plasmática Rápida (RPR).

4.1.8.1 Introducción a la prueba de detección de Sífilis.

La determinación de Reagina Plasmática Rápida es una prueba que detecta la presencia de anticuerpos generados contra el agente causal de la Sífilis. En dicha prueba se buscan anticuerpos conocidos como Reaginas en la sangre de pacientes que tuvieron contacto con el patógeno, *Treponema pallidum*, causante de la enfermedad. Está indicada para pacientes que tengan síntomas de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) y de manera habitual para examinar a mujeres embarazadas en búsqueda de la enfermedad.

Fundamento:

RPR-carbón es una técnica no treponémica de aglutinación en tarjeta de fondo blanco para la detección cualitativa de reaginas plasmáticas en suero humano. Las partículas de carbón sensibilizadas con una mezcla de lípidos, son aglutinadas en presencia de reaginas presentes en la muestra del paciente afectado por sífilis.

Técnica:

- Dejar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente ya que la sensibilidad del ensayo disminuye a temperaturas bajas.
- Depositar 50 µL del suero del paciente y una gota de cada uno de los controles positivo y negativo, sobre círculos distintos de una tarjeta de

fondo blanco como la que se muestra en la siguiente imagen:

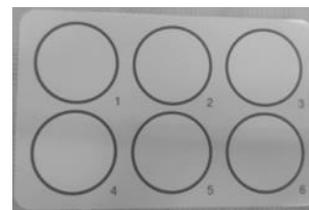


Imagen 43.- Tarjeta de fondo blanco. Tomado de goo.gl/SsfR5E.

- Homogeneizar suavemente el reactivo de RPR-carbón antes de usar. Invertir el vial dispensador y presionar ligeramente para eliminar las burbujas de aire.
- Dispensar 20 µL sobre cada una de las gotas anteriores (el gotero está diseñado para dispensar este volumen).
- Mezclar las gotas con un aplicador plástico (que se encuentra incluido en el kit de la determinación), procurando extender la mezcla por toda la superficie interior del círculo de la tarjeta de fondo blanco. Emplear palillos distintos para cada muestra.
- Situar la tarjeta sobre un agitador rotatorio a 80 – 100 r.p.m. durante 8 minutos o bien agitar manualmente durante el mismo tiempo. El exceso de tiempo puede originar la aparición de falsos positivos.
- Interpretar los Resultados de acuerdo a la *Imagen 42.- Controles negativo, y positivo que muestra la presencia de floculos, similar a una aglutinación menos evidente.*
- . En cuanto al color del fondo de la tarjeta, es útil solo para apreciar de mejor manera la formación de floculos.
- Examinando macroscópicamente la presencia o ausencia de floculos, inmediatamente después de retirar la placa del agitador. La presencia o ausencia de aglutinación es visible inmediatamente después de la floculación.
- Registrar los resultados obtenidos en la *Tabla 25.- Tabla de*



resultados experimentales de pruebas Inmunológicas Básicas.

Significado Clínico

Las reagentes son un grupo de anticuerpos dirigidos contra componentes del propio organismo, originadas en pacientes que sufren infección por *Treponema pallidum*, agente causal de la sífilis. Este microorganismo produce lesiones en el hígado y corazón, liberando al torrente circulatorio pequeños fragmentos de estos órganos no reconocidos por el propio individuo. El sistema inmunológico del paciente reacciona dando lugar a la formación de reagentes, anticuerpos frente a estos fragmentos. El ensayo es útil para seguir la respuesta a la terapia antibiótica.

Resultados.

Tabla 22.- Datos del Paciente.

Nombre:		Edad:	Sexo:
Horas de ayuno:	Dx presuntivo:	Fecha de evaluación:	

Tabla 23.- Tabla de resultados experimentales para la determinación de Reacciones Febriles.

	Reporte Aglutinó (+) No aglutinó (-)	Título	Analista
Tífico O			
Tífico H			
Paratífico B			
Paratífico A			
Proteus OX 19			
<i>Brucella abortus</i>			

Tabla 24.- Tabla de resultados experimentales de la determinación de Grupo Sanguíneo (SABO) y Factor Rh.

Aglutinó Positivo		(+)	No aglutinó Negativo		(-)	Factor Rh	Grupo Sanguíneo
anti-A	anti-B	anti-AB	anti-D				

Tabla 25.- Tabla de resultados experimentales de pruebas Inmunológicas Básicas.

Determinación	Resultados	Valor de Referencia	Analista
Antiestreptolisinas O			
Factor Reumatoide			
Proteína C Reactiva			
RPR			
VDRL			

Tabla 26.- Resultados para la Determinación de la prueba inmunológica de embarazo.

	Resultado (Positivo o Negativo)	Analista
Prueba de Embarazo		

Referencias

- Instructivo: Determinación cualitativa de ASLO SPINREACT.
- Instructivo: Determinación cualitativa de Factor Reumatoide SPINREACT.
- Instructivo: Determinación cualitativa de PCR SPINREACT.
- Instructivo: Determinación cualitativa de Grupos Sanguíneos SPINREACT.
- Instructivo: Determinación cualitativa de RPR y VDRL SPINREACT.
- Instructivo: Prueba Inmunológica de embarazo GRAVIDANZA.
- Martínez, A. y Ortega, J., (2011) Manual de Laboratorio de Inmunología Básica y Clínica [en línea]. Recuperado el 06 de febrero de 2018.
- Iáñez, E., (2003) Curso de Inmunología General 1. Introducción al Sistema Inmune, Departamento de Microbiología, universidad de Granada, España. [En línea] Recuperado el 26 de mayo de 2018. De goo.gl/JBYPBL.



MÓDULO 5. BIOQUÍMICA CLÍNICA.

Práctica 5.1 Química Sanguínea de 5 Elementos en suero.

Objetivo.

Qué el alumno conozca y aplique pruebas de bioquímica clínica fundamentadas en los principios del metabolismo de los carbohidratos, proteínas (aminoácidos) y lípidos como son la determinación de: Glucosa, Urea, Creatinina, Ácido úrico y Colesterol en cada caso, como un recurso de apoyo diagnóstico para el médico.

Introducción.

La Química Clínica se ocupa del estudio de los aspectos bioquímicos de los seres vivos, con la aplicación de los métodos de laboratorio para el diagnóstico, el seguimiento, el control de tratamiento, la prevención y la investigación de una enfermedad.

A través del tiempo la cantidad de compuestos constituyentes de la sangre, que podían determinarse cualitativa y cuantitativamente se fueron sumando, surgiendo la química sanguínea que comienza con la determinación de 4 analitos: Glucosa, urea, creatinina y ácido úrico, habiendo en la actualidad diversos perfiles hasta con 30 analitos, incluyendo proteínas, enzimas, lípidos y electrolitos.

El diagnóstico de los trastornos del metabolismo de los carbohidratos se apoya en la medición de la glucosa. Esta medición puede ser en ayunas o mediante la estimulación de glucosa suministrada al paciente, para realizar un estudio conocido como Glucosa Postprandial; esta determinación es útil en el diagnóstico y manejo de la Diabetes Mellitus, intolerancia a los carbohidratos, hipoglucemia, enfermedades de tipo renal y hormonal, entre otras. (Amezcuca, H. y Galván, M., 2015).

La urea, la creatinina y el ácido úrico CNRP (Compuestos Nitrogenados No Proteicos) son productos catabólicos del metabolismo de las proteínas, estos metabolitos plasmáticos, son útiles para evaluar la funcionalidad de órganos vitales como el hígado y los riñones.

La urea es formada en el hígado a partir del amoníaco (NH_3) que proviene a su vez del nitrógeno de los aminoácidos, de las proteínas que consumimos en la dieta diaria. Se excreta a través de la orina, por lo que es utilizado como indicador de las funciones renales y hepáticas. La urea, conforma el 80% del nitrógeno urinario.

La creatinina es el producto final del metabolismo de la creatina fosfato, que ocurre en el tejido muscular principalmente. Se excreta en la orina a través de filtración renal, por lo que su cuantificación en sangre u orina es muy útil para valorar la función de los riñones, ya que es un metabolito que se excreta casi al 100 % de su producción es ideal para este tipo de evaluación. Existen estudios de laboratorio como la Depuración de creatinina en orina en 24 horas que correlaciona la concentración plasmática con la concentración urinaria, así como el tiempo y el volumen de orina, dando como resultado la filtración de Creatinina por día, y evaluar el estado patológico del riñón.

Por otra parte, el ácido úrico es producto de la degradación de las purinas, ácidos nucleicos y nucleoproteínas, los niveles anormales en sangre pueden ser indicativos de alteraciones en el metabolismo de estas sustancias, útil para el diagnóstico del síndrome gotoso y disfunciones renales (Galván, M. y Amezcuca, H., 2015).

En cuanto a la determinación de Colesterol, que es un esteroide sintetizado endógenamente con funciones estructurales, precursor de hormonas y lipoproteínas de alta (HDL) y baja densidad (LDL) en mamíferos, posee gran interés diagnóstico, ya que es un indicador importante en la evaluación del riesgo cardiovascular, así como indicativo en el seguimiento y control de enfermedades crónicas como la Diabetes, Hipertensión arterial, Síndrome metabólico y se ve alterado en otras enfermedades como el hígado graso o las enfermedades coronarias.

Equipos reactivos y materiales.

Muestras biológicas.

- 6 mL de sangre completa sin anticoagulante.

Material por grupo.

- 1 Gradilla de unicel.
- 25 Tubos de ensayo de 15x100 mm.
- Servitoallas y Pañuelos desechables (*Kleenex*®).
- 1 Propipeta.
- 1 Micropipeta de 10 a 100 μL .
- 1 Micropipeta de 100 a 1000 μL .
- 1 Adaptador para extracción de sangre por sistema al vacío.
- 25 agujas de punta doble de calibre 20 para sistema al vacío.
- Ligaduras.
- Torundas.
- 25 Tubos con vacío sin aditivos (Tapón rojo o amarillo).



- 25 Pipeta Pasteur (Punta larga) con Bulbo.
- 1 Contenedor para punzocortantes Rígido.
- 1 Piseta con agua destilada.
- 1 Recipiente con solución de hipoclorito de sodio al 5 %.
- Parafilm (Recortado en cuadros de 1 cm²)
- 1 Centrifuga.

Reactivos

- 1 Piseta con Agua Destilada.
- 1 Kit para determinación de Glucosa
- 1 Kit para Determinación de Urea
- 1 Kit para Determinación de Creatinina
- 1 Kit para Determinación de Ácido Úrico
- 1 Kit para Determinación de Colesterol

Procedimiento experimental.

Indicaciones para el paciente:

- Es importante presentarse con un ayuno de 8 horas para este análisis, evitar la realización de actividades deportivas, fumar y no consumir bebidas alcohólicas previo a la toma de la muestra sanguínea.

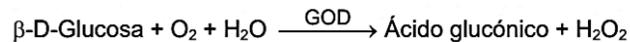
Obtención de la muestra sanguínea.

- Armar sistema de extracción por método al vacío, utilizando aguja calibre 21x33 mm (color verde).
- Rotular con marcador indeleble negro los tubos con vacío, tapón color rojo o amarillo, que se van a utilizar para la recolección de la muestra.
- Realizar la venopunción como lo indica el procedimiento experimental, *punción mediante sistema al vacío*, de la **Práctica 3.1 “Obtención de muestras sanguíneas mediante jeringa y sistema al vacío”**.
- Permitir la coagulación de la muestra esperando por lo menos 5 minutos después de la extracción.
- Centrifugar a 2500 rpm/5 minutos, para la obtención de suero sanguíneo.
- Rotular un tubo con nombre del paciente y separar el suero con ayuda de una pipeta Pasteur sin generar espuma.

5.1.1 Determinación de Glucosa.

Fundamento:

La glucosa oxidasa una enzima (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, 4-amino fenazona, en presencia de peroxidasa otra enzima (POD).



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada. (SPINREACT).

Técnica:

- Encender el espectrofotómetro y seleccionar la longitud de onda en **505 nm.**
- Rotular un tubo de ensaye como muestra.
- El profesor responsable de la sesión indicará a las personas que prepararán los tubos Blanco y Patrón.
- Preparar los tubos de acuerdo a las siguientes indicaciones:

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
	Blanco	Patrón	Muestra
Reactivo (mL)	2.0	2.0	2.0
Patrón (uL)		20	
Muestra (uL)			20

- Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o 10 min a temperatura ambiente 15-25 °C.
- Leer la absorbancia del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable 30 minutos.
- Registrar las absorbancias en la *Tabla 16.- Lecturas de Absorbancias para la determinación de la Bioquímica Clínica*. En la sección de Resultados.

Cálculos:

Sustituir los valores obtenidos en la siguiente fórmula para obtener la concentración de Glucosa sérica de la Muestra.

$$[\text{Glucosa}] = \frac{\text{Abs. Mtra}}{\text{Abs. del Pt}} \times \text{Conc. Pt} = \text{Concentración de glucosa sérica.}$$

Donde:

Abs. Mtra = Absorbancia de la muestra.

Abs del Pt = Absorbancia de Patrón.

Conc. Pt = Concentración del patrón.



Valores de referencia:

Suero o plasma:

60 – 110 mg/dL equivalente a **3,33 – 6.10 mmol/L**

Significado clínico:

La glucosa es la mayor fuente de energía para las células del organismo; la insulina facilita la entrada de glucosa en las células. La diabetes mellitus es una enfermedad que cursa con una hiperglucemia (niveles altos de glucosa en sangre), causada por un déficit de insulina. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio (SPINREACT).

5.1.2 Determinación de Urea.

Fundamento.

La Urea presente en la muestra reacciona con el o-ftalaldehído en medio ácido originando un complejo colorido que puede cuantificarse fotocolorimétricamente, en una reacción conocida como de punto final:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de urea en la muestra ensayada (SPINREACT).

Técnica:

- Encender el espectrofotómetro y seleccionar la longitud de onda a **510 nm**.
- Rotular un tubo de ensaye como muestra.
- El profesor responsable de la sesión indicará a las personas que prepararán los tubos Blanco y Patrón.
- Calibrar el espectrofotómetro de a Cero de absorbancia con agua destilada.
- Preparar los tubos de acuerdo a las siguientes indicaciones.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
	Blanco	Patrón	Muestra
Reactivo 1 (mL)	1.0	1.0	1.0
Reactivo 2 (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (uL)		10	
Muestra (uL)			10

-Mezclar, incubar a 37°C 15 minutos y leer las absorbancias de Blanco Patrón y Muestra.

- Registrar las absorbancias en la sección de Resultados.

Cálculos:

Sustituir los valores obtenidos en la siguiente fórmula para obtener la concentración de Urea en la Muestra.

$$[\text{Urea}] = \frac{\text{Abs Mtra}}{\text{Abs Pt.}} \times \text{Conc. Pt} = \text{Concentración de Urea sérica.}$$

Donde:

Abs. Mtra = Absorbancia de la muestra.

Abs del Pt = Absorbancia de Patrón.

Conc. Pt = Concentración del patrón.

Valores de referencia:

Suero o plasma: **15-45 mg/dL** o **2.49-7.49 mmol/L**.

Significado Clínico:

La urea es el resultado final del metabolismo de las proteínas; se forma en el hígado a partir de su destrucción. Puede aparecer la urea elevada en sangre (uremia) en dietas con exceso de proteínas, enfermedades renales, insuficiencia cardiaca, hemorragias gástricas, hipovolemia y obstrucciones renales. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio (SPINREACT)

5.1.3 Determinación de Creatinina.

Fundamento:

El ensayo de la creatinina está basado en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino, descrito por Jaffé. La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo colorido. El intervalo de tiempo escogido para las lecturas permite eliminar gran parte de las interferencias conocidas del método, pero también es posible cuantificar al final de la reacción, en un ensayo conocido como reacción de punto final. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra ensayada.





Técnica:

- Encender el espectrofotómetro y seleccionar la longitud de onda a **510nm**.
- Rotular un tubo de ensaye como muestra.
- El profesor responsable de la sesión indicará a las personas que prepararán los tubos Blanco y Patrón.
- Calibrar el espectrofotómetro de a Cero de absorbancia con el Blanco y leer las Absorbancias de los tubos Patrón y Muestra.
- Preparar 3 tubos de acuerdo a las siguientes indicaciones.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
	Blanco	Patrón	Muestra
Reactivo 1 (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (uL)		100	
Muestra (uL)			100

- Mezclar, incubar a temperatura ambiente por 10 minutos y leer las absorbancias de Blanco Patrón y Muestra.
- Registrar las absorbancias en la sección de Resultados.

