

**SALUD**

SECRETARÍA DE SALUD



**INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**



# **INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

## **MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA**

**OCTUBRE 2022**


	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV: 01
	<b>Índice</b>		HOJA: 1 DE: 5

**ÍNDICE**

INTRODUCCIÓN	3
I. OBJETIVO DEL MANUAL	4
II. PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA:	5
1. REALIZAR EL PROCESAMIENTO E INCLUSIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS EN PARAFINA	
2. REALIZAR TINCIÓN BÁSICA Y ESPECIAL DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	
3. PROCESAR LÍQUIDOS CORPORALES, CITOLOGÍAS Y BIOPSIAS POR ASPIRACIÓN	
4. PROCESAR MUESTRAS BIOLÓGICAS Y BIOPSIAS URGENTES	
5. REALIZAR PROCESAMIENTO Y TINCIÓN DE INMUNOHISTOQUÍMICA MANUAL	
6. REALIZAR INMUNOHISTOQUÍMICA AUTOMATIZADA	
7. REALIZAR TINCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA	
8. DETECTAR MUTACIONES MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN	
9. REALIZAR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA CONVENCIONAL	
10. REALIZAR INMUNO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	
11. DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC)	
12. DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) EN SINERGIA CON UN ANTIFÍMICO (DAMAS CHINAS)	
13. REALIZAR ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS IN VITRO	
14. REALIZAR ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO EN LÍNEAS CELULARES EUCARIOTAS INFECTADAS CON M.TB	
15. DETERMINAR LA CARGA BACILAR DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	
16. REALIZAR LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN UN CULTIVO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN PRESENCIA DE UN COMPUESTO USANDO D2CFDA (2', 7'-DIACETATO DE DICLOROFLORESCEÍNA)	
17. REALIZAR TINCIÓN DE ZIEHL -NEELSEN	

**CONTROL DE EMISIÓN**

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>Índice</b>		<b>HOJA:</b> 2 <b>DE:</b> 5

18. REALIZAR EL MANTENIMIENTO DE CEPAS MICOBACTERIANAS

19. REALIZAR ADMINISTRACIÓN DE UN AGENTE BIOLÓGICO EN RATÓN



20. REALIZAR EUTANASIA Y TOMA DE TEJIDOS EN RATÓN

21. REALIZAR EXAMEN EXTERNO DEL CADÁVER (EXAMEN MACROSCÓPICO)

22. EVISCERAR Y OBTENER EL BLOQUE DE ÓRGANOS

**AUTORIZACIÓN**

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>Introducción</b>		<b>HOJA:</b> 3 <b>DE:</b> 4



## INTRODUCCIÓN

Este manual de procedimientos brinda información respecto a las distintas actividades que se llevan a cabo en el Departamento Patología donde se presenta información detallada, ordenada, sistematizada y comprensible necesaria para realizar los procedimientos técnicos de los laboratorios de Histotecnología en el proceso de inclusión, corte y tinción de biopsias, líquidos corporales, citologías, biopsias por aspiración y material post-mortem y del laboratorio de inmunohistoquímica, el cual se usa en una técnica basada en la detección de un antígeno en un tejido o célula, mediante el empleo de un anticuerpo específico dirigido contra el antígeno de interés y marcado con un reactivo colorido que permite su visualización de uso cotidiano que permite la orientar el desempeño y labores de las servidoras y servidores públicos que integran el mismo.

Esto con la finalidad de colaborar en el proceso de atención medica integral y especializada de las personas beneficiarias con enfermedades multifactoriales, permitiendo así, la emisión de diagnósticos anatomatológicos que ayuden a las Médicas y Médicos tratantes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en el diagnostico, tratamiento y seguimiento de las mismas.