Cálculos:

Sustituir los valores obtenidos en la siguiente fórmula para obtener la concentración, Creatinina sérica de la Muestra.

$$[Creatinina] = \frac{ABS \text{ Mtra}}{ABS \text{ Pt}} \times \text{Conc. Pt} = \text{Concentración de Creatinina sérica.}$$

Donde:

Abs. Mtra = Absorbancia de la muestra.

Abs del Pt = Absorbancia de Patrón.

Conc. Pt = Concentración del patrón.

Valores de referencia:

Suero o plasma:

Hombres 0,7 - 1,4 mg/dL. Mujeres 0,6 - 1,1 mg/dL.

Significado Clínico:

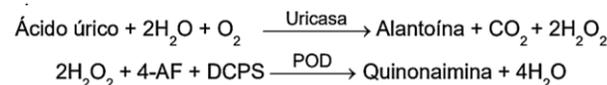
La creatinina es el resultado de la degradación de la creatina, componente de los músculos y puede ser transformada en ATP, fuente

de energía para las células. La producción de creatinina depende de la modificación de la masa muscular. Varía poco y los niveles suelen ser muy estables en sangre. Se elimina a través del riñón. En una insuficiencia renal progresiva hay un aumento en sangre de urea, creatinina y ácido úrico. Niveles altos de creatinina son indicativos de patología renal. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos en el paciente y de laboratorio.

5.1.4 Determinación de Ácido Úrico.

Fundamento:

El ácido úrico es oxidado por la uricasa a alantoína y peróxido de hidrógeno (2H₂O₂) que en presencia de peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF) y 2-4 Diclorofenol Sulfonato (DCPS) forma un compuesto rosáceo. La intensidad de quinonaimina roja formada es proporcional a la concentración de ácido úrico presente en la muestra ensayada



Técnica:

- Encender el espectrofotómetro y seleccionar la longitud de onda a **520nm**
- Rotular un tubo de ensaye como muestra.
- El profesor responsable de la sesión indicará a las personas que prepararán los tubos Blanco y Patrón.
- Calibrar el espectrofotómetro de a Cero de absorbancia con el Blanco y leer las Absorbancias de los tubos Patrón y Muestra.
- Preparar los tubos de acuerdo a las siguientes indicaciones:

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
	Blanco	Patrón	Muestra
Reactivo (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (uL)		10	
Muestra (uL)			10

- Mezclar los tubos adecuadamente e incubarlos 5 minutos a 37°C o 10 minutos a temperatura ambiente 15-25°C



- Registrar las absorbancias en la sección de Resultados.

Cálculos:

Sustituir los valores obtenidos en la siguiente fórmula para obtener la concentración de Ácido. Úrico sérico de la Muestra.

$$[\text{Ácido úrico}] = \frac{\text{Abs. Mtra}}{\text{Abs. del Pt}} \times \text{Conc. Pt} = \text{Concentración de Ácido úrico.}$$

Abs. Mtra = Absorbancia de la muestra.

Abs del Pt = Absorbancia de Patrón.

Conc. Pt = Concentración del patrón.

Valores de referencia:

Suero o plasma:

Mujeres 2,5 - 6,8 mg/dL y hombres 3,6 - 7,7 mg/dL.

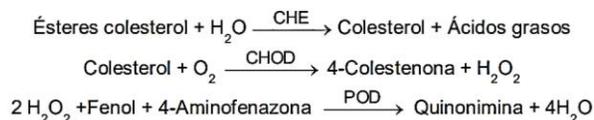
Significado Clínico:

El ácido úrico y sus sales son el producto final del metabolismo de las purinas. En una insuficiencia renal progresiva hay una retención en sangre de urea, creatinina y ácido úrico. Niveles altos de ácido úrico son indicativos de patología renal y generalmente se asocia con síndrome gotoso o comúnmente llamado gota. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

5.1.5 Determinación de Colesterol.

Fundamento:

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.

Técnica:

- Encender el espectrofotómetro y seleccionar la longitud de onda en **505 nm.**

- Rotular un tubo de ensaye como muestra.

- El profesor responsable de la sesión indicará a las personas que prepararán los tubos Blanco y Patrón.

- Preparar los tubos de acuerdo a las siguientes indicaciones:

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
	Blanco	Patrón	Muestra
Reactivo (mL)	2.0	2.0	2.0
Patrón (uL)		20	
Muestra (uL)			20

- Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C ó 10 min a temperatura de 15-25°C.

- Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable 30 minutos.

- Registrar las absorbancias en la sección de Resultados.

Cálculos:

Sustituir los valores obtenidos en la siguiente fórmula para obtener la concentración de Colesterol en la muestra.

$$[\text{Colesterol}] = \frac{\text{Abs. Mtra}}{\text{Abs. del Pt}} \times \text{Conc. Pt} = \text{Concentración de Colesterol.}$$

Dónde:

Abs. Mtra = Absorbancia de la muestra.

Abs del Pt = Absorbancia de Patrón.

Conc. Pt = Concentración del patrón.

Significado Clínico:

El colesterol es una sustancia grasa presente en todas las células del organismo. El hígado produce naturalmente todo el colesterol que necesita para formar las membranas celulares y producir ciertas hormonas. La determinación del colesterol es una de las herramientas más importantes para el diagnóstico y clasificación de las lipemias. El aumento del nivel de colesterol es uno de los principales factores de



riesgo cardiovascular. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio

Valores de referencia

Menos de 200 mg/dL
200-239 mg/dL
240 o más

Riesgo Cardiovascular.

Bajo
Moderado
Alto

Nota: Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia (SPINREACT)

Resultados.

Tabla 27.- Datos del Paciente

Nombre:		Edad:	Sexo:
Horas de ayuno:	Dx presuntivo:	Fecha de evaluación:	

Tabla 28.- Lecturas de Absorbancias para la determinación de la Bioquímica Clínica.

	Absorbancia			Conc. solución Patrón
	Blanco	Patrón	Muestra	
Glucosa				
Urea				
Creatinina				
Ác. Úrico				
Colesterol				

Tabla 29.- Tabla de Resultados Experimentales para la determinación de Química Sanguínea de 5 elementos.

Determinación	Resultado	Valores de Referencia	Analista
Glucosa			
Urea			
Creatinina			
Ácido Úrico			
Colesterol			

Referencias.

- Amezcua, H., y Galván, M., (2015) Manual de Prácticas de Laboratorio de Análisis Bioquímicos Clínicos Generales. PRÁCTICA 5 QUÍMICA SANGUÍNEA. UNAM- Departamento de Ciencias Biológicas.
- González, B. (2015) Manual de Prácticas de Laboratorio de Análisis Bioquímicos Clínicos Generales. PRÁCTICA 4 BIOQUÍMICA SANGUÍNEA. UNAM- Departamento de Ciencias Biológicas.
- Kaplan, A., Lawrence, A. y Pesce, J. (1996). Química Clínica Teoría, Análisis y Correlación. 3ª Ed. Ciudad de México. Traducción: Carreón, T. Ed. Javier Ortega Ceseña.
- SPINREACT.



MODULO 6. PARASITOLOGÍA.

Práctica 6.1 Examen Coproparasitoscópico, mediante la técnica de Faust.

Objetivo.

Que el alumno conozca los principios básicos de la Parasitología, tales como los ciclos biológicos de los parásitos, para que el resultado obtenido ayuda al médico al diagnóstico gastrointestinal de las parasitosis que comúnmente causan enfermedad en nuestro país; así como la aplicación de la forma correcta de recolección de muestras y técnicas usadas en el examen Coproparasitoscópico, lo que le permitirá tener una visión clara de cómo se identifica y detecta un parásito.

Introducción.

Las técnicas coproparasitoscópicas son metodologías empleadas en el laboratorio de parasitología. Su fundamento es la observación, directa del parásito en sus fases de huevecillos o quistes, en muestras de materia fecal (Fuentes, G. et al, s.f.).

La coprología es el examen de las heces, pudiéndose tratar de materia fecal humana o animal, este comprende la observación directa macroscópicamente de la muestra y la evaluación mediante un análisis microscópico. Dicho examen está indicado en pacientes con casos de diarreas crónicas no bacterianas, ni virales, que cursan por insuficiencia digestiva y que por lo general se trata de encontrar al agente etiológico de la enfermedad.

Las heces de pacientes normales, muestra de elección para el examen coproparasitoscópico, tienen un peso aproximado por evacuación o deposición de más o menos 200 gramos, de los cuales alrededor del 80% es agua y 20% sólidos, dentro de los cuales se hallan almidón, ácidos grasos, fibras musculares, fibra dietética (celulosa) en su mayoría, entre otros.

Las heces normales tienen una consistencia firme o moldeada; Es de color marrón, color que adquiere debido a pigmentos provenientes de la bilirrubina y que se conoce como coprobilínogeno, presenta escasos almidones, ácidos grasos y fibras musculares. No tiene presente grasa neutra ni presenta moco y por lo general no presenta células de descamación del intestino.

El examen coproparasitoscópico se define como el estudio parasitológico de las materias fecales para el diagnóstico de parásitos intestinales, en el que se utilizan un conjunto de técnicas macroscópicas y microscópicas que permiten demostrar la presencia de los estadios de las diversas estructuras evolutivas de parásitos intestinales como son quistes, ooquistes, huevos, trofozoitos, esporas, larvas y adultos.

Una evaluación normal consta casi exclusivamente de heces, pero en presencia de una infección del tracto digestivo, se pueden encontrar presentes moco, sangre y cantidades considerables de tejidos desprendidos. En estas porciones hay mayor probabilidad de encontrar datos de infección parasitaria debida a la presencia de parásitos o restos de los mismos que son observados a simple vista, de la misma forma pueden estar presentes formas parasitarias que no son observables a simple vista como los trofozoitos, quistes de protozoarios y algunos huevos de helmintos (Fuentes, G. et al, s.f.).

Para poner a este tipo de estructuras en evidencia es necesario un examen microscópico en el que se utilizan soluciones fisiológicas y colorantes; En el caso del Examen Directo en Fresco, se diluye una porción de la muestra con solución salina fisiológica, y se observa al microscopio, lo que evidencia a los parásitos, para observar estructuras se deben aplicar ciertos colorantes; lo que se conoce como Examen Directo en Fresco con colorantes; como lugol, azul de metileno, safranina modificada, hematoxilina, fucsina y Giemsa.

Otro tipo de examen microscópico incluye el conteo de huevos mediante la Técnica de Kato y Miura, la Técnica de Willis o de flotación, Técnica de Faust y la Técnica de Ritchie.

La muestra debe cumplir algunos requisitos antes de su fase de análisis en el laboratorio, para preservar la integridad de las estructuras parasitarias con valor diagnóstico:

Es esencial que el material remitido para un estudio o examen coproparasitoscópico sea suficiente, aproximadamente del tamaño de un limón preferentemente sólida (forme o moldeada). El examen macroscópico debe preceder siempre al estudio microscópico, de tal forma que se deben registrar desde su recepción en el Laboratorio además de los datos del paciente y fecha, las condiciones de la muestra, si ésta es formada, semiformada o líquida, la periodicidad de



las evacuaciones, ya que incluso estos datos orientan al diagnóstico médico (Fuentes, G. et al, s.f.).

Materiales, equipos y reactivos.

Muestra biológica.

5g de heces una porción del tamaño de un Limón.

Material por grupo.

Tubos de centrifuga.

1 Varilla de vidrio.

1 Coladera.

2 Recipientes de plástico o vidrio (250mL. Aproximadamente).

1 Cuchara.

2 Portaobjetos.

2 Cobreobjetos.

1 Asa Bacteriológica modificada.

1 Recipiente con Hipoclorito de Sodio al 6%

1 Microscopio Compuesto.

1 Propipeta.

1 Centrifuga

Reactivos.

1 Piseta con solución salina fisiológica (SSF) al 0.9%

1 Piseta con solución saturada de Sulfato de Zinc al 33% o con una Densidad de 1.18° Baume.

1 Vial con I2ugol.

1 Piseta con Agua Destilada.

Procedimiento experimental.

Indicaciones para el paciente:

- No se requiere una dieta previa. Deben ser heces del día.
- Es importante la adquisición de un frasco de boca ancha, de plástico nuevo, limpio, transparente e identificado correctamente con los datos del paciente.
- Destapar el frasco para obtener la muestra, teniendo cuidado de no tocar la parte interior de la tapa del recipiente.
- Para esto es necesario obtener una porción del tamaño de un limón, que son aproximadamente 5 gramos de materia fecal, teniendo precaución de no mezclar con orina.

- No es necesario obtener la primera evacuación de la mañana, puede ser colectada a cualquier hora del día.

6.1.1 Determinación de estructuras parasitarias.

Fundamento

Por medio de diferencia de densidades, se induce la flotación de estructuras parasitarias, huevecillos y quistes, según sea el caso.

Técnica

- Colocar aproximadamente 5 gramos de materia fecal en un recipiente de plástico o vidrio, o un tubo cónico como se muestra en la siguiente imagen, añadir agua hasta cubrir a la muestra y homogeneizar.



Imagen 44.- Disolución de la muestra de heces. Tomado de goo.gl/YEuRDL

- Posteriormente trasvasar la mezcla a un tubo de centrifuga.
- Centrifugar por un minuto a 2000 rpm.
- Decantar el sobrenadante en un recipiente con hipoclorito de sodio al 6 %, para su posterior desecho en el inodoro.
- Resuspender nuevamente con agua corriente.
- Centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones.
- Repetir el proceso hasta que el sobrenadante sea completamente translucido.



45.- Forma de decantar la muestra centrifugada. Tomado de goo.gl/xxJtV9

- Desechar el último sobrenadante translúcido y resuspender la pastilla con la solución de Sulfato de Zinc, centrifugar nuevamente a las condiciones antes mencionadas.
- Transcurrido el tiempo de centrifugación, llenar el tubo de centrifuga con la solución saturada de Sulfato de Zinc hasta formar un menisco convexo en la superficie del tubo cónico o el tubo que se haya utilizado. Como se muestra en la siguiente imagen.

Menisco convexo



Imagen 46.- Menisco convexo en un tubo de ensaye.

- Dejar reposar durante 10 minutos, cronometrando el tiempo con un portaobjetos sobre el menisco antes formado, lapso que permite la

flotación de las estructuras parasitarias ligeras, como huevos y quistes, de tal manera, que la totalidad de la muestra de la superficie del menisco entre en contacto con el cubreobjetos, como se muestra en la siguiente imagen.



Imagen 47.- Técnica de Faust, tubo de ensaye en reposo con cubreobjetos sobre el menisco formado. Tomado de goo.gl/YEuRDL

- O bien, después de 10 minutos, tomar una porción del menisco con el Asa Bacteriológica modificada, de tal manera que la totalidad de la muestra de la superficie del menisco se colecte y colocarla en un portaobjetos limpio y seco o nuevo.



Imagen 47.- Asa bacteriológica modificada a la izquierda y asa bacteriológica normal a la derecha.



- Agregar 1 gota de Lugol a un portaobjetos y después dejar caer el cubreobjetos con la muestra fresca, teniendo mucha precaución de no presionar demasiado, ya que la muestra podría derramarse por los costados. Como se muestra en la siguiente imagen:



Imagen 48- Cubreobjetos con muestra sobre un portaobjetos con una gota de Lugol parasitológico. Tomado de goo.gl/i2cBHh

- Finalmente observar al microscopio, enfocando en 10x y con el objetivo de 40x realizar la identificación de la estructura parasitaria observada, reportando en su caso Género y Especie. Siguiendo una trayectoria de zig-zag, como se muestra en la *Imagen 49*:

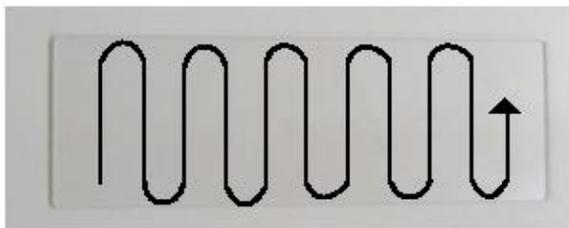


Imagen 49.- Secuencia de observación de laminillas.

Significado Clínico:

Sí se encuentran parásitos, se reporta como positivo, en caso contrario será negativo; Es importante mencionar el género y especie del microorganismo observado, por lo tanto se reporta como: **Positivo para: Nombre del parásit.** Por otro lado es recomendable tomar por lo menos tres muestras de distintos días o de distintas evacuaciones para aumentar la probabilidad de detección de parásitos.

Resultados

Tabla 30.- Datos del Paciente

Nombre:	Edad:	Sexo:
Fecha de evaluación:		

Tabla 31.- Observación al macroscópica del examen Coproparasitológico.

Determinación	Resultado	Analista
Color		
Aspecto		

Tabla 32.- Observación al microscopio del examen Coproparasitológico.

Objetivo	Estructura Observada	Analista
10x		
40x		

Realizar un dibujo de la estructura observada en el espacio indicado.



Tabla 33.- Tabla de Resultados del examen coproparasitoscópico.

Resultado del examen coproparasitoscópico.	Resultado	
	Positivo para: <i>Indicar Género y Especie</i>	Negativo

Marque con una x en caso de resultado Negativo.

Referencias

- Fuentes, G., Tapia, R., De la Rosa, J., Martínez, P. y Aguilar, J. (s.f.) Manual de Laboratorio de Parasitología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Sección de Ciencias de la Salud Humana.

MÓDULO 7. BACTERIOLOGÍA.

Practica 7.1 Preparación de Medios de Cultivo.

Objetivo.

El alumno aplicará los métodos y técnicas específicas para la preparación de medios de cultivo más comúnmente utilizados en el procesamiento de muestras bacteriológicas, relacionando la composición, basándose en los conceptos y principios básicos de Bacteriología, como recurso de apoyo diagnóstico para el médico.

Introducción.

El aislamiento y la identificación de los patógenos viables, es básico para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas y por esto se puede dar un tratamiento más efectivo para eliminar la infección por un microorganismo determinado.

Los primeros métodos disponibles para el aislamiento de microorganismos fueron llevados a cabo por Roberto Koch, donde los resultados obtenidos eran muy pobres, estos métodos consistían en la utilización de humor acuoso de buey y posteriormente la superficie de patatas para favorecer el crecimiento. Tiempo después Fraud Hesse, introdujo el agar, el cual era un producto japonés de utilidad doméstica. Existen en el mercado una extensa variedad de medios de cultivo, más o menos complejos, útiles para el laboratorio de Bacteriología.

Los microorganismos varían en sus requerimientos de desarrollo, estos necesitan fuentes de nitrógeno, carbono, sales, agua y oligoelementos como molibdeno, zinc, cobre, cloro, azufre o hierro, mientras que otros más exigentes tienen necesidad de factores de crecimiento como aminoácidos, vitaminas, purinas, hidrolizados de proteínas en forma de peptonas, que proveen componentes nitrogenados de forma accesible.

Un medio de cultivo es un sustrato o solución de nutrientes, en los que crecen y se multiplican los microorganismos, con el objetivo de aislar las diferentes especies bacterianas, previo a su identificación y llevar a cabo una serie de estudios complementarios. La mayoría de los medios de cultivo se preparan a partir de materiales deshidratados comerciales. El cuidado con que estos se preparan, esterilizan y distribuyen en tubos o cajas de Petri es extremadamente crítico; Por lo



que se recomienda extremo cuidado, para no contaminarlos con otro tipo de microorganismos.

Los sustratos energéticos son suministrados por sustancias nutritivas contenidas en la maceración de la carne y vísceras, los aminoácidos o péptidos son aportados por las peptonas que contienen todos los productos de degradación de las proteínas.

El desarrollo de un microorganismo en un medio de cultivo depende de diversos factores como: La disponibilidad de los elementos nutritivos necesarios, existencia del oxígeno requerido, grado de humedad apropiado, valores de pH adecuados (neutro o ligeramente alcalino 7.2-7.4), temperatura de incubación precisa (35-37°C para bacterias patógenas), condiciones de esterilidad del medio y protección de posibles contaminaciones.

Los medios de cultivo pueden dividirse según diferentes criterios como su composición, utilización y el estado físico (líquidos, que no contienen agar, semisólidos con cerca de 0.5% de agar y sólidos con aproximadamente 1.5% de agar). El *agar agar* es un agente de solidificación, extraído de algas del género *Gelidium* spp, introducido por Fanny y Walther Hesse en 1881, agente de elección sobre la gelatina que ya permanece firme hasta alrededor de los 65°C.

Los medios sólidos se pueden clasificar en:

Medios nutritivos: Medios en forma líquida o sólida que contienen los nutrimentos necesarios para la multiplicación de los microorganismos poco exigentes, de uso común en los laboratorios.

Medios Diferenciales: Aquellos que contienen componentes nutritivos y reactivos indicadores que permiten poner de manifiesto alguna actividad metabólica específica de los microorganismos que permite diferenciarlos de los demás.

Medios de Enriquecimiento: Aquellos que favorecen la multiplicación y el aumento o enriquecimiento celular.

Medios Enriquecidos: Permiten el desarrollo de microorganismos muy exigentes y como su nombre lo indica, son medios químicamente complejos o ricos en nutrimentos, los que se preparan a partir de caldo nutritivo enriquecido con sangre, suero o extractos de tejidos vegetales o animales

Medios Selectivos: Medios que contienen componentes que limitan el crecimiento de especies bacterianas específicas.

Medios Indicadores o pruebas bioquímicas (Sólidos o semisólidos): Revelan la actividad metabólica de las especies bacterianas.

Medios de transporte y medios de conservación: Permiten preservar satisfactoriamente la viabilidad en un cultivo por periodos de tiempo determinados de una cepa de microorganismos.



Imagen 50.- Diferentes tipos de medios de cultivo. Tomado de goo.gl/fHDN5v

Debido a su diversidad metabólica los microorganismos pueden usar diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos como macronutrimentos (Carbohidratos como la glucosa, lactosa, manosa etc; Proteínas como la gelatina). En tanto que los micronutrimentos o elementos traza se requieren en proporciones tan pequeñas como ppm (Partes por millón) o ppb (Partes por billón) cantidades que se encuentran en contaminantes, de los principales componentes medios satisfacen esa necesidad, por lo que únicamente son adicionados para el crecimiento de organismos muy exigentes. (Luna, J. 2012)

Como control de esterilidad de los medios de cultivo se emplea al menos un 5 % de los mismos de cada lote, que deberá incubarse a 35°C durante uno o dos días antes de que se dispongan para el empleo



del resto de los medios en el laboratorio de análisis clínicos. El material restante debe almacenarse en el refrigerado hasta comprobar la ausencia de desarrollo. Los medios incubados para la prueba antes mencionada, por su parte, no deben utilizarse para la siembra, porque habrían perdido una cantidad significativa de humedad durante el proceso de incubación. Algunos laboratorios prefieren comprobar la esterilidad después de siete días para detectar hongos y otros microorganismos de crecimiento lento (Luna, J., 2012).

Para el estudio de los microorganismos es indispensable contar entre otras cosas con material y medios de cultivo estériles. En Bacteriología la esterilización se define como “el proceso mediante el cual se eliminan todos los microorganismos (incluyendo formas de resistencia) de un objeto, medio o superficie” y su aplicación garantiza la ausencia de microorganismos en el material y medios de cultivo a ser empleados. Existen diversos métodos de esterilización, entre ellos: calor (seco o húmedo), filtración (para sustancias termolábiles y aire), radiaciones y aplicación de gas de óxido de etileno (para jeringas y cajas de plástico).

Materiales, equipos y reactivos.

- Mechero Bunsen.
- Encendedor.
- 1 Franela humedecida con agua.
- 1 Tripie con malla de Asbesto.
- Cajas Petri estériles desechables.
- Medio Agar Base Sangre / Gelosa Base Sangre.
- Medio Agar Nutritivo / Gelosa Nutritiva.
- Agua destilada (agua desionizada).
- 1 Matraz Erlenmeyer de 500 mL.
- 1 Matraz Erlenmeyer de 1L.
- 1 Refrigerador (4°C).
- 1 Balanza Granataria.
- 1 Espátula.

Procedimiento experimental.

Para esta práctica es necesaria la obtención de una muestra de 5 mL de sangre venosa anticoagulada estéril, para el enriquecimiento del medio Agar Base Sangre / Gelosa Base Sangre, la más utilizada es la sangre de carnero, caballo y algunas veces de conejo, ya que la sangre

humana es considerada como un tejido y debido a las NOM no se utiliza.

Obtención de la muestra sanguínea.

- Realizar la venopunción como lo indica el procedimiento experimental, *punción mediante sistema al vacío*, de la **Práctica 8. “Obtención de muestras sanguíneas por punción venosa mediante jeringa y sistema al vacío”**. Utilizando el tubo con anticoagulante.

Preparación de los materiales de vidrio.

- Lavar cada uno de los materiales de vidrio con detergente específico para material de cristal de laboratorio.
- Enjuagar con agua corriente para retirar el detergente por completo y enjuagar por dentro los matraces con agua destilada.

7.1.1 Preparación de medio de Cultivo Agar Sangre / Gelosa Sangre.

Fundamento:

En 1966 Ellner *et. al.* describe el desarrollo de una formulación de agar sangre, designada como Agar Columbia. Las propiedades del medio de cultivo, que por lo general es enriquecido con sangre de ovinos, para propiciar el crecimiento se derivan de la combinación de dos peptonas y del extracto de levadura como fuente de vitaminas del complejo B. Se incluye almidón de maíz para absorber los derivados tóxicos contenidos en la muestra y sirve como fuente de energía para los microorganismos que poseen alfa-amilasas. La sangre con la que se enriquece esta base, permite detectar las reacciones hemolíticas y aporta el factor X (Hemo) y el factor V (NAD) necesarios para el crecimiento de numerosas especies patogénicas entre ellas *Haemophilus*.

Técnica:

- Leer cuidadosamente el membrete del medio de cultivo, antes de comenzar el procedimiento experimental.
- Calcular la cantidad necesaria para preparar el volumen de Agar Base Sangre / Gelosa Base Sangre, pesando con ayuda de una balanza granataria.
- Disolver el medio en la mitad del volumen de agua destilada en el



matraz Erlenmeyer, una vez disuelto completar el volumen de agua destilada y homogeneizar el contenido.

Nota: Al volumen total de agua se le resta el volumen de sangre que se adicionará, con el objetivo de no diluir de más la base y asegurar que el medio gelifique correctamente.

- En caso de ser necesario ajustar el pH a 7.0, con tiras de pH.
- Tapar el matraz con una torunda del algodón o bien con un trozo de papel aluminio. Con la finalidad de concentrar el calor dentro del matraz y evitar la pérdida de agua. Tal y como se muestra en la *Imagen 50.- Matraz con medio de cultivo y tapa de papel aluminio.* Tomado de goo.gl/xGjqYN

- Calentar a ebullición hasta disolver el agar, paso conocido como Clarificación; durante el calentamiento agitar el matraz constantemente para evitar que el agar se queme, esto con ayuda de la franela humedecida previamente con agua corriente tomando por el cuello del matraz y con la mayor precaución posible.



Imagen 51.- Matraz con medio de cultivo y tapa de papel aluminio. Tomado de goo.gl/xGjqYN

- Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión, durante 15 minutos.
- Realizar los cálculos para obtener el volumen de sangre necesario para enriquecer al 5% el medio de cultivo con sangre.
- Posteriormente enfriar a una temperatura entre 45-50°C, vaciar en condiciones de esterilidad la sangre, homogeneizar nuevamente y distribuir en placas o cajas Petri estériles, nuevas y desechables, en condiciones de esterilidad. Como se muestra en la imagen 52.



Imagen 52.- Llenado de cajas Petri con medio de cultivo. Tomado de goo.gl/ENNYhp.

- Colocar la tapa sin que cubra por completo la caja, ya que esta se puede empañar con el vapor del medio, Y esperar a que gelifique por completo el medio de cultivo, manteniéndolo en condiciones de esterilidad colocando la tapa como se muestra en la siguiente imagen.

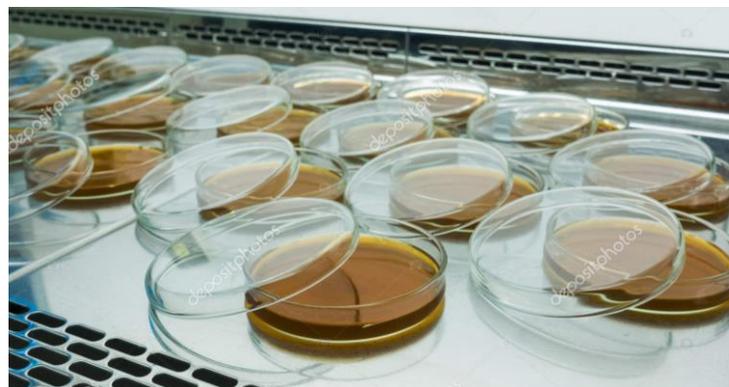


Imagen 53.- Caja Petri con medio de cultivo. Tomado de goo.gl/YvvauM.

- Es importante en todo momento mantener dichas condiciones de esterilidad (Nunca apagar el mechero y trabajar lo más cercano posible a él) aproximadamente 30 cm de circunferencia.



- Posterior a la gelificación del medio de cultivo, colocar la tapa a las cajas y apilarlas formando una torre, en posición invertida, es decir, con la tapa hacia abajo y el medio de cultivo hacia arriba.

- Asegurar las cajas de Petri con cinta masking, para evitar que se abran y se contamine el medio.

- Identificar las cajas con los datos de la etiqueta que se encuentra al final de esta práctica.

- Realizar la prueba de esterilidad como se indica en el numeral **7.1.3**

Prueba de esterilidad de medios de cultivo.

- mantener en refrigeración a 4°C hasta el momento de uso.

7.1.2 Preparación de medio de Cultivo Agar Nutritivo / Gelosa Nutritiva y otros.

Fundamento:

Un medio de cultivo es una solución, líquida, sólida o semisólida, que contiene sustratos que permiten el crecimiento bacteriano y la mayoría de estos revela características metabólicas de los microorganismos bacterianos que ahí se cultivan. El medio contiene extracto de carne, peptona y un porcentaje de *agar agar*, como elementos básicos, siendo una formulación suficiente para el desarrollo de los microorganismos. Otros medios de cultivo pueden contener: indicadores de pH, concentraciones altas de sales, inhibidores, en su mayoría colorantes, diferentes carbohidratos, lactosa, glucosa, sacarosa, manosa, entre otros; extracto de carne que proporciona al medio fuente de nitrógeno, otros carbohidratos y vitaminas. El empleo de cada medio de cultivo bacteriológico es de acuerdo al tipo de muestra que se va a cultivar.

Técnica:

- Leer cuidadosamente el membrete del medio de cultivo, antes de comenzar el procedimiento experimental.

- Calcular la cantidad necesaria para preparar el volumen de Agar - Disolver el medio en la mitad del volumen de agua destilada en el

matraz Erlen Meyer, una vez disuelto completar el volumen de agua destilada y homogeneizar el contenido.

Nota: El volumen de medio a elaborar, así como el número y tamaño de las cajas a preparar será indicado por el profesor responsable de la sesión.

- En caso de ser necesario ajustar el pH= 7.0, con ayuda de una tira pH

- Tapar el matraz con una torunda del algodón o bien con un trozo de papel aluminio, con la finalidad de concentrar el calor dentro del matraz y evitar la pérdida de agua, como se muestra en la *Imagen 51.- Matraz con medio de cultivo y tapa de papel aluminio.*

- Calentar a ebullición o hasta disolver el agar, durante el calentamiento agitar el matraz tomándolo por el cuello con una franela humedecida con agua corriente y con la mayor precaución posible.

- Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 libras de presión, durante 15 minutos, es importante señalar que no todos los medios de cultivo que se preparen en el laboratorio vana a ser esterilizados por este método.

- Posteriormente enfriar a una temperatura entre 45-50°C y distribuir en placas o cajas Petri estériles, nuevas y desechables, en condiciones de esterilidad como se muestra en la *Imagen 52.- Llenado de cajas Petri con medio de cultivo.*

- Colocar la tapa sin que cubra por completo la caja, ya que esta se puede empañar con el vapor del medio, lo que aumenta la probabilidad de contaminación, esperar a que gelifique por completo el medio de cultivo, manteniendo en todo momento condiciones de esterilidad como se muestra en la *Imagen 53.- Caja Petri con medio de cultivo.*

- Es importante en todo momento mantener dichas condiciones de esterilidad (Nunca apagar el mechero y trabajar lo más cercano posible a él) aproximadamente a 30 cm de circunferencia.