Por lo anterior es importante contribuir en la investigación permita el avance científico y la adquisición de conocimientos de las enfermedades que aquejan a las personas beneficiarias, es por ello que el Departamento de Patología desarrolla investigación clínica y básica mediante los procedimientos técnicos que se describen a continuación, además de servir de herramienta sustancial en la formación de recursos humanos, tales como Médicas y Médicos Especialistas, Investigadoras e Investigadores experimentales y asistenciales, Técnicas y Técnicos de laboratorio y autopsias especializados en la rama de la anatomía patológica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licóna	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>Objetivo del Manual</b>		<b>HOJA:</b> 4 <b>DE:</b> 4

## I. OBJETIVO DEL MANUAL

Orientar a las servidoras y servidores públicos que integran el Departamento, estableciendo los criterios y lineamientos sistematizados que permitan el desempeño de sus actividades cumpliendo con los estándares de calidad en la rama de anatomía patológica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licón	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>Procedimientos Técnicos</b>		<b>HOJA:</b> 5 <b>DE:</b> 5

## II. PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
<b>Nombre:</b>	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
<b>Cargo-puesto:</b>	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
<b>Firma:</b>			
<b>Fecha:</b>	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV:      01
	<b>1. Procedimiento Técnico para Realizar el Procesamiento e Inclusión de Muestras Biológicas en Parafina</b>		HOJA:     1  DE:        13

## 1. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR EL PROCESAMIENTO E INCLUSIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS EN PARAFINA

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>1. Procedimiento Técnico para Realizar el Procesamiento e Inclusión de Muestras Biológicas en Parafina</b>		<b>HOJA:</b> 2  <b>DE:</b> 13

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Procesar las muestras biológicas en el laboratorio de Histotecnología mediante el procesamiento, inclusión, corte y tinción de biopsias, citologías, biopsias por aspiración y material post-mortem, permitiendo la interpretación y diagnóstico anatomopatológico.

## 2.0 OBJETIVO

Procesar histológicamente las muestras biológicas recibidas por el Departamento, tanto de biopsias, piezas quirúrgicas y cortes obtenidos en procedimientos de autopsias.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participa en el procedimiento cuentan con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite realizar esta tarea con alta calidad para poder otorgar una atención integral a las personas beneficiarias, con calidez y empatía.

1. Médica o Médico Especialista en Patología.
2. Médica o Médico Residente de Patología.
3. Coordinador del Laboratorio de Histotecnología.
4. Técnica o Técnico de Laboratorio de Histotecnología.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1. Procesamiento histológico.
  - I. Procesador de tejidos (Microm STP120, Thermo Scientific).
  - II. Aparato de inclusión en parafina (HistoStar, Thermo Scientific).
  - III. Impresora de laminillas (SlideMate As, Thermo Scientific).
  - IV. Micrótomos Leica.
  - V. Baño de flotación de tejidos (section flotation bath, Thermo Scientific).
  - VI. Secador de laminillas (RotorDry, Mopec).
  - VII. Horno (Boekel).
  - VIII. Centrífuga de mesa (Jouan).
  - IX. Refrigerador (Forma, Thermo Scientific).
  - X. Microondas para procesamiento histológico (KOS Rapid Microwave Labstation).
  - XI. Equipo de tinción automatizado (Gemini AS, Thermo Scientific).
  - XII. Microscopio óptico binocular. (Nikon eclipse 80i).

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>1. Procedimiento Técnico para Realizar el Procesamiento e Inclusión de Muestras Biológicas en Parafina</b>		<b>HOJA:</b> 3 <b>DE:</b> 13

2. Procesamiento de material citológico.
  - I. Citocentrifuga Aerospray.
  - II. Citospin 4 Thermo Scientific.

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

Cada área cuenta con una mesa de trabajo y tomas de agua para cada proceso, áreas ventiladas y con buena iluminación, contenedores para residuos biológico-infecciosos y punzo cortantes, contenedores para químicos de desechos, etc.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.  
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>1. Procedimiento Técnico para Realizar el Procesamiento e Inclusión de Muestras Biológicas en Parafina</b>		<b>HOJA:</b> 4 <b>DE:</b> 13

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

### NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-053-SEMARNAT-1993, Que establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.  
D.O.F. 22-X-1993

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.  
D.O.F. 01-VII-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.  
D.O.F. 02-II-1999

Norma Oficial Mexicana NOM-076-SSA1-2002, Salud ambiental - que establece los requisitos sanitarios del proceso del etanol (alcohol etílico).  
D.O.F. 09-II-2004

Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.  
D.O.F. 17-II-2003

Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.  
D.O.F. 23-VI-2006

Norma Oficial Mexicana NOM-001-STPS-2008, Edificios, locales, instalaciones y áreas en los centros de trabajo Condiciones de seguridad.  
D.O.F. 24-XI-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-003-SCT/2008, Características de las etiquetas de envases y embalajes, destinadas al transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.  
D.O.F. 15-VIII-2008

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>1. Procedimiento Técnico para Realizar el Procesamiento e Inclusión de Muestras Biológicas en Parafina</b>		<b>HOJA:</b> 5 <b>DE:</b> 13

Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA3-2012, Que establece las características mínimas en relación a infraestructura y equipamientos de laboratorios de Anatomía Patológica, hospitales y consultorios de atención médica especializada.  
D.O.F. 08-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.  
D.O.F. 27-I-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.  
D.O.F. 21-II-2017

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

### PROCESAMIENTO E INCLUSIÓN DE TEJIDOS EN PARAFINA.

1. Las muestras biológicas que recibe la Apoyo Administrativo de Patología Asistencial, asigna un número consecutivo que anota en bitácora de acuerdo con el Manual de Procedimientos (administrativo).
2. La Médica o el Médico Especialista en Patología realiza la identificación correcta del paciente de acuerdo con la acción esencial 1. Este código se encuentra integrado por la letra Q (quirúrgico) año, número consecutivo asignado previamente en bitácora y una letra mayúscula en caso de necesitar más de un cassette. **(Fig. 1)**
3. La Médica o el Médico Especialista en Patología coloca dentro del cassette la muestra biológica (Biopsia, cortes de piezas quirúrgicas, bloques celulares, muestreo obtenido de tejidos de procedimientos de autopsia) la cuál pone sustancia fijadora adecuada (Formol al 10%) y entrega muestras biológicas a la Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología.

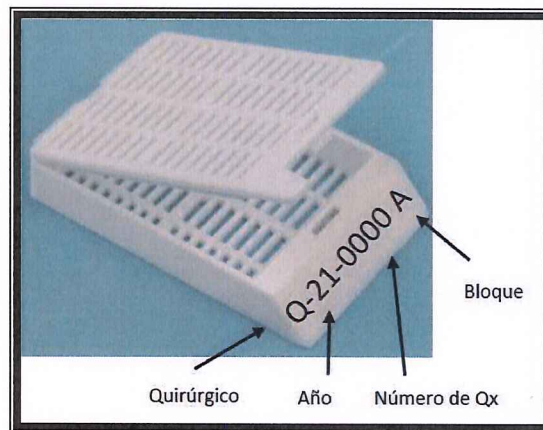


Fig. 1 Cassette para inclusión con número de quirúrgico asignado

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	24-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>1. Procedimiento Técnico para Realizar el Procesamiento e Inclusión de Muestras Biológicas en Parafina</b>		<b>HOJA:</b> 6 <b>DE:</b> 13

4. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología recibe los cassetes y coteja con lo anotado en las bitácoras correspondientes, de acuerdo con el Manual de Procedimientos (administrativo).
5. La Médica o el Médico Especialista de Patología coloca las cassetes de manera ordenada en la canastilla de inclusión en el recipiente No1 del procesador de tejidos (**Fig. 2**), que contiene formol al 10% y pone a funcionar el equipo en el programa No. 1 (este proceso se realiza durante la noche).