- Posteriormente a la gelificación del medio de cultivo tapar las cajas y colocarlas a manera de formar una torre, en posición invertida, es decir, con la tapa hacia abajo y el medio de cultivo hacia arriba.

7.1.3 Prueba de esterilidad de medios de cultivo.

- Tomar el 10% del lote de medios de cultivo producidos, e incubar a 37°C durante 24 horas.
- Asegurar el resto de las cajas de Petri con cinta masking, para evitar que se abran y se contamine el medio.
- Identificar las cajas con los datos de la etiqueta que se encuentra al final de esta práctica y mantener en refrigeración a 4 °C hasta el momento de uso.
- Pasado este tiempo evaluar si existe crecimiento bacteriano o no y registrar los datos en la siguiente tabla.

Resultados.

Tabla 34.- Tabla de resultados de la prueba de esterilidad a Medios de Cultivo sólidos.

	Sí o No
¿Se presentó crecimiento bacteriano sobre la placa?	
Realizar una un dibujo de una placa a la que se aplicó la prueba.	

Tabla 35.- Tabla de resultados de la elaboración de Medios de Cultivo.

Nombre del medio de cultivo elaborado.	Fecha de realización del medio de cultivo.	Nombre de la persona que elaboró el medio de cultivo.	Numero de cajas elaboradas.

Referencias.

- Sin autor. (2013). Unidad 2. Técnicas básicas de microbiología. Práctica 2. Esterilización y preparación de medios de cultivo. [En línea] Recuperado el 10 de enero de 2018. De goo.gl/GXc53M
- Luna, J. (2012). Manual de Prácticas de Laboratorio: Microbiología General y Aplicada. Universidad de Magdalena. Santa Martha Colombia.
- Inseto Mast Group.
- Magdalena, J., Gallegos, B. y Becerril, A. (2017) Manual de Laboratorio de Bacteriología Diagnóstica. FES-C. UNAM.

Nombre del medio de cultivo elaborado:

Fecha de elaboración:

Nombre de la persona que elaboro el medio de cultivo:



Práctica 7.2 Cultivo y caracterización de los microorganismos presentes en la muestra Bacteriológica.

Objetivo.

Que el alumno conozca las diferentes técnicas de aislamiento en medios de cultivo sólido, para la obtención de cultivos puros y los diferentes estudios del área de bacteriología diagnóstica, basándose en los conceptos y principios básicos de bacteriología, como recurso de apoyo diagnóstico para el médico.

Introducción.

Las bacterias constituyen un grupo amplio y diverso de organismos microscópicos que existen en su hábitat como células aisladas o asociadas. La diversidad microbiana se hace evidente de muchos modos, por ejemplo, como variaciones en la estructura, tamaño celular, morfología, estrategias metabólicas, motilidad desarrollo, adaptación a condiciones ambientales extremas y en muchos otros aspectos de biología molecular (Luna, J., 2012).

Para describir adecuadamente a los microorganismos bacterianos es necesario establecer sus características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas, entre otras, para ello es importante hacerlas crecer en medios de cultivo, que por lo general se encuentran en estado sólido, y que conocemos como agares.

Las técnicas de aislamiento permiten la obtención de microorganismos a partir de muestras completas como suelo, agua y alimentos, entre otros, en las que hay una gran diversidad microbiana, así como para comprobar la pureza de los cultivos.

Los cultivos puros están formados por un solo tipo de microorganismos; y son indispensables para conocer las características morfológicas, propiedades de tinción, actividad bioquímica, patogenicidad, sensibilidad a antibióticos e identificación de las especies bacterianas.

El aislamiento de cultivos bacteriológicos puede realizarse por métodos de dilución, en medios sólidos por estría en placa, o en medios semisólidos por estría y picadura. La limitación principal de la técnica de dilución es que no es práctica para el aislamiento a partir de mezclas donde, el microorganismo de interés se encuentra en pequeñas cantidades, ya que solo se obtendrán las bacterias dominantes.

En bacteriología se entiende como siembra al proceso mediante el cual se deposita una pequeña cantidad de bacterias (inoculo) en un medio de cultivo estéril, este puede proceder de una muestra o de un cultivo previo. Al crecimiento de microorganismos obtenido, se le denomina cultivo, la finalidad de la siembra es permitir la multiplicación de los microorganismos, al proporcionar las condiciones óptimas para su desarrollo, dentro de las cuales, se debe considerar: temperatura, disponibilidad de nutrientes, pH, oxígeno en la atmosfera, entre otros.

La siembra de microorganismos debe llevarse a cabo con instrumentos y medios previamente esterilizados, trabajando siembra bajo condiciones de asepsia, esta es lograda por medio del mechero Bunsen que, debido a las corrientes de convección verticales que genera, es capaz de crear un ambiente estéril en la zona inmediata, alrededor y debajo de la llama (Campos, V. y Lisperguer, S., 2012)

Las normas generales para realizar la siembra de bacterias, son importantes, ya que indican las condiciones bajo las cuales se trabajará la muestra, con el fin de evitar interferencias y realizar un diagnóstico certero.

Para trabajar bajo condiciones de asepsia en el laboratorio y mantener la esterilidad de los medios de cultivo que serán sembrados, se deben acatar las siguientes indicaciones:

- El trabajo es individual, por lo tanto cada alumno debe utilizar un mechero a la vez.
- Antes y después de realizar cualquier manipulación es necesario lavarse las manos con agua y jabón desinfectante, así como desinfectar el área de trabajo.
- Las asas bacteriológicas deben esterilizarse al rojo vivo cada vez que se utilizan y se dejan de utilizar. Antes de tomar el inóculo deben enfriarse dejándolas cerca de mechero.
- Para la siembra en placas, éstas deben abrirse frente al mechero, sin dejar la tapa boca abajo sobre la mesa.
- Una vez que la siembra se ha realizado, los tubos y las placas serán incubados bajo condiciones controladas de temperatura, en el caso de las placas, estas deberán ser incubadas en posición invertida (Campos, V. y Lisperguer, S., 2012).

Las técnicas de siembra bacterianas en medios de cultivo se realizan de la siguiente manera, **para la siembra en medios líquidos**



es necesario inocular tubos de ensayo o matraces con medio de cultivo. El crecimiento se identifica por la presencia de turbidez en el medio, que forma un velo o película superficial, o por la acumulación de microorganismos en el fondo del tubo o matraz, **la siembra en medios sólidos** se realiza en medios de cultivo contenidos en cajas de Petri o en tubos de ensayo, dependiendo del objetivo del cultivo.

La siembra mediante estriado por dilución consiste en disponer un inóculo (impronta), también conocido como en la superficie del agar y luego extenderlo sobre el medio.

La forma en la que esta se realiza es con ayuda de un asa de loop previamente esterilizada a la llama del mechero, se deposita un pequeño inóculo y se extiende, en estrías, sobre una pequeña área de la placa. Se esteriliza el asa, se enfría en un lado donde el medio no se use, y a partir de la siembra realizada anteriormente, se estria la zona contigua (Campos, V. y Lisperguer, S., 2012). La técnica es denominada “siembra en estrías”. El proceso se repite sucesivamente, hasta sembrar cuatro zonas, como se muestra a continuación.

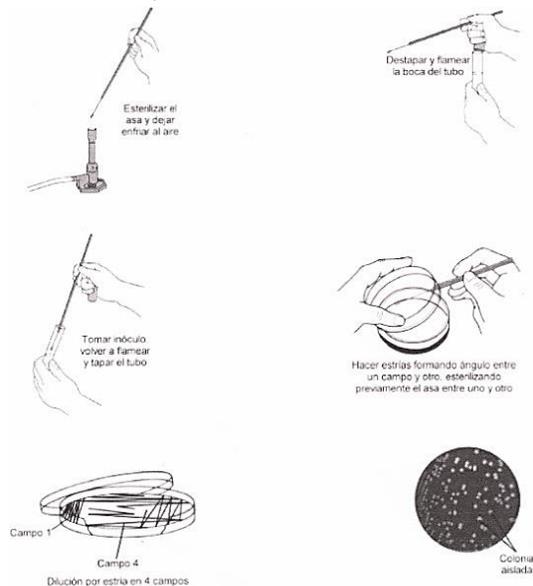


Imagen 54.- Sembrado por estriado en placa. Tomado de goo.gl/Rz6SpC

o bien colocar el inóculo primario a lo largo del medio de cultivo y proceder después de esterilizar el asa a expandir el inóculo en forma

de S, como lo muestra la *imagen 55. Técnica de sembrado para Urocultivo*, solo en caso de muestras líquidas.

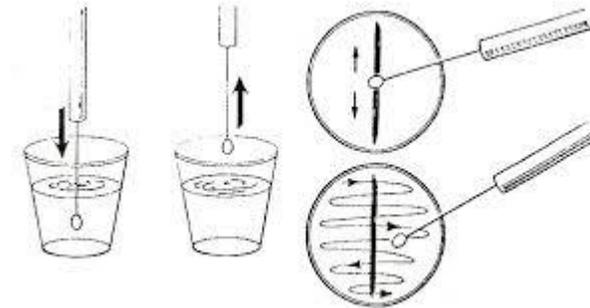


Imagen 55. Técnica de sembrado para urocultivo. Tomado de goo.gl/h3G48k

Las siembras realizadas en placa, permitirán observar el crecimiento de los microorganismos a través de la formación de colonias, Cada colonia se desarrolla a partir de la multiplicación de una célula, y cada colonia se denomina “Unidad formadora de Colonia” (UFC).

Los tipos de sembrado en tubo son **siembra por estria en tubos con agar semisólido inclinado**, donde se usa el asa bacteriológica en forma de loop como la que se muestra en a continuación.



Imagen 56.- Asas bacteriológicas con punta en forma de loop. Tomado de goo.gl/S1cYJn

Para realizar la inoculación en estos medios se siembra sobre la superficie del agar con un movimiento en zig-zag desde el fondo hasta la parte superior del tubo, como lo indica la imagen 57.

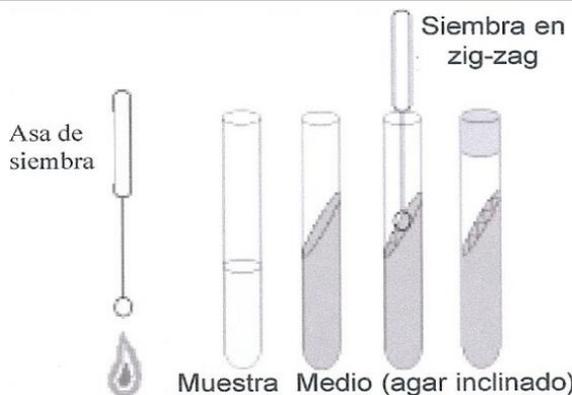


Imagen 57.- Sembrado por estría en medio sólido con agar inclinado en tubos de ensayo. Tomado de goo.gl/344ZAz

La siembra por picadura en tubos con medio de cultivo semisólido, donde se agrega el inoculo con ayuda de una asa bacteriológica en punta. El asa se introduce en el centro del agar con un solo movimiento; se observará el crecimiento en la línea de inoculación. Este agar se utiliza para la prueba de motilidad.

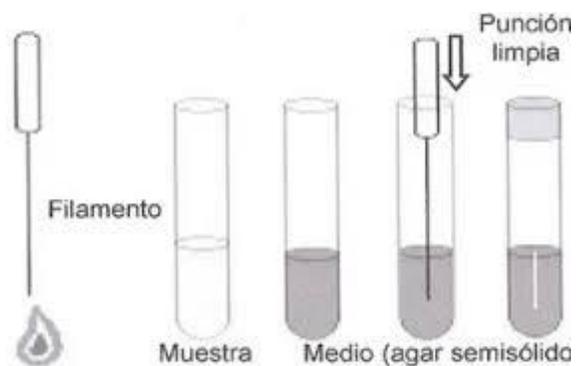


Imagen 58.- Sembrado por picadura. Tomado de goo.gl/344ZAz

Materiales, equipos y reactivos.

- Medios de cultivo por alumno inoculados en la práctica anterior.
- Asas Bacteriológicas calibradas.
- Mechero Bunsen.
- Muestra obtenida por el alumno.

- Alka-Seltzer®, vaso de precipitados de 50 mL, vela pequeña y agua corriente (En caso de generar atmosfera anaerobia)
- Encendedor.

Procedimiento experimental.

Siembra mediante estriado por dilución en placa.

- Rotular adecuadamente las cajas de Petri ya inoculadas (con la impronta realizada) de la práctica anterior, realizar el siguiente procedimiento.
- Con el asa bacteriológica previamente flameada y enfriada o bien con ayuda de un hisopo estéril que se toma la muestra, inocularla mediante la técnica de dilución por estría. Haciendo en primer lugar una impronta, en condiciones de esterilidad (cerca del mechero bunsen). Como se muestra en la Imagen 65.- Técnica de dilución por estría cruzada. En caso de usar una muestra No líquida. **Paso Realizado en la sesión anterior.**

- Estriar la zona donde se realizó la impronta para dispersar las bacterias en la primer zona de estrías, como se ejemplifica en el número 2 de la Imagen 68.
- Flamear el asa bacteriológica y girar la caja de Petri un cuarto de vuelta, enfriar el asa bacteriológica tocando la superficie del medio de cultivo lejos de la zona de estrías.
- Rozar con el asa bacteriológica una vez la superficie del conjunto original de estrías y hacer un segundo grupo de estrías, como se ejemplifica en el número 2 de la imagen 59.
- Repetir el procedimiento anterior realizando las estrías de los pasos 3 y 4, esta última estría deberá ser más abierta, en forma de S.

Nota: En caso de tratarse de una muestra líquida o de orina, para la realización de un urocultivo, es necesario que se siga el procedimiento de la imagen 59.

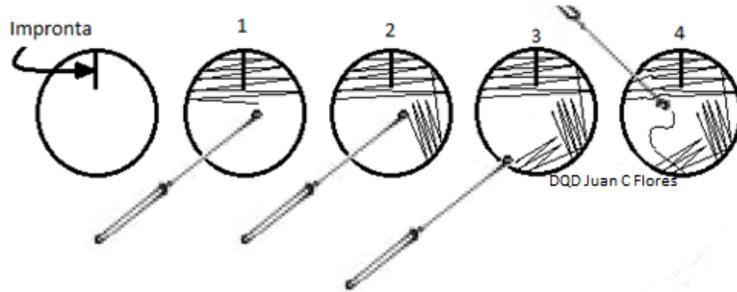


Imagen 59. Técnica de sembrado por Dilución por estría cruzada.

- Sumergir el asa bacteriológica previamente esterilizada en el mechero y enfiada al aire, en la muestra líquida y después realizar una estría a lo largo de toda la caja de Petri sin llegar a los extremos.
- Posteriormente esterilizar nuevamente el asa bacteriológica y enfriar tocando un extremo del medio de cultivo.
- Realizar una segunda estría en forma de S sobre la primer estría como lo indica la *imagen 55. Técnica de sembrado para urocultivo*.
- Posterior a la siembra asegurar las cajas de Petri con cinta masking, para evitar que se abran e incubar las cajas durante 24-48 horas a una temperatura de 37 °C en la estufa para cultivo bacteriológico.

Resultados.

Tabla 36.- Tabla de resultados del sembrado en placa.

Tipo de muestra.	Tipo de técnica que se utilizó.
Exudado Faríngeo	
Exudado Nasal	
Exudado Ótico	
Secreción de Heridas	

Expectoración	
Urocultivo	
Coprocultivo	

Referencias.

- Campos, V. y Lisperguer, S., (2012). Manual de Laboratorio de Microbiología. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Luna, J. (2012). Manual de Prácticas de Laboratorio: Microbiología General y Aplicada. Universidad de Magdalena. Santa Martha Colombia.
- Magdalena, J., Gallegos, B. y Becerril, A. (2017) Manual de Laboratorio de Bacteriología Diagnóstica. FES-C. UNAM.



Práctica 7.3 Toma de muestra bacteriológica.

Objetivo.

Que el alumno obtenga la información necesaria para la correcta recolección, manejo, conservación, transporte y recepción de muestras para el análisis Bacteriológico.

Introducción.

El procedimiento usado para la identificación de agentes infecciosos varía ampliamente. Es importante que la muestra remitida al laboratorio lleve una historia clínica completa, e incluya un diagnóstico tentativo que permita al personal del laboratorio decidir sobre un rango de los posibles agentes a evaluar y además seleccionar las pruebas y procedimientos adecuados para identificar al patógeno.

Un problema común en la microbiología clínica, es el envío inadecuado de muestras, que además carecen de historia clínica o comentarios del médico que las envía. Una especial atención a los métodos y la prontitud del transporte de muestras al laboratorio es necesaria para mantener la sobrevivencia de las bacterias, particularmente bacterias anaerobias y bacterias sensibles a cambios de temperatura, pH (incluyendo muchas bacterias entéricas patógenas). Los hisopos para cultivos aerobios deberán ser transportados en un medio de transporte así como el medio de transporte modificado de Stuart. Para anaerobios, los hisopos deberán ser colocados en un medio de transporte especial.

Muestras aspiradas como las secreciones de heridas, pueden ser transportadas dentro de la jeringa donde fueron colectadas o colocadas en un tubo estéril. Muestras aspiradas de líquidos o sangre pueden también ser introducidos asépticamente en botellas de cultivo de sangre, conocidas como frascos para hemocultivo, transportadas y cultivadas de la misma manera. Cuando la muestra es tomada por aspiración, el riesgo de contaminación es mínimo y mayores volúmenes son disponibles para cultivo.

Muestras de tejido: Deberán ser transportadas en frascos plásticos estériles o medios de transporte anaeróbicos.

Muestras fecales: Si el transporte va a demorar más de 3 horas deberán ser colocadas en un medio de transporte (1 gramo de heces por 10 ml de medio). El medio Cary-Blair es un medio de transporte

conveniente para la mayoría de los patógenos entéricos incluyendo *Campylobacter jejuni*. Las muestras deberán ser refrigeradas y deben ser cultivadas a la brevedad posible.

Las muestras remitidas para cultivo deberán ser claramente rotuladas (identificación del paciente y origen de la muestra) y deberá incluir una breve historia de las condiciones del paciente y tratamiento.

Es lógico suponer que todas las muestras clínicas son potencialmente infecciosas, y es prudente manejar estos materiales en forma tal que permita impedir razonablemente la exposición franca del personal a los patógenos cuya presencia es más probable, en consecuencia y como precaución mínima los laboratorios clínicos deberán utilizar numerosas prácticas dictadas por el simple sentido común en la recepción y manejo inicial de todas las muestras diagnósticas.

Las muestras obtenidas de un sitio de infección para cultivo bacteriano deberán tomarse de lugares apropiados para incrementar la probabilidad de contener el patógeno bacteriano que se pretende diagnosticar. La flora normal podría contaminar las muestras bacteriológicas, ya que la piel y las superficies de las membranas mucosas de animales contienen gran población de bacterias (microbiota) (Magaña, A., 2010).

Materiales, equipos y reactivos.

- Abatelenguas de madera estériles.
- Jeringas de 3 o 5 mL nuevas.
- Hisopos estériles.
- Medio de transporte si se cuenta con él.
- Mechero Bunsen
- Solución Salina Fisiológica Estéril, SSFE
- Asas bacteriológicas.
- Medios de cultivo, los elaborados en la sesión anterior.

Procedimiento experimental.

7.3.1 Toma de muestra de exudado faríngeo.

Fundamento:

Un exudado faríngeo es la toma de muestra de la parte posterior de la cavidad bucal, es importante para el diagnóstico de infecciones



bacterianas que se presentan en el tracto respiratorio alto. Dicho diagnóstico suele complicarse debido a que en la boca existe una microbiota normal de aproximadamente 200 especies comensales, por lo que el esquema de identificación incluye tanto Gram negativos, Gram positivos y hongos.

Indicaciones para el paciente:

- Es importante mencionarle al paciente que este análisis bacteriológico debe ser realizado antes del inicio del tratamiento con antibióticos.
- No es necesario presentarse con ayuno, pero es preferible no haber consumido ningún tipo de alimento previo a la toma de muestra bacteriológica.

Técnica:

- Pedir al paciente que abra la boca y con ayuda de un abatelenguas preferentemente estéril, deprimir su lengua.
- Con ayuda de un hisopo humedecido con SSFE, proceder a tomar la primera muestra, realizando un raspado suave en el área que podría manifestar signos de inflamación o ulceración, como las amígdalas y detrás de la úvula. Procurando no tocar la lengua, dientes ni labios del paciente, como se muestra en la Imagen 54.



Imagen 60.- Sitios anatómicos de la toma de muestra de un exudado Faríngeo. Tomado de goo.gl/GESgQd

- Realizar la descarga del inóculo obtenido haciendo una impronta en los medios de cultivo antes elaborados y rotular en las cajas de Petri:

Nombre de paciente, fecha y tipo de muestra obtenida; o bien Colocar el hisopo en un tubo de ensayo estéril con medio Stuart, para su posterior tratamiento, el cual no debe sobre pasar las 4 horas, manteniendo condiciones de esterilidad en todo momento.

- A continuación con ayuda de un hisopo seco proceder a la segunda toma de muestra, realizando un raspado suave de cualquier área que podría manifestar signos de inflamación o úlceras procurando no tocar la lengua, dientes ni labios del paciente.
- Realizar un extendido bacteriano con el último hisopo, sobre un portaobjetos y fijar al calor, identificar la laminilla con el tipo de muestra obtenida y el nombre del paciente.
- Guardar la laminilla, ya que será utilizada en la **Práctica 7.5 Identificación de Género y Especie: Pruebas bioquímicas.**

7.3.2 Toma de muestra de exudado nasal.

Fundamento:

La toma de muestra de un exudado nasal, es útil en la búsqueda de la bacteria *Staphylococcus aureus*. No es útil cuando se busca la etiología de otras enfermedades como rinitis, sinusitis o rinosinusitis.

Indicaciones para el paciente:

- Es importante mencionarle al paciente que este análisis bacteriológico debe ser realizado antes del inicio del tratamiento con antibióticos.
- No es necesario presentarse con ayuno, pero es preferible no haber consumido ningún tipo de alimento previo a la toma de muestra bacteriológica.

Técnica:

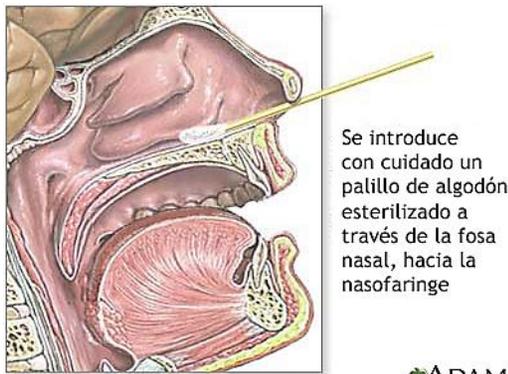
- Con ayuda de un hisopo estéril sumergido previamente en SSFE, tomar una muestra profunda de ambas fosas nasales, utilizando el mismo hisopo, como se muestra en la imagen 55.
- Realizar la descarga del inóculo obtenido, haciendo una impronta en uno de los medios de cultivo antes elaborados y rotular en la base de



la caja de Petri: Nombre de paciente, fecha y tipo de muestra obtenida, o bien colocar el hisopo en un tubo de ensaye estéril con medio de Stuart para su posterior tratamiento, el cual no debe sobrepasar las 4 horas, manteniendo condiciones de esterilidad en todo momento.

- Realizar un extendido bacteriano, con el mismo hisopo que se inocularon los medios de cultivo, sobre un portaobjetos y fijar al calor. Rotulándolo con el nombre del paciente y con el tipo de muestra que se tomó.

- Guardar la laminilla, ya que será utilizada en la **Práctica 7.5 Identificación de Género y Especie: Pruebas bioquímicas.**



ADAM

Imagen 61.- Toma de exudado nasal. Tomado de goo.gl/SsD9r9

7.3.3 Toma de muestra de exudado ótico.

Fundamento:

El exudado ótico es un análisis bacteriológico que se realiza para diagnosticar al agente causal de la infección de oído mejor conocida como Otitis; por la ubicación anatómica de los oídos existen 2 tipos de otitis bacteriana: La otitis externa y la otitis interna o profunda.

Indicaciones para el paciente:

- Es importante mencionarle al paciente que este análisis bacteriológico debe ser realizado antes del inicio del tratamiento con antibióticos.
- No es necesario presentarse con ayuno.

Técnica:

- Hacer una tracción hacia atrás y arriba del pabellón de la oreja e introducir un hisopo estéril sumergido en SSFE, para cada cavidad ótica, rotando suavemente para impregnarlo de todo el material purulento que podría estar presente en esta parte del oído como se muestra en la imagen 56.

- Trazar una línea por la mitad de cada una de las cajas Petri, de los medios de cultivo a utilizar y rotular como Oído Derecho (OD) y Oído Izquierdo (OI). Con la finalidad de colocar el inóculo de cada oído en la parte correspondiente, así como: Nombre del paciente, Fecha y el Tipo de muestra obtenida.

- Realizar la descarga del inóculo obtenido, de los hisopos, haciendo una impronta en los medios de cultivo antes elaborados o bien colocar los hisopos en un tubos de ensaye estériles distintos con medio de Stuart para su posterior tratamiento, el cual no debe sobrepasar las 4 horas, manteniendo condiciones de esterilidad en todo momento.



ADAM

Imagen 62.- Toma de un exudado ótico. Tomado de goo.gl/tidVGt

- Por último realizar un extendido bacteriano sobre un portaobjetos para cada hisopo y fijar al calor, rotulándolo con el nombre del paciente y con el tipo de muestra que se tomó, así como las siglas OD y OI.



- Guardar la laminilla, ya que será utilizada en la **Práctica 7.5 Identificación de Género y Especie: Pruebas bioquímicas.**

7.3.4 Toma de muestra de exudado de secreción de heridas.

Fundamento:

El exudado de secreción de heridas se refiere a la evaluación bacteriológica de líquido de las heridas abiertas en el cuerpo humano. Dicho líquido proviene del líquido tisular alrededor del tejido inflamado y dañado posiblemente infectado por bacterias de la microbiota del paciente o por otro tipo de bacterias conocidas como oportunistas.

Técnica:

Para un cultivo aerobio.

- Lavar adecuadamente con jabón quirúrgico y agua limpia o estéril el área de la lesión.

- Con ayuda de un hisopo estéril y sumergido en SSFE, presionar moderadamente sin llegar al fondo de la herida y girar el hisopo con delicadeza como se muestra en la imagen 57.

- Realizar la descarga del inóculo obtenido, del hisopo, haciendo una impronta en los medios de cultivo antes elaborados y rotular en las cajas de Petri: Nombre de paciente, fecha y tipo de muestra obtenida; o bien colocar el hisopo en un tubo de ensaye estéril con medio de Stuart, para su posterior tratamiento, el cual no deberá sobrepasar las 4 horas.

- Con el mismo hisopo realizar un extendido bacteriano sobre un portaobjetos y fijar al calor, rotulándolo con el nombre del paciente y con el tipo de muestra que se tomó.

- Guardar la laminilla, ya que será utilizada en la **Práctica 7.5 Identificación de Género y Especie: Pruebas bioquímicas.**

Para un cultivo anaerobio.

- Lavar adecuadamente con jabón quirúrgico y agua limpia o estéril el

área de la lesión.

- Con ayuda de un hisopo estéril y sumergido en SSFE, presionar moderadamente hasta llegar al fondo de la herida y girarlo con delicadeza como se muestra en la siguiente imagen.



Imagen 63.- Toma de exudado de secreción de heridas. A la derecha cultivo aerobio y a la izquierda cultivo anaerobio. Tomado de goo.gl/t1DTmb.

- Con el mismo hisopo realizar un extendido bacteriano sobre un portaobjetos y fijar al calor, rotulándolo con el nombre del paciente y con el tipo de muestra que se tomó.

- Guardar la laminilla, ya que será utilizada en la **Práctica 7.5 Identificación de Género y Especie: Pruebas bioquímicas.**

- Inmediatamente después de realizar el frotis introducir el hisopo en un medio de cultivo para anaerobios, como el medio líquido Tioglicolato de Sodio, manteniendo condiciones de esterilidad en todo momento.

- O bien coleccionar con ayuda de una jeringa de 5 ml, un aproximado de 3 ml de material purulento e inyectarlo en un frasco para hemocultivo anaerobio rotulado con los datos del paciente, el frasco debe ser igual



al que se muestra en la siguiente imagen.



Imagen 64.- Frascos o botellas de hemocultivo. Tapa de color azul indica que es un frasco aerobio y tapa de color rojo indica anaerobio. Tomado de goo.gl/6v5Y5x.

7.3.5 Toma de muestra de expectoración (esputo).

Fundamento:

El cultivo de una expectoración es un análisis bacteriológico, que funciona para reconocer al agente causal de la infección bacteriana de las vías aéreas inferiores.

Indicaciones para el paciente:

- Es importante mencionarle al paciente que este análisis bacteriológico debe ser realizado antes del inicio del tratamiento con antibióticos.
- No es necesario presentarse con ayuno, pero es preferible no haber consumido ningún tipo de alimento previo a la toma de muestra bacteriológica.
- Hacer saber al paciente que es importante enjuagarse la boca con SSF o bien con agua destilada, antes de realizar el estudio.
- Será necesario obtener el esputo tras una expectoración profunda luego de un esfuerzo de tos, preferentemente por la mañana, ya que es durante el lapso de la noche cuando se concentran los microorganismos en la mucosa respiratoria, en un recipiente desechable, de boca ancha, limpio o estéril, como los que se utilizan en la toma de muestra urinaria.

Nota: La saliva no sirve para realizar este estudio, por lo cual que el paciente solo deseche saliva en el contenedor estéril no es de utilidad.

Técnica:

- La muestra debe provenir del sector bajo del tracto respiratorio, es decir de los pulmones, como lo muestra la imagen 59, (tos profunda).
- De no producirse expectoración espontánea, puede inducirse el esputo con nebulizaciones de suero fisiológico estéril tibio (15 ml durante 10 minutos), procedimiento realizado en el cubículo de toma.
- Rotular el frasco de boca ancha con los datos del paciente, para su posterior tratamiento, el cual no deberá sobrepasar las 4 horas.
- Con ayuda de un hisopo estéril, tomar una porción de la muestra y realizar la descarga del inóculo obtenido, haciendo una impronta en los medios de cultivo antes elaborados, manteniendo condiciones de esterilidad en todo momento, Y rotular en las cajas con medio de cultivo: Nombre de paciente, fecha y tipo de muestra obtenida.
- Con el mismo hisopo realizar un extendido bacteriano sobre un portaobjetos y fijar al calor. Rotulándolo con el nombre del paciente y con el tipo de muestra que se tomó.
- Guardar la laminilla, ya que será utilizada en la **Práctica 7.5 Identificación de Género y Especie: Pruebas bioquímicas.**



Imagen 65.- Expectoración de un paciente. Tomado de goo.gl/zc8TX3.



7.3.6 Toma de muestra para urocultivo.

Fundamento:

Un Urocultivo se define como el cultivo de una muestra urinaria de un paciente con signos y síntomas de una infección en el tracto urinario (ITU). Una ITU es la presencia y proliferación de bacterias patógenas en el tracto urinario de los humanos, más común en mujeres. Se pone de manifiesto mediante su inoculación en medios de cultivo apropiados para la muestra.

Indicaciones para el paciente:

- Es necesario mencionarle al paciente que este análisis bacteriológico debe ser realizado antes del inicio del tratamiento con antibióticos.
- Lavarse correctamente las manos con agua y jabón antibacterial. Es importante la adquisición de un frasco de boca ancha, de plástico nuevo, estéril, transparente y de cierre hermético, identificado correctamente con los datos del paciente.
- Obtener la muestra de orina como lo indica el procedimiento experimental, *indicaciones para el paciente*, de la **Práctica 7. Examen General de Orina**.
- Almacenar la muestra biológica para su posterior tratamiento el cual no deberá sobrepasar las 4 horas.