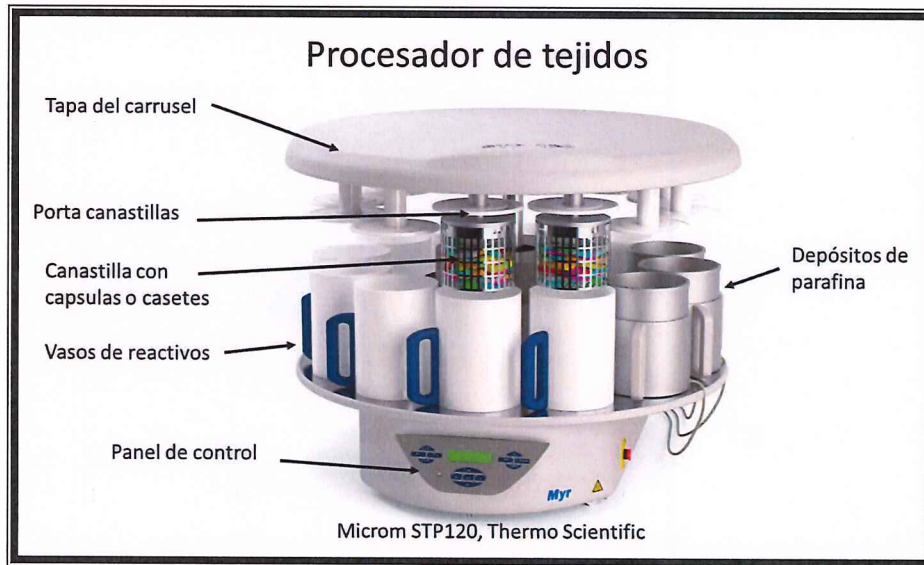


Fig. 2 Partes del procesador de tejidos (Microm STP120, Thermo Scientific)

I. Programa No. 1.

II. Descripción del procesamiento de tejidos.

Vaso	Reactivo	Tiempo	Agitación
1	Formol 1	1 hrs	Frecuente 1
2	Formol 2	1 hrs	Frecuente 1
3	Alcohol 96 1	1 hrs	Frecuente 1
4	Alcohol 96 2	1 hrs	Frecuente 1
5	Alcohol 96 3	1 hrs	Frecuente 1
6	Alcohol abs 1	1 hrs	Frecuente 1
7	Alcohol abs 2	1 hrs	Frecuente 1
8	Alcohol abs – Xilol	1 hrs	Frecuente 1
9	Xilol 1	1 hrs	Frecuente 1
10	Xilol 2	1 hrs	Frecuente 1
11	Parafina 1	1 hrs	Frecuente 1
12	Parafina 2	1 hrs	Frecuente 1

**CONTROL DE EMISIÓN**

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>1. Procedimiento Técnico para Realizar el Procesamiento e Inclusión de Muestras Biológicas en Parafina</b>		<b>HOJA:</b> 7  <b>DE:</b> 13

**Nota:** El proceso dura 12 hr. por lo que es importante iniciar el procesamiento de las muestras biológicas a más tardar a las 18 hr. para que la Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología continúe con el proceso al día siguiente (6 am). En fines de semana o días no hábiles, se programa el equipo con un protocolo diferente que incluye un diferimiento de inicio de 24, 48 o 72 hr según sea necesario.

6. Al término del proceso, la Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología extraerá los cassettes del vaso No. 12 (parafina 2, **Fig. 3**).



**Fig. 3** Equipo de inclusión en parafina (HistoStar, Thermo Scientific)

La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología coloca los cassettes en el tanque de tejidos del incluidor (HistoStar, Thermo Scientific) para iniciar el procedimiento de bloqueo o inclusión de parafina (**Fig. 4**).

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV:      01
	<b>1. Procedimiento Técnico para Realizar el Procesamiento e Inclusión de Muestras Biológicas en Parafina</b>		HOJA:     8  DE:        13

### INCLUSIÓN Y CORTE DE LOS TEJIDOS:

La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología realiza la inclusión de la muestra biológica, bloqueo y corte de los tejidos que se procesaron durante la noche.

Pasos para incluir las muestras biológicas en parafina:

1. Dosificar parafina en el molde.
2. Tomar la muestra biológica del cassette y colocarla en el molde.
3. Orientar la muestra biológica de manera adecuada.
4. Colocar el molde en la zona fría y esperar a que la parafina se vuelva transparente.
5. Volver a colocar el molde en la zona caliente y colocar el casete con el número de caso correspondiente.
6. Llenar el casete con parafina.
7. Transferir el casete y el molde a la zona fría, para que se enfríe rápidamente.
8. Separar el molde del casete cuando esté completamente frío y rebajar los bordes.