Técnica:

- Describir las características físicas de la muestra en la *Tabla 39-Observación macroscópica de la muestra de urocultivo*
- Tomar con ayuda de un hisopo estéril y en condiciones de esterilidad una porción de la orina a analizar y realizar un inóculo, sin legar a las orillas de la caja con medio de cultivo. A diferencia de las demás improntas, esta se realiza a lo largo de toda la caja, como se muestra en la siguiente imagen.

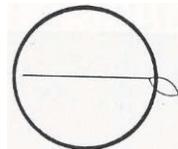


Imagen 66.- Impronta primaria para un Urocultivo. Tomado de goo.gl/MSsu3Z

- Con el mismo hisopo realizar un extendido bacteriano sobre un portaobjetos y fijar al calor, rotulándolo con el nombre del paciente y con el tipo de muestra que se tomó.

- Guardar la laminilla, ya que será utilizada en la **Práctica 7.5 Identificación de Género y Especie: Pruebas bioquímicas**.

7.3.7 Toma de muestra para coprocultivo.

Fundamento:

Un coprocultivo es la siembra de una muestra adecuada de heces fecales, en un medio de cultivo apropiado para el desarrollo de bacterias entéricas patógenas. Esta muestra se utiliza para el diagnóstico etiológico de gastroenterocolitis aguda. Excepcionalmente se puede utilizar para la búsqueda de portadores de *Salmonella sp.* En los laboratorios de Análisis Clínicos en el área de Bacteriología se realiza principalmente la búsqueda de *Salmonella* y *Shigella* en pacientes adultos.

Técnica:

- Es necesario mencionarle al paciente que este análisis bacteriológico debe ser realizado antes del inicio del tratamiento con antibióticos.
- Obtener la muestra de materia fecal a cualquier hora del día, preferentemente deberá ser por la mañana.
- Lavarse correctamente las manos con agua y jabón antibacterial. Es importante la adquisición de un frasco de boca ancha, de plástico nuevo, limpio, transparente e identificado correctamente con los datos del paciente.
- Destapar el frasco para obtener la muestra, teniendo cuidado de no tocar la parte interior de la tapa del recipiente, para obtener la muestra.
- Recolectar entre 3 y 5 gramos de muestra fecal en el frasco de boca ancha.
- En el caso de presentarse heces diarreicas, solo llenar hasta una cuarta parte el recipiente.



- Observar las características de la muestra y proceder a realizar la impronta lo antes posible, para esto es necesario tomar con un hisopo estéril una porción de la muestra en condiciones de esterilidad, y descargar el inóculo en los medios de cultivo antes elaborados y rotular en las cajas de Petri: Nombre de paciente, fecha y tipo de muestra obtenida
- Con el mismo hisopo realizar un extendido bacteriano sobre un portaobjetos y fijar al calor, rotulándolo con el nombre del paciente y con el tipo de muestra que se tomó.
- Guardar la laminilla, ya que será utilizada en la **Práctica 7.5 Identificación de Género y Especie: Pruebas bioquímicas.**

7.3.8 Toma de muestra exudado vaginal.

Fundamento:

Ya que las infecciones de transmisión sexual (ITS) son un problema importante de salud pública, el estudio de los exudados cervico-vaginales implica la búsqueda e identificación tanto de microorganismos patógenos, causantes de vaginosis y vaginitis bacteriana, como de las bacterias presentes en la microbiota de la cavidad vaginal. Procedente de la siembra de una muestra adecuada para el cultivo y aislamiento del agente causal de la infección.

Indicaciones para la paciente:

- Es necesario mencionarle a la paciente que este análisis bacteriológico debe ser realizado antes del inicio del tratamiento con antibióticos, no utilizar soluciones antisépticas vaginales, óvulos ni pomadas en los 3 días previos a la recolección de la muestra.
- No debe mantener relaciones sexuales 48 horas previas a la toma de muestra.
- El día de la toma de la muestra, presentarse bañada.

Técnica:

- Con la paciente en posición ginecológica se introducirá un espejo vaginal, como el que se muestra en la siguiente imagen “sin lubricante”

(si fuera necesario lubricar, utilizar solo agua tibia) como el que se muestra en la siguiente imagen.



Imagen 67.- Espejo vaginal. Tomado de goo.gl/UZVGBU.

- Con ayuda de un hisopo grande y seco, eliminar el moco cervical.
- Proceder a recoger la muestra, con un hisopo humedecido en SSFE del fondo del saco vaginal, como lo ejemplifica el paso 1 de la imagen 62; girando el hisopo como lo indica el paso dos de la misma imagen.

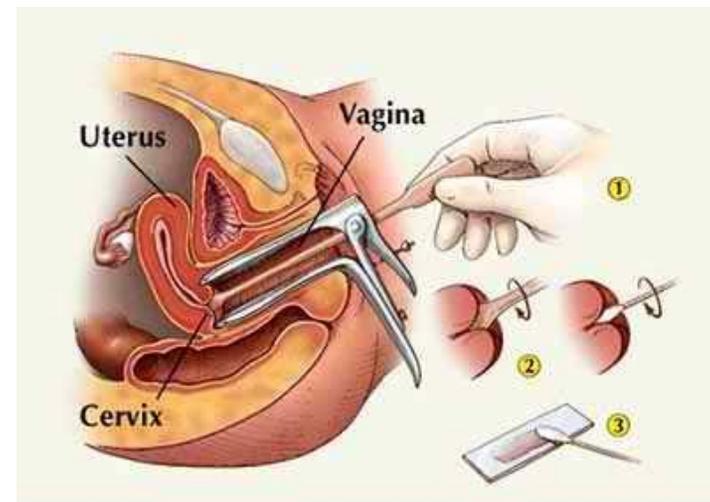


Imagen 68.- Técnica de toma de muestra de un Exudado Vaginal. Tomado de goo.gl/nuVj4a.



- Con un el segundo hisopo tomado, realizar un extendido bacteriano sobre un portaobjetos, como se indica en el paso número 3 de la imagen 62 y fijar al calor, rotulándolo con el nombre del paciente y con el tipo de muestra que se tomó.

- Guardar la laminilla, ya que será utilizada en la **Práctica 7.5 Identificación de Género y Especie: Pruebas bioquímicas.**

- Llenar la tabla correspondiente en la sección de resultados.

Resultados.

Tabla 37.- Datos del Paciente

Nombre:	Edad:	Sexo:
Fecha de evaluación:		

Tabla 38.- Tipos de muestras obtenidas.

Tipo de muestra.	Nombre del medio de cultivo utilizado y nombre del paciente	Analista
Exudado Faríngeo		
Exudado Nasal		
Exudado Ótico		
Secreción de Heridas		
Expectoración		
Urocultivo		
Coprocultivo		
Observaciones		

Tabla 39.- Observación macroscópica de la muestra de Urocultivo.

Determinación	Resultado	Valores de Referencia	Analista
Color			
Olor			
Aspecto			

Tabla 40.- Observación macroscópica de la muestra para el Coprocultivo.

Determinación	Resultado	Analista
Color		
Olor		
Aspecto		

Referencias.

- Chávez, L., Fernández, A. y Arellano, J. (2013). Manual de Prácticas para el Laboratorio de Microbiología II Medicina. FESA UNAM. [En línea] Recuperado el 29 de mayo de 2018. De goo.gl/MMkPKB.
- Anzalone, L. et. al. (2004). Manual de toma de muestras para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico. Departamento de Laboratorio Clínico Repartición Microbiología Hospital de Clínicas Facultad de Medicina Montevideo – Uruguay.
- Luna, J. (2012). Manual de Prácticas de Laboratorio: Microbiología General y Aplicada. Universidad de Magdalena. Santa Martha Colombia.
- Magdalena, J., Gallegos, B. y Becerril, A. (2017) Manual de Laboratorio de Bacteriología Diagnóstica. FES-C. UNAM.



Práctica 7.4 Evaluación de la morfología colonial macroscópica y microscópica.

Objetivo

Que el alumno reconozca la morfología colonial macroscópica y microscópica de las principales bacterias de importancia clínica, basándose en los conceptos y principios básicos de la bacteriología, como recurso de apoyo diagnóstico para el médico.

Introducción

Una colonia bacteriana es una agrupación de bacterias aislada; observable a simple vista, en medio de cultivo sólido; con forma, borde, tamaño y elevación similar; con color que depende del medio en el que se cultive. Formada a partir de la reproducción exponencial de una sola bacteria conocida como Unidad Formadora de Colonias o UFC.

Morfología macroscópica: Las siembras realizadas en placas de Petri, permitirán observar el crecimiento de los microorganismos a través de la formación de colonias. Cada colonia desarrollada a partir de la multiplicación de una bacteria o UFC puede diferenciarse de acuerdo a:

- **Tamaño:** Grande (mayor a 1 mm de diámetro); mediana (1 mm de diámetro); pequeña (menor a 1 mm de diámetro).
- **Elevación:** Plana, convexa, centro elevado, umbilicada, cóncava, entre otras.
- **Forma:** Circular, filamentosa, irregular, puntiforme, rizoide, ovalada, fusiforme, entre otras.
- **Borde o margen:** Entero, ondulado, lobulado, dentado, filamentoso, rizado, entre otros.
- **Color:** Blanco, negro, gris, crema, naranja, entre otros.
- **Apariencia:** Brillante, opaca, suave, rugosa, granular. Entre otras.
- **Consistencia:** Observada al tomar la colonia con el asa esterilizada al rojo vivo en el mechero, puede ser: cremosa, viscosa, granular (Campos, V. y Lisperguer, S., 2012).

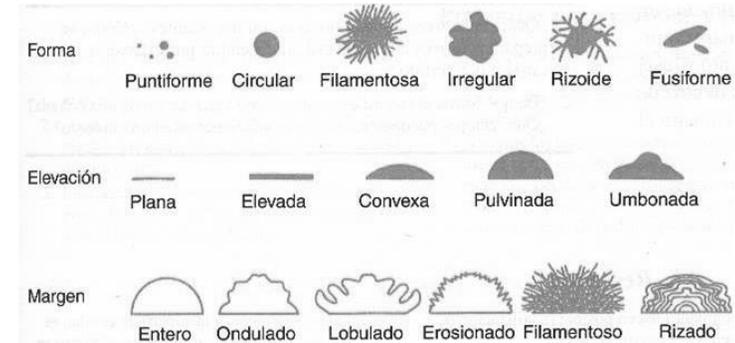


Imagen 69.- Características macroscópicas del crecimiento colonial bacteriano. Tomado de goo.gl/JxhWxW.

Características ópticas luz transmitida (observar a través de la colonia)

- **Opaca:** No permite el paso de luz.
- **Traslúcida:** Deja pasar la luz sin permitir la completa visibilidad de los objetos observados a través de la colonia.
- **Transparente:** Deja pasar la luz permitiendo ver claramente los objetos observados a través de la colonia.
- **Hemolíticas:** En medios enriquecidos con sangre se observa un halo translucido al contorno de las colonias bacterianas. Dicha característica se divide en tres tipos de reacciones hemolíticas como se muestra en la siguiente imagen.

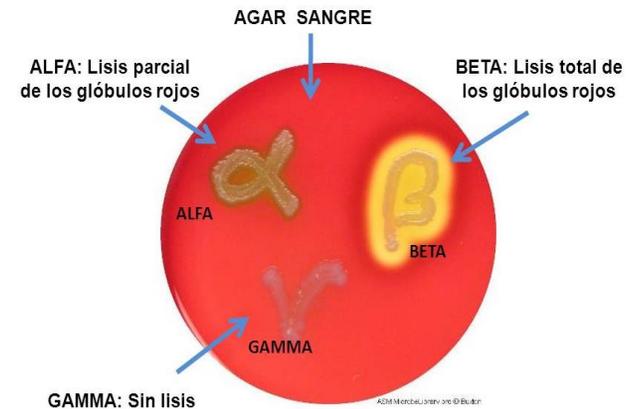


Imagen 70.- Tipos de hemólisis en Agar Sangre. Tomado de goo.gl/Jtjtz.



Debido a las características que los microorganismos expresan en las placas de medio de cultivo sólido es posible identificar en caso de obtener cultivos mezclados. Si bien es posible lograr dicha diferenciación, es necesario realizar pruebas que evalúen el metabolismo del microorganismo para identificar el Género y la Especie a la que pertenece cada uno de los microorganismos presentes en el cultivo (Luna, J., 2012).

Por otra parte, es de suma importancia conocer las características morfológicas microscópicas de las bacterias, ya que estas orientan a su identificación. Por lo cual resulta relevante la observación de las mismas al microscopio, ya que, de este modo se pueden conocer características como: El grupo tintorial al que pertenecen (GRAM), su agrupación, tamaño y forma, entre otros.

La morfología de los microorganismos puede estudiarse por observación de los microorganismo vivos, mediante técnicas conocidas como examen en fresco. Se debe considerar que la mayoría de las bacterias vivas son incoloras, por lo cual el examen en fresco no permite visualizarlos fácilmente y es muy deficiente. Por ello se utilizan colorantes para realizar tinciones de los microorganismos que faciliten su observación (Campos, V. y Lisperguer, S., 2012).

Así, se tienen dos posibilidades de examinar a los microorganismos: Vivos y muertos, para examinar a los microorganismos muertos, existen dos tipos de tinciones, las simples en las que se emplea un solo colorante; y las diferenciales o compuestas, en las que se logra la diferenciación de los microorganismos y se utiliza más de un colorante.

Para teñir las preparaciones con bacterias es indispensable fijarlas. La fijación tiene como finalidad hacer que las células se adhieran al portaobjetos, haciendo uso de calor (más comúnmente utilizado) o compuestos químicos como el metanol. Cuando la muestra proviene de un cultivo sólido, se recomienda calor y cuando proviene de un cultivo líquido, el metanol porque se retiene un mayor número de células.

La tinción más utilizada para la evaluación microscópica bacteriana es la llamada Tinción de Gram, esta tinción fue desarrollada por el médico Danés Christian Gram y divide los microorganismos en dos grandes grupos, Gram negativos, que tiñen su pared de color rojo y Gram positivos que tiñen su pared de color azul. La técnica consiste

en hacer la extensión y fijarla a la llama, cubrirla con el primer colorante Cristal violeta, lavar para retirar el exceso, colocar Lugol (mordiente) lavar nuevamente, decolorar con alcohol etílico/acetona y contrateñir con Safranina, como lo indica la imagen 71, para finalmente observar al microscopio con el objetivo de inmersión, y se observarán estructuras como las de la imagen 72.

TINCION DE GRAM

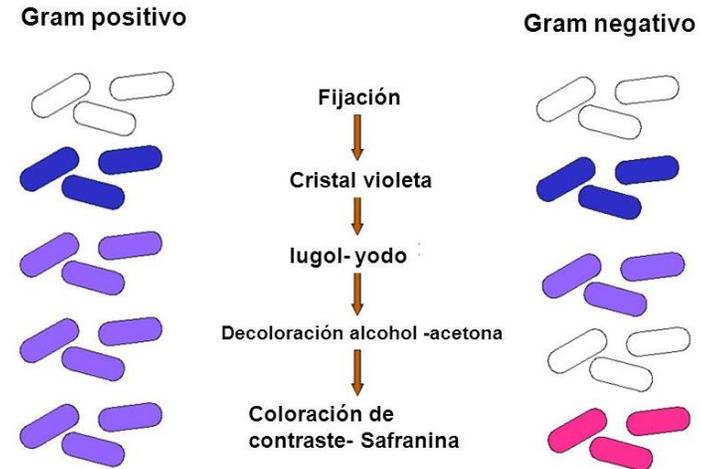


Imagen 71.- Pasos para la realización de la tinción de Gram.
Tomado de goo.gl/6B5QkA.

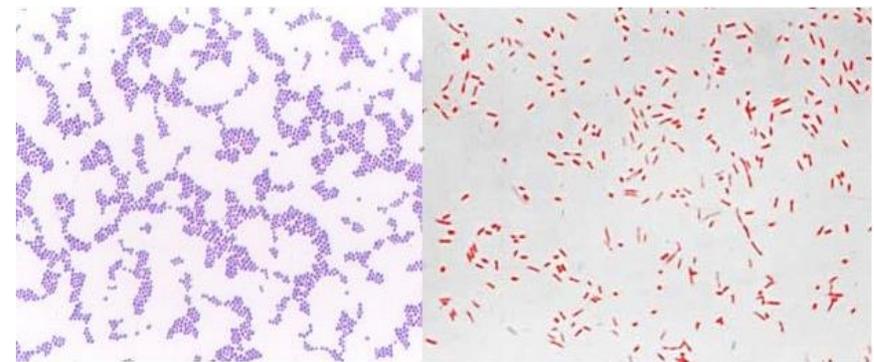


Imagen 72.- Bacterias Gram positivas a la izquierda y Gram negativas a la derecha. Tomado de goo.gl/TSfk36.