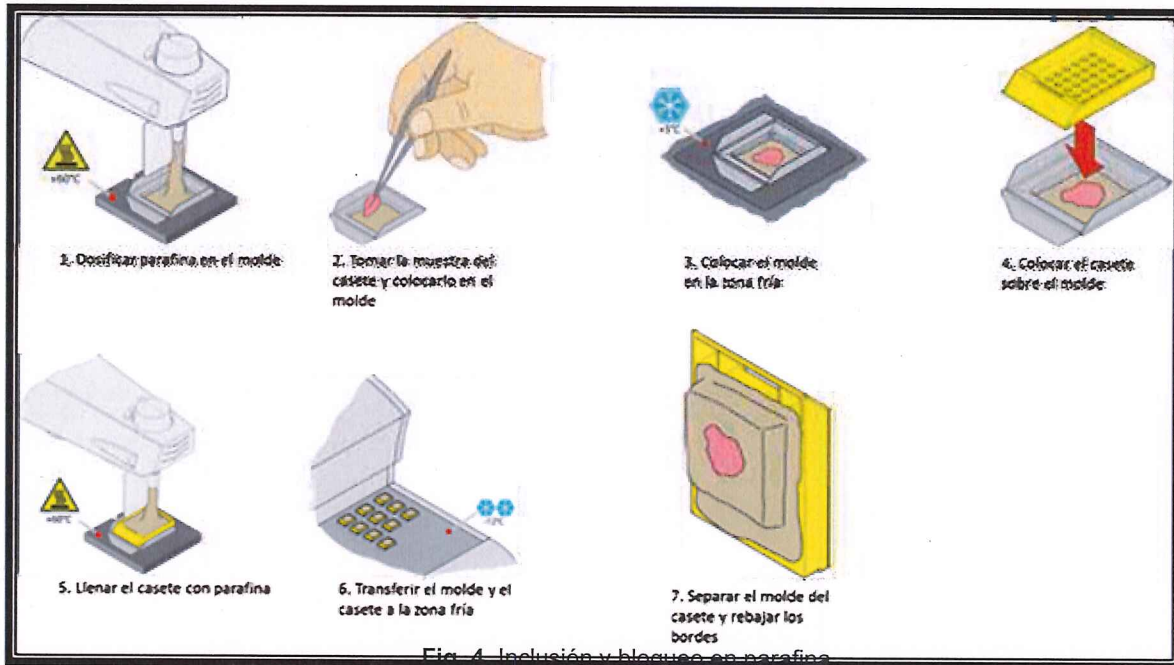



Fig. 4. Inclusión y bloqueo en parafina

### Inclusión y bloqueo en parafina

Se realiza en el equipo dispensador de parafina a unos grados por encima de su punto de fusión.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>1. Procedimiento Técnico para Realizar el Procesamiento e Inclusión de Muestras Biológicas en Parafina</b>		<b>HOJA:</b> 9  <b>DE:</b> 13

La Técnica o el Técnico del Laboratorio de Histotecnología sumergirá el tejido en moldes metálicos adecuados de acuerdo con el tamaño de la pieza a incluir para posteriormente colocar el cassette que sirve como soporte y dejar solidificar en la placa de enfriamiento.

### Impresión de laminillas:

La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología rotula las laminillas con el número de caso correspondiente, la tinción que se realizará (HE, PAS, MASSON, etc.) y la fecha en la que se está procesando.