Otra de las tinciones más empleadas es la tinción ácido alcohol resistente, que es una tinción diferencial, esta distingue aquellas bacterias que teñidas resisten la decoloración por ácidos o por alcoholes. Son bacterias de los géneros *Nocardia* y *Mycobacterium* principalmente, ya que poseen paredes bacterianas con lípidos impermeables a los colorantes en solución acuosa. De esta tinción existen dos métodos, uno es la tinción de Ziehl-Nielsen y otra de Kinyoun o método frío, la única diferencia que presentan ambos métodos es la temperatura a la que se lleva a cabo la tinción.

Además de poder identificar bacterias en Gram positivas y Gram negativas, es posible observar tanto la agrupación que presentan, como la morfología microscópica bacteriana.

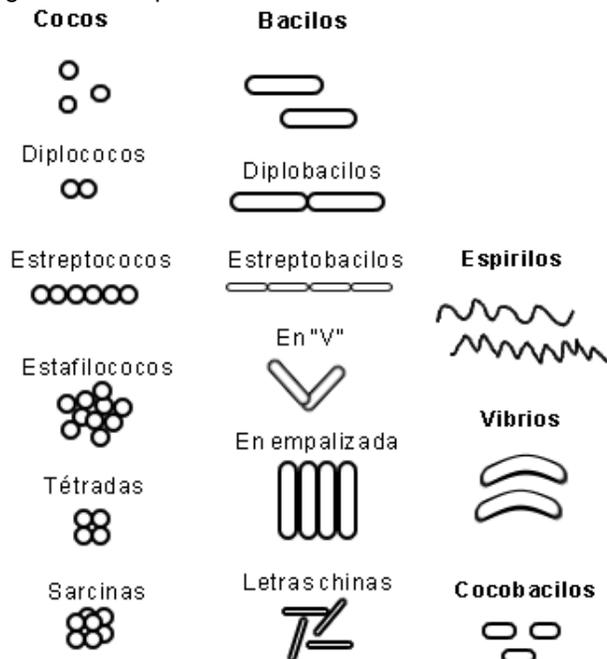


Imagen 73.- Morfología microscópica bacteriana. Tomado de goo.gl/eya8rN.

En cuanto a la morfología podemos encontrar 4 grandes grupos: cocos, bacilos (cocobacilos) y otros, en los que se encuentran los espirilos y vibriones. Conforme a la agrupación podemos describir para los cocos, los agrupados en racimos se conocen como *Staphylococcus*,

con agrupación en cadenas *Streptococcus*, y otras agrupaciones como las tétradas o las sarcinas, como se puede apreciar en la Imagen 73.

En el caso de los Bacilos es posible observar cadenas de ellos que se conocen como Streptobacilos, diplobacilos, entre otros. También podemos encontrar morfologías como los cocobacilos, espirilos o vibriones (en forma de comas), que por lo general no tienen agrupación.

Materiales, equipos y reactivos.

- Medios de cultivo por alumno, los utilizados en la sesión anterior, inoculados e incubados, a las condiciones mencionadas.
- Asas Bacteriológicas.
- Mechero Bunsen.
- Microscopio Óptico compuesto.
- Tren para realizar la Tinción de Gram.
- Pinzas de disección.
- Portaobjetos limpios o nuevos.
- Aceite de inmersión.
- Agua estéril o Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFE).

Procedimiento experimental.

7.4.1 Evaluación de la Morfología Colonial Macroscópica.

- Realizar la observación macroscópica colonial bacteriana de cada uno de los de los medios de cultivo.
- Sin abrir las cajas observar las colonias bacterianas e identificar: Tamaño, elevación, borde o margen, color y apariencia.
- Seleccionar al tipo de colonias bacterianas que se encuentren en mayor proporción.
- En cuanto a la consistencia, es necesario realizar la prueba, en zona de esterilidad, tocando el asa bacteriológica solo una de las colonias y flamear al rojo vivo posteriormente.
- Llenar en la sección de resultados la tabla correspondiente a los puntos antes mencionados.



Nota: En caso de tener una caja con la superficie plagada con hongos filamentosos, no abrir por ningún motivo. Ya que las esporas pueden tener un efecto negativo sobre la salud de analista.

7.4.2 Evaluación de la Morfología Colonial Microscópica.

Elaboración de un extendido bacteriano.

- Realizar una extensión de bacteria en un portaobjetos limpio o nuevo, tomando con el asa calibrada el volumen de agua estéril y depositarlo sobre el cubreobjetos. Posteriormente tomar una porción de la colonia bacteriana y hacer un extendido sobre la superficie del portaobjetos. Permitir que seque al aire o bien cerca del mechero. Tal y como se muestra en la siguiente imagen.

Nota: En todo momento se debe trabajar en zona de esterilidad.

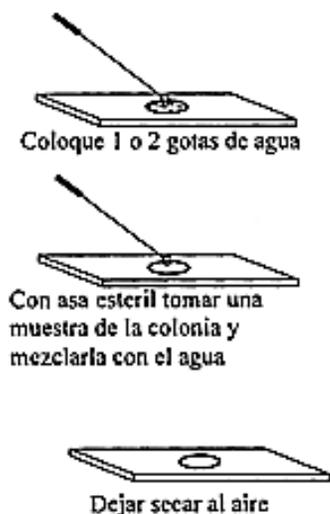
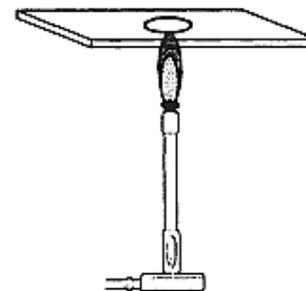


Imagen 72.- Diagrama de realización de un extendido bacteriano.
Tomado de goo.gl/EXF4K3

- A continuación realizar la fijación de la muestra al fuego, flameando el portaobjetos varias veces con la extensión hacia arriba en la llama del mechero Bunsen, y sujetando con unas pinzas de disección. Es

importante que la temperatura que se alcance después de cada flameado sea soportada por el dorso de la mano, con esto se evita que sean degradadas las estructuras bacterias.



Pasar rápidamente sobre la flama del mechero

Imagen 73.- Fijación de la muestra al fuego. Tomado de goo.gl/Rp9mAV

7.4.2.1 Tinción de Gram.

Fundamento:

En la tinción de Gram las bacterias se diferencian entre bacterias Gram positivas (azul-violeta) y bacterias Gram negativas (rojo-rosa pálido), debido a los componentes estructurales de su pared celular.

Técnica:

- Utilizar los extendidos elaborados en la sesión **Práctica 7.3 Toma de muestra Bacteriológica**, o bien, de las cajas con cultivo bacteriano, tomar una porción de una colonia bacteriana aislada y extenderla sobre un portaobjetos limpio o nuevo, al que previamente se le haya añadido una gota de agua estéril o SSFE y fijar a la llama del mechero.
- Cubrir la extensión 1 minuto con Cristal violeta.
- Pasado el minuto lavar con agua corriente (directo del grifo) a chorro suave, disponiendo del agua a partir de un extremo del portaobjetos, que deberá mantenerse en posición inclinada para que el decolorante se elimine en su totalidad.



- Cubrir la extensión con Lugol (mordiente) durante 1 minuto.
- Pasado el tiempo, lavar con agua corriente a chorro suave, dejando que resbale por completo el lugol.
- Dejar caer unas gotas de Alcohol/Acetona, para decolorar.
- Lavar nuevamente con agua corriente a chorro suave, disponiendo de agua a partir de un extremo del portaobjetos, que deberá mantenerse en posición inclinada.
- Cubrir la preparación con Safranina (colorante de contraste) durante 1 minuto.
- Una vez más lavar con agua corriente a chorro suave, dejando que resbale por completo el último colorante.
- Secar al aire o cerca del mechero de Bunsen.
- Observar la preparación al microscopio óptico compuesto, primero enfocando con el objetivo de 10x, posteriormente pasar al de 40x y por último con el objetivo de inmersión, colocando el aceite directamente sobre la preparación.
- La lectura se realizará siguiendo una trayectoria de zig-zag, como se muestra en la *Imagen 49. Secuencia de observación de laminillas.*
- La descripción se lleva de acuerdo al orden sugerido, que es: morfología microscópica de la bacteria (cocos, bacilos, cocobacilos, etc.); Gram (positivo o negativo); agrupación (racimos, cadenas, diplococos, tétradas, etc.)
- Para esta descripción basarse en la *Imagen 73.- Morfología microscópica bacteriana.*
- Registrar los resultados obtenidos en la sección de Resultados.

Resultados.

Tabla 41.- Datos del Paciente

Nombre:	Edad:	Sexo:
Dx presuntivo:	Fecha de evaluación:	

Tabla 42.- Tabla de resultados de la evaluación de la morfología Colonial Macroscópica.

	Medio de Cultivo 1	Medio de Cultivo 2	Medio de Cultivo 3
Número de colonias diferentes			
Tamaño			
Elevación			
Borde o Margen			
Color			
Apariencia			
Consistencia			

Tabla 43.- Tabla de resultados de la evaluación de la Morfología Colonial Microscópica.

	Frotis 1	Frotis 2	Frotis 3
Gram (Positivo o Negativo)			
Descripción Completa			

Nota: El orden recomendado para la descripción es, Morfología; Gram (positivo o negativo) y agrupación.

Referencias

- Microdonto, (2009). MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS BACTERIANAS. En línea, Recuperado el 28 de abril de 2018. De goo.gl/YxtHVj
- Campos, V. y Lisperguer, S. (2012). Manual de Laboratorio de Microbiología. Ediciones universitarias de Valparaíso, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Magdalena, J., Gallegos, B. y Becerril, A. (2017) Manual de Laboratorio de Bacteriología Diagnóstica. FES-C. UNAM.



Práctica 7.5 Identificación de Género y Especie: Pruebas bioquímicas.

Objetivo

Que el alumno reconozca, realice e interprete las pruebas bioquímicas primarias utilizadas en Bacteriología, así como aplicar los conceptos básicos del metabolismo bacteriano, conocer los fundamentos y bases bioquímicas de las pruebas utilizadas e interpretar correctamente las pruebas bioquímicas más utilizadas en dicha área.

Introducción

La correcta detección e identificación de los microorganismos presentes en las muestras clínicas o de otros orígenes es imprescindible para determinar la causa de la infección o contaminación, seguir el curso de un enfermedad o contaminación ambiental, etc. y decidir los tratamientos a aplicar.

La identificación de las bacterias puede basarse en muchos caracteres: la morfología, fisiología, bioquímica, serológicos y moleculares.

Las pruebas bioquímicas permiten determinar parámetros metabólicos propios de diversos géneros y especies bacterianas. Por medio de la utilización de medios de cultivo selectivos, diferenciales, indicadores de pH y diversos reactivos, es posible determinar la presencia de enzimas, la utilización de diversos carbohidratos y las vías por las cuales los utilizan (oxidativa o fermentativa), la producción de ácido sulfhídrico (HS), entre otros.

Para lograr la obtención de resultados certeros, deben utilizarse cultivos puros y en fase exponencial o de crecimiento (no cultivos viejos ni iniciales), de alrededor de 18 a 24 horas.

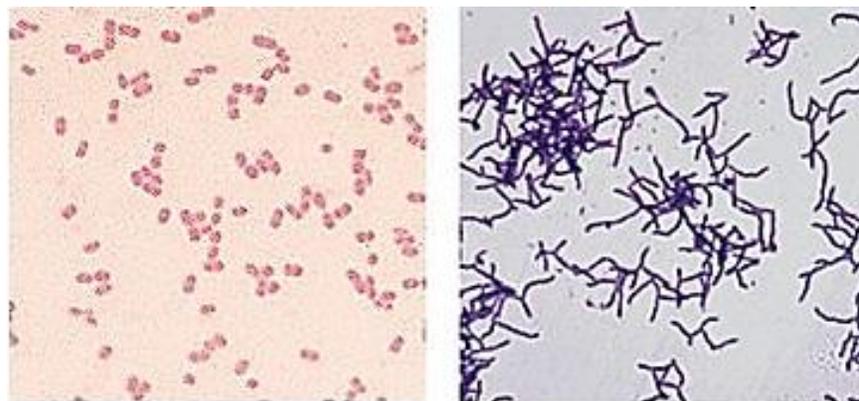
La identificación bioquímica se realiza utilizando a las bacterias causantes de la enfermedad, ya usando placas con medio de cultivo o de tubos con medios sólidos o semisólidos, donde se inoculan las cepas en diversos medios de cultivo. También existen baterías comerciales que vienen con los medios deshidratados y solo se inocula la bacteria que necesita ser identificada, por ejemplo, el sistema *API 20 E*® para enterobacterias, que permite determinar 20 pruebas la vez. Los sistemas más modernos son automatizados, como el *BIOLOG*®,

que permite la identificación de bacterias en base a su capacidad de metabolizar 95 fuentes de carbono diferentes, El *Phoenix*® que permite la realización de hasta 100 pruebas de identificación y sensibilidad simultáneamente, el *BATEC*® es un analizador automático para micobacterias que utiliza componentes fluorescentes para la identificación de dichos microorganismos, el *Sistema Microscan*®, que hoy en día es el líder en la identificación microbiológica de bacterias, ya que puede realizar la identificación y la susceptibilidad a los antimicrobianos de organismos de interés clínico. Este sistema es dinámico ya que es posible trabajarlo de maneras manual, o de acuerdo a la carga de trabajo que se presente en el laboratorio de microbiología, puede usarse de manera completamente automatizada.

Se debe considerar que existen también otros sistemas automatizados de identificación y técnicas moleculares.

Las pruebas bioquímicas primarias, ayudan a la identificación del género bacteriano. Dichas pruebas encierran a las 5 primordiales, que son:

- **Tinción de Gram:** Ayuda a diferenciar entre bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas debido a los componentes estructurales de su pared celular, como se muestra a continuación.



Gram-negativo

Gram-positivo

Imagen 74.- Bacterias Gram negativas y Gram positivas. Tomado de goo.gl/ZPRvHb.



- **Prueba de oxidasa:** Se basa en determinar la presencia de enzimas citocromo C que forman parte de las cadenas transportadoras de electrones propias del metabolismo respiratorio de las bacterias.

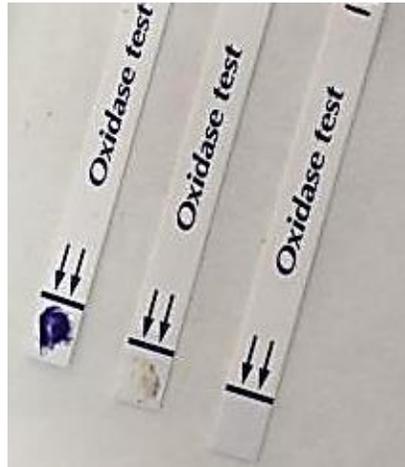


Imagen 75.- Prueba positiva a la izquierda, negativa al centro y la tira sin muestra, de la prueba de citocromo oxidasa. Tomado de goo.gl/1iCmGK

- **Prueba de catalasa:** Que se basa en determinar la presencia de la enzima catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, como se muestra en la imagen siguiente.

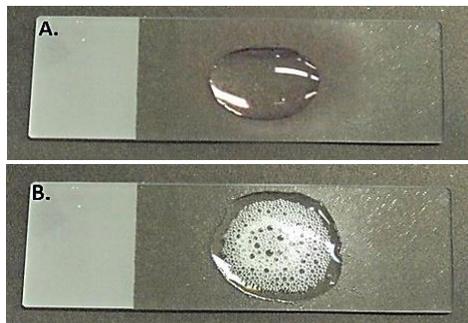


Imagen 76.- Control negativo A. y Control positivo B. para la prueba de Catalasa. Tomado de goo.gl/1c5ANC

- **Prueba de Oxido-Fermentación:** Que permite determinar si el microorganismo utiliza un carbohidrato por vía fermentativa u oxidativa, siguiendo el algoritmo de la imagen 77.