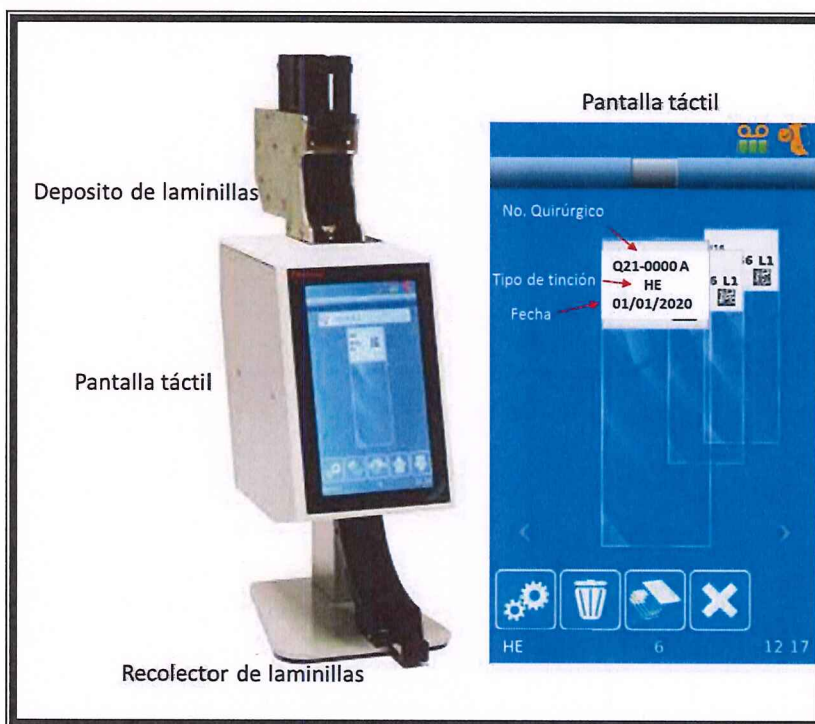




Fig. 5 Impresora de laminillas (SlideMate As, Thermo Scientific)

La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología elabora las etiquetas en la impresora SlideMateAS (Fig. 5) previo al corte de los bloques a utilizar, laminillas con cantos pulidos y banda mate o blanca.

Funcionamiento básico de la impresora de laminillas (SlideMate As, Thermo Scientific Fig. 6).

- I. Encender el equipo y en la pantalla principal ir a Settings  ⇒ Data ⇒ Templates ⇒ H-E.
- II. Seleccionar la pantalla blanca de la laminilla e insertar el número de caso e imprimir 

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>1. Procedimiento Técnico para Realizar el Procesamiento e Inclusión de Muestras Biológicas en Parafina</b>		<b>HOJA:</b> 10 <b>DE:</b> 13

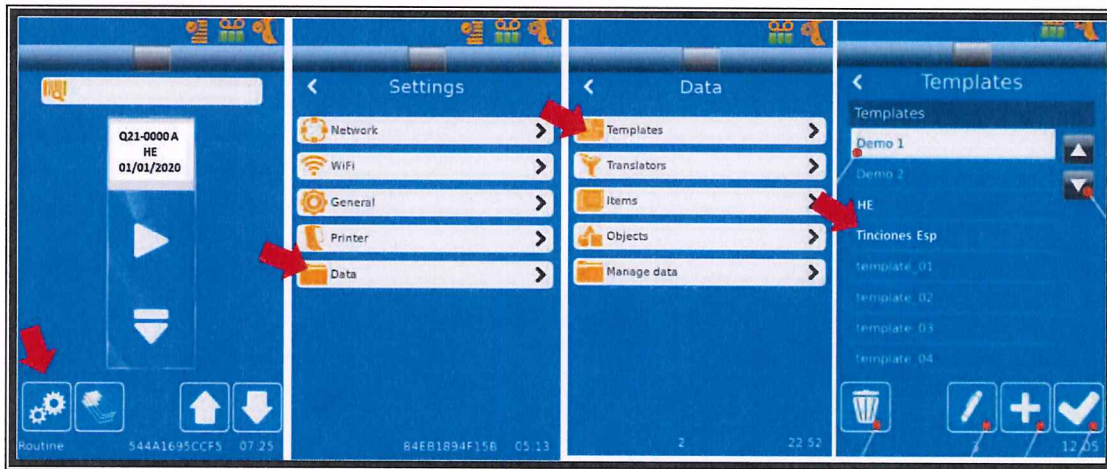


Fig. 6 Secuencia de impresión.

## CORTE DE LOS TEJIDOS

### Corte en micrótopo:

1. La Técnica o el Técnico del Laboratorio de Histotecnología corta las secciones de parafina de 3 a 4 micras de grosor (Fig.7).



Fig. 7 Micrótopo y corte de tejidos de 3 a 4 micras.

2. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología extiende en un baño de flotación a 45°C, las secciones de tejido previamente cortadas y recupera en una laminilla de vidrio previamente etiquetada con el número de caso Fig. 8.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV:      01
	<b>1. Procedimiento Técnico para Realizar el Procesamiento e Inclusión de Muestras Biológicas en Parafina</b>		HOJA:    11  DE:      13



Fig. 8 Corte en micrótopo y extender los tejidos en el baño de flotación.

**Desparafinar:**

1. La Técnica o el Técnico del Laboratorio de Histotecnología coloca los cortes en una canastilla la cual, coloca en una estufa.
2. Los cortes se dejan secar en el secador de laminillas a 70°C por 20 min previo a la tinción correspondiente.



Fig. 9 Secador de laminillas (RotorDry, Mopec)

La elaboración de esta técnica permite que las muestras biológicas continúen al proceso de tinción a fin de que las Médicas y Médicos Especialista de Patología realicen los diagnósticos anatomopatológicos que permitan determinar el diagnóstico y tratamiento de las Médicas y Médicos Especialistas tratantes de las personas beneficiarias.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>1. Procedimiento Técnico para Realizar el Procesamiento e Inclusión de Muestras Biológicas en Parafina</b>		<b>HOJA:</b> 12 <b>DE:</b> 13

## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

- I. -La estandarización del proceso permite la reproducibilidad de cada caso, lo que aumenta la sensibilidad y especificidad del proceso.
- II. -El uso de equipos permite disminuir el error humano.
- III. -Elevación de la calidad en los procesos.

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 Cantos pulidos:** El corte histológico se coloca en un portaobjetos de vidrio que después se coloca en el microscopio para observarse. Los cantos pulidos en los portaobjetos son los bordes lisos y libres de rebabas, lo que ayuda a prevenir riesgos e infecciones.
- 9.2 Casete o cápsula:** Sirven para la inclusión y la identificación de muestras de tejido durante los pasos de procesamiento, inclusión, corte y archivo. También se le conoce como cápsula de inclusión.
- 9.3 Desparafinar:** El desparafinado elimina el medio de inclusión, la parafina. El paso por agua de grifo es típico de la hematoxilina y se denomina diferenciación. Las sales del agua permiten obtener una coloración más violácea, en vez de púrpura. La deshidratación final es necesaria porque el medio de montaje no suele ser hidrosoluble.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Megías M, Molist P, Pombal MA. Atlas de Histotecnología vegetal y animal. <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>.

Fisher Scientific

Técnica Histológica. César Eduardo Montalvo Arenas. Agosto de 2010.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV: <b>01</b>
	<b>1. Procedimiento Técnico para Realizar el Procesamiento e Inclusión de Muestras Biológicas en Parafina</b>		HOJA: <b>13</b>  DE: <b>13</b>

### 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> <b>1</b>  <b>DE:</b> <b>28</b>

## 2. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR TINCIÓN BÁSICA Y ESPECIAL DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 2  <b>DE:</b> 28

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

El proceso de tinción permite que las moléculas de un colorante adhieran al espécimen y genere cambios conformacionales que cambian su afinidad tintorial. El uso de colorantes permite cambiar el color de las células de los microorganismos, tejidos, células sueltas y realizar la observación en microscopio óptico para determinar las enfermedades que aquejan a las personas beneficiarias.

## 2.0 OBJETIVO

Realizar la tinción básica y especial a las muestras biológicas en el microscopio óptico a fin de obtener diagnósticos anatomopatológicos que colaboren en el diagnóstico y tratamiento de las personas beneficiarias.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y servidores públicos de salud que participa en el procedimiento cuentan con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.

1. Médica o Médico Especialista en Patología.
2. Coordinador de Laboratorio de Histotecnología.
3. Técnica o Técnico de Laboratorio de Histotecnología.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1. Procesamiento con material histológico:
  - I. Procesador de tejidos (Microm STP120, Thermo Scientific).
  - II. Aparato de inclusión en parafina (HistoStar, Thermo Scientific).
  - III. Impresora de laminillas (SlideMate As, Thermo Scientific).
  - IV. Micrótomos.
  - V. Baño de flotación de tejidos (section flotation bath, Thermo Scientific).
  - VI. Secador de laminillas (RotorDry, Mopec).
  - VII. Horno (Boekel).
  - VIII. Centrifuga de mesa (Jouan).
  - IX. Refrigerador (Forma, Thermo Scientific).
  - X. Microondas para procesamiento histológico (KOS Rapid Microwave Labstation).
  - XI. Equipo de tinción automatizado (Gemini AS, Thermo Scientific).
  - XII. Microscopio óptico binocular.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA: 3</b>  <b>DE: 28</b>