Prueba de oxidación-fermentación (OF)

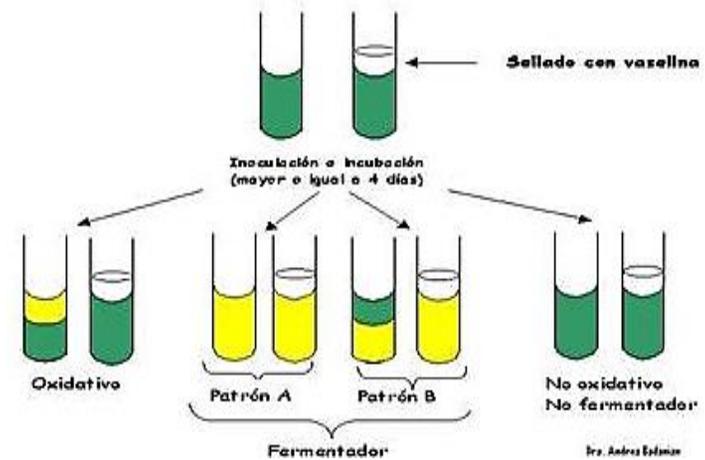


Imagen 77.- Prueba de óxido fermentación. Tomado de goo.gl/g3VwYu.

- **Prueba de motilidad:** Se lee en los mismos tubos que la prueba anterior, al ser inoculada la bacteria con una asa bacteriológica en punta, en caso de que el inoculo se observe desplazado hacia algún lado, se dará como una prueba positiva, como se muestra en la siguiente imagen.

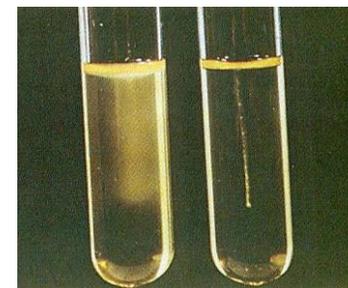


Imagen 78.- Prueba de motilidad, donde se observa un control positivo del lado izquierdo y uno negativo del lado derecho. Tomado de goo.gl/VYytNb



Las pruebas bioquímicas secundarias, son un grupo de pruebas más especializadas que revelan las características metabólicas de los microorganismos. Dentro de las cuales podemos encontrar las más utilizadas en los laboratorios de bacteriología de primer nivel.

- **Prueba con agar Hierro de Kligler:** Permite determinar la capacidad de un microorganismo de utilizar a la lactosa, detectar la producción de gas y/o ácido sulfhídrico y contiene rojo de fenol como indicador de pH. El medio se encuentra inclinado en pico de flauta lo que permite que se inocular por picadura y estría.
- **IMViC:** Que corresponde a 4 pruebas que se utilizan para la identificación de enterobacterias, 1.-Evalúa la producción de Indol, 2.- Rojo de Metilo (MR), 3.- Voges-Proskauer (VP), 4.- utilización de citrato.
- **Detección de exoenzimas (Amilasa y Gelatinasa):** Mediante la hidrólisis de almidón que se realiza en placas con almidón al 1% y la hidrólisis de gelatina que se realiza en tubos con agar gelatina al 1%.

Otros sistemas semiautomatizados de identificación bacteriana más complejos realizan distintas pruebas bioquímicas simultáneamente, estos incluyen a:

- API 20E®
- BIOLOG®
- BATEC®
- MGIT 960 TB® (para la identificación de micobacterias)
- Sistema Microscan®

7.5.1 Identificación de Género bacteriano: Pruebas bioquímicas primarias.

7.5.1.1 Prueba de Oxidasa

Fundamento:

El reactivo de Kovacs es incoloro y en contacto con la enzima citocromo C oxidasa cambia a un color morado, debido a que el tetrametil-p-fenilendiamina es una amina aromática y la oxidación de esta produce quinolonas de color morado-azulado.

Técnica:

- Se toma con un palillo grueso de madera una porción de la colonia bacteriana aislada proveniente de un cultivo de no más de 24 h.
- La muestra se pone en contacto con la tira o disco impregnado con el reactivo de la oxidasa.

Interpretación: Se debe observar una coloración morada en un lapso no mayor a 30 segundos para que sea positivo, de lo contrario el resultado es negativo.

Control positivo: *Pseudomonas aureoginosa*.

Control negativo: *Escherichia coli*.

- Llenar la tabla correspondiente en la sección de resultados.

7.5.1.2 Prueba de Catalasa.

Fundamento:

El peróxido de hidrógeno es el producto final del metabolismo oxidativo de carbohidratos, a esta vía metabólica recibe el nombre de metabolismo aerobio-oxidativo. La acumulación del peróxido es muy tóxica por lo que la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas exceptuando al género *Streptococcus* producen una enzima llamada catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno, obteniendo agua y oxígeno gas.

Técnica:

- Colocar una gota de peróxido en el portaobjetos y posteriormente con un palillo plano tomar una porción de la bacteria a partir de una colonia aislada, de un cultivo de no más de 24 h, y que no sea una placa de Agar Sangre/ Gelosa Sangre, ya que este interfiere, dando falsos positivos.

Interpretación: Si se observa el burbujeo generalmente intenso significa que hay producción de oxígeno, por lo tanto, hay presencia de la enzima catalasa.

Control positivo: *Staphylococcus aureus*.



Negativo: *Streptococcus pyogenes*.

- Llenar la tabla correspondiente en la sección de resultados.

7.5.1.3 Prueba de Oxido Fermentación (OF).

Fundamento:

El metabolismo oxidativo de la glucosa produce ácidos débiles, por lo tanto, se utiliza como indicador, el azul de bromotimol que tiene un vire de pH menor respecto al rojo de fenol, ya que son ácidos débiles se agrega una mayor cantidad de glucosa hasta el 1%, para que se produzca una mayor cantidad de ácidos y se alcance más fácilmente el vire del indicador.

El metabolismo de las peptonas produce sustancias alcalinas que podrían disminuir el pH del medio evitando así evidenciar la presencia de los ácidos débiles producidos por la vía oxidativa, para solucionar esto, el medio tiene poca cantidad de peptonas, hasta el 2% respecto a la glucosa.

En el tubo sin aceite: La producción de ácidos débiles reduciría el pH del medio, evidenciado gracias al indicador, y produciéndose una coloración amarilla en todo el tubo, aunque puede variar la intensidad del color.

En el tubo con aceite: La fermentación de la glucosa produce ácidos fuertes respecto a los que produce la vía oxidativa, ejemplo de estos ácidos son el ácido láctico, ácido fórmico y ácido acético, entre otros. El medio se acidifica y el vire del indicador da como resultado una coloración amarilla intensa en la totalidad del tubo.

Técnica:

- Rotular 2 tubos de ensaye con medio de cultivo estéril para la prueba de Oxido Fermentación, como O y como F.

- Con ayuda de un asa recta la cual se flamea en el mechero, se puede enfriar en agar estéril, tomar una porción de una colonia bacteriana aislada, en condiciones de esterilidad.

- Inocular ambos tubos por el método de picadura y preparar las condiciones de los tubos.

- Al tubo que se rotulo como F, colocar aproximadamente un mililitro de

aceite mineral estéril, en condiciones de esterilidad.

- Al tubo que se rotulo como O, se colocará su tapa sin cerrar herméticamente, es decir, que quede floja, con la intención de que entre oxígeno.

- Ambos tubos se incubarán juntos durante 24 h a una temperatura de 37 °C.

Interpretación:

- Ambos tubos verdes se interpreta como: **negativo o no sacarolítico** debido a que el microorganismo no consume glucosa.

- Ambos tubos = amarillo, amarillo: Fermentador facultativo y se reporta como: **F**

- Cuando el tubo abierto es amarillo y el tubo con aceite es verde se interpreta como reacción oxidativa y se reporta como: **O**

Control positivo oxidativo: *Pseudomonas aureoginosa*.

Control positivo fermentador: *Escherichia coli*.

Negativo para ambos: *Moraxella sp.*

- Llenar la tabla correspondiente en la sección de resultados.

7.5.1.4 Prueba de Motilidad.

Fundamento:

La motilidad de las bacterias es un factor de patogenicidad otorgado por los flagelos o pillis que se presentan en bacterias patógenas, estas estructuras de motilidad ayudan a los patógenos a cambiar de sitio para provocar una mayor colonización.

Interpretación:

- La motilidad se puede observar por un crecimiento turbio lejos de la picadura realizada en la inoculación de los medios OF o en un medio SIM (Sulfuro, Indol, Motilidad) este método es de confianza variable ya que la picadura se pudo haber realizado chueca o irregular, lo que no dará como resultado falso positivo. Para evitar este factor se realiza la técnica de gota suspendida bacteriana.



Control positivo: *Escherichia coli*.

Negativo: Bacterias del género *Streptococcus*.

- Llenar la tabla correspondiente en la sección de resultados.

Resultados:

Tabla 44.- Resultados de las pruebas Bioquímicas Primarias.

Prueba BQ 1º	Resultado Positivo o negativo Realice un esquema del resultado obtenido.	Género bacteriano obtenido.
Gram		
Oxidasa		
Catalasa		

O/F		
Motilidad		

Referencias.

- Magdalena, J., Gallegos, B. y Becerril, A. (2017) Manual de Laboratorio de Bacteriología Diagnóstica. FES-C. UNAM.



Práctica 7.6 Sensibilidad a los antibióticos: Antibiograma.

Objetivo.

Que el alumno conozca las técnicas de inhibición de los diferentes agentes antibióticos, así como comprender el fundamento de la mencionada técnica e interpretar adecuadamente los resultados del antibiograma, para que pueda aplicarlos en el ámbito profesional como un recurso de apoyo al médico.

Introducción

Un agente antimicrobiano es una sustancia química que mata a los microorganismos o inhibe su crecimiento. Los antibióticos, anti- contra y bios- vida, constituyen un grupo de compuestos químicos interesantes, ya que actúan como bactericidas, bacteriolíticos o bacteriostáticos. Tal agente puede ser una sustancia sintética, semisintética o natural.

Estos compuestos se caracterizan por ser subproductos metabólicos de un microorganismo, y casi siempre son letales para otro microorganismo no relacionado. Uno de los primeros descubrimientos sobre de que se sabe sobre esta relación microbiana se realizó en Inglaterra en 1927. Durante el curso de una investigación, el bacteriólogo Alexander Fleming dejó accidentalmente destapada una caja de Petri que contenía un cultivo de *Staphylococcus aureus*. Días más tarde se dio cuenta que un hongo había contaminado la caja, y que el *S. aureus* crecía en todas partes excepto en la zona inmediatamente contigua al hongo. Más tarde descubrió que los filtrados de caldo de hongo, eran igualmente eficaces para evitar el crecimiento bacteriano, como el hongo mismo. También encontró que era eficaz para prevenir el crecimiento de muchos otros tipos de bacterias. Este hongo se identificó más tarde como *Penicillium notatum* y el extracto bruto se denominó penicilina.

La penicilina es fundamentalmente activa contra bacterias Gram positivas, por la inhibición en la síntesis de la pared celular. Algunas especies bacterianas como el *Staphylococcus aureus* son capaces de mutar y volverse resistente al antibiótico y nulificar el efecto de la penicilina. Como consecuencia de lo anterior, casi siempre se prescriben dosis masivas para casos en que se ha creado resistencia al tratamiento antibiótico (Luna, J., 2012).

Un agente antimicrobiano debe cumplir con los siguientes requerimientos para su uso: Debe tener toxicidad selectiva, ya que, debe ser toxico para el microorganismo pero no para el hospedero; no debe de producir hipersensibilidad al hospedero; ser soluble en los líquidos corporales para que pueda penetrar a los tejidos y que los microorganismos no deben desarrollar resistencias rápidamente o ser naturalmente resistentes al agente.

Los agentes antimicrobianos presentan un espectro de actividad, que se refiere al rango de microorganismos sobre los cuales el agente es activo. Así, agentes clasificados como de amplio espectro, son aquellos que actúan sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, por ejemplo algunas cefalosporinas; y aquellos que presentan un espectro reducido sólo son activos sobre algunas especies bacterianas, por ejemplo, los aminoglucósidos.

Los métodos de sensibilidad a los antibióticos son métodos que determinan “*In vitro*” la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos bajo condiciones específicas y estandarizadas de laboratorio. El objetivo fundamental es aplicar la terapia más adecuada en pacientes con una infección determinada.

En dichas condiciones específicas, se requiere el uso de los patrones de McFarland que se utilizan como patrones de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. El patrón 0.5 de McFarland tiene una aplicación especial en la preparación de inóculos bacterianos para la realización de pruebas de sensibilidad antimicrobianas.

Las normas de turbidez se preparan mezclando productos químicos que generan precipitación para formar una solución de turbidez reproducible. Los patrones de McFarland se preparan añadiendo ácido sulfúrico a una solución acuosa de cloruro de bario, que produce la formación de un precipitado de sulfato de bario suspendido. El patrón de 0.5 de McFarland corresponde aproximadamente a una suspensión de homogénea de *Escherichia coli* de 1.5×10^8 bacterias por mililitro.

Materiales, equipos y reactivos.

- Medios de cultivo: Placas con agar Müeller Hinton o agar nutritivo / Gelosa Nutritiva preparados, mediante la técnica descrita en la



Práctica 7.1 Preparación de Medios de Cultivo, como se describe en el numeral **7.1.2 Preparación de medio de Cultivo Agar Nutritivo / Gelosa Nutritiva y otros.**

- Medio que contiene al microorganismo a evaluar (cepa pura).
- Asas Bacteriológicas calibradas.
- Hisopos de algodón estériles.
- Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFE).
- Mechero Bunsen.
- Encendedor.
- Tubos de ensaye con agua estéril.
- Tubos de ensaye estériles.
- Hisopos estériles.
- Gradilla
- Sensidiscos Multibac I.D® para bacterias Gram negativas y Gram positivas.
- Nefelómetro de Mc Farland 0.5%

Procedimiento experimental.

Preparación del inóculo:

- Tomar con un ayuda de un asa bacteriológica, un inóculo de aproximadamente 3 a 5 colonias bacterianas, aisladas e iguales, de una placa de cultivo joven (18 a 24 horas, máximo) e inocular en un tubo de ensaye con agua estéril e igualar al 0.5 del nefelómetro de McFarand
- Cada alumno realizará un antibiograma en placas de agar Müller Hinton o placas con agar nutritivo.
- En zona de esterilidad, inocular mediante sembrado masivo una placa de agar Müller Hinton o agar nutritivo / Gelosa Nutritiva con la cepa pura del microorganismo que se desea evaluar.
- Tomando un hisopo estéril y mojar la punta del algodón con el agua estéril. Después tocar una o dos colonias bacterianas del cultivo puro.
- Realizar un sembrado masivo en la placa con agar Meller Hinton o agar Nutritivo / gelosa Nutritiva.

- Colocar con ayuda de unas pinzas flameadas al mechero los sensidiscos del frasco, dependiendo que tipo de bacteria que se tenga, dependiendo si es Gram positiva o Gram Negativa, en condiciones de esterilidad.
- Rotular con los datos del paciente la caja de Petri e incubar a 37°C durante 18 a 24h.
- Pasado este tiempo, medir con ayuda de una regla el diámetro del halo de inhibición formado alrededor del sensidisco, si es que se formó. Esto indica que la cepa es sensible al antibiótico que se tea utilizando. Caso contrario, que la cepa presente resistencia al antibiótico utilizado, es que no se haya generado el mencionado halo.
- Para lo cual es necesario utilizar una serie de tablas que serán proporcionadas por el profesor el día de la sesión experimental.
- Registrar los resultados obtenidos en la sección de Resultados.

Resultados:

Tabla 45.- Resultados experimentales de la prueba de Sensibilidad a los antibióticos.

Género Bacteriano: _____

Gram del microorganismo a evaluar: _____

Antibiótico	Sensible o Resistente Marque como S o R	Diámetro del halo

Nota: S significa que el microorganismo es sensible mientras que **R** significa resistente.



Referencias.

- Campos, V. y Lisperguer, S., (2012). Manual de Laboratorio de Microbiología. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Luna, J. (2012). Manual de Prácticas de Laboratorio: Microbiología General y Aplicada. Universidad de Magdalena. Santa Martha Colombia.
- Magdalena, J., Gallegos, B. y Becerril, A. (2017) Manual de Laboratorio de Bacteriología Diagnóstica. FES-C UANM.