2. Procesamiento con material citológico:
- I. Citocentrifuga Aerospray.
  - II. Citospin 4 Thermo Scientific.

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

El área de trabajo cuenta con extracción e inyección de aire acondicionado, lámparas de luz intensa, instalación hidráulica necesaria para quitar excedentes de colorantes y desechos, además de piso antiderrapante en cumplimiento a la norma oficial mexicana en relación a laboratorios clínicos, con presencia de curva sanitaria.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.  
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 4 <b>DE:</b> 28

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

### NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-004-STPS-1999, De protección y dispositivos de seguridad en la maquinaria y equipo que se utilice en los centros de trabajo.  
D.O.F. 31-V-1999

Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.  
D.O.F. 02-II-1999

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.  
D.O.F. 09-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA3-2012, Que establece las características mínimas en relación a infraestructura y equipamientos de laboratorios de Anatomía Patológica, hospitales y consultorios de atención médica especializada.  
D.O.F. 08-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-2014, Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral- Reconocimiento, evaluación y control.  
D.O.F. 28-IV-2014


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  
D.O.F. 09-X-2015.

Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.  
D.O.F. 27-I-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-133-SEMARNAT-2015, Protección ambiental-Bifenilos Policlorados (BPCs)-Especificaciones de manejo.  
D.O.F. 23-II-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.  
D.O.F. 21-II-2017

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 5  <b>DE:</b> 28

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

### Tinción básica de las muestras biológicas:

La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología realiza la tinción básica denominada Hematoxilina y Eosina de rutina, y/o tinciones especiales a todas las muestras biológicas procesadas, de acuerdo con lo solicitado por la Médica o el Médico Especialista en Patología.

Los pasos a seguir por la Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología son:

1. Desparafinación e hidratación de las muestras a procesar, previamente colocadas en portaobjetos
2. Hidratar en alcoholes descendentes hasta llegar a agua.
  - a. Xileno 2 x 10 min.
  - b. Etanol 100°/Xileno (v/v) 1 x 10 min.
  - c. Etanol 100° 1 x 10 min.
  - d. Etanol 96° 1 x 5 min.
  - e. Agua 1 x 2 min.

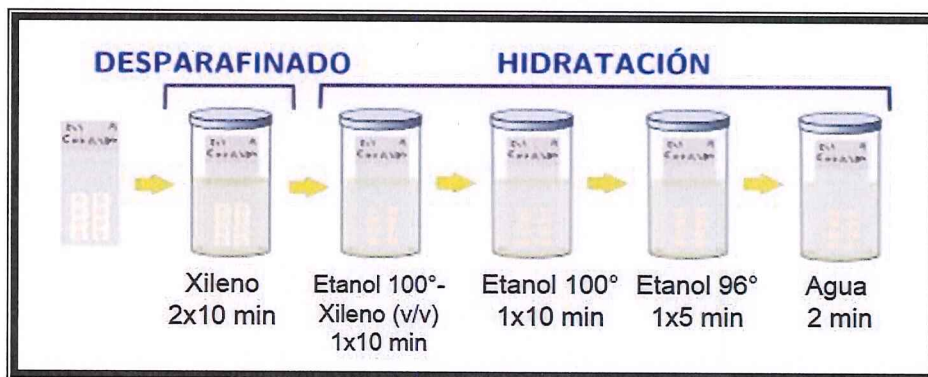


Fig. 10 Tren de desparafinación e hidratación

### Técnica de Hematoxilina Eosina:

La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología es responsable de realizar las siguientes actividades:

1. Una vez montado el tejido en el casete, se corta en el microtomo, se coloca en el portaobjetos y se procede a los siguientes pasos:
2. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada **Fig. 11**.
3. Colocar los cortes en Hematoxilina de Harris de 5-10 min.
4. Lavar en agua corriente.
5. Diferenciar en alcohol ácido 1% de 2 a 5 seg.
6. Lavar en agua corriente.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licón	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

7. Virar en agua amoniacal (litinada o de la llave).
8. Lavar en agua corriente.
9. Colocar los cortes en eosina alcohólica 1% de 1 a 5 min.
10. Utilizar Alcohol de 96° (cuando los elementos de tinción se contaminan, se desechan y se cambian).
11. Deshidratar, aclarar y montar las laminillas que contienen los tejidos.

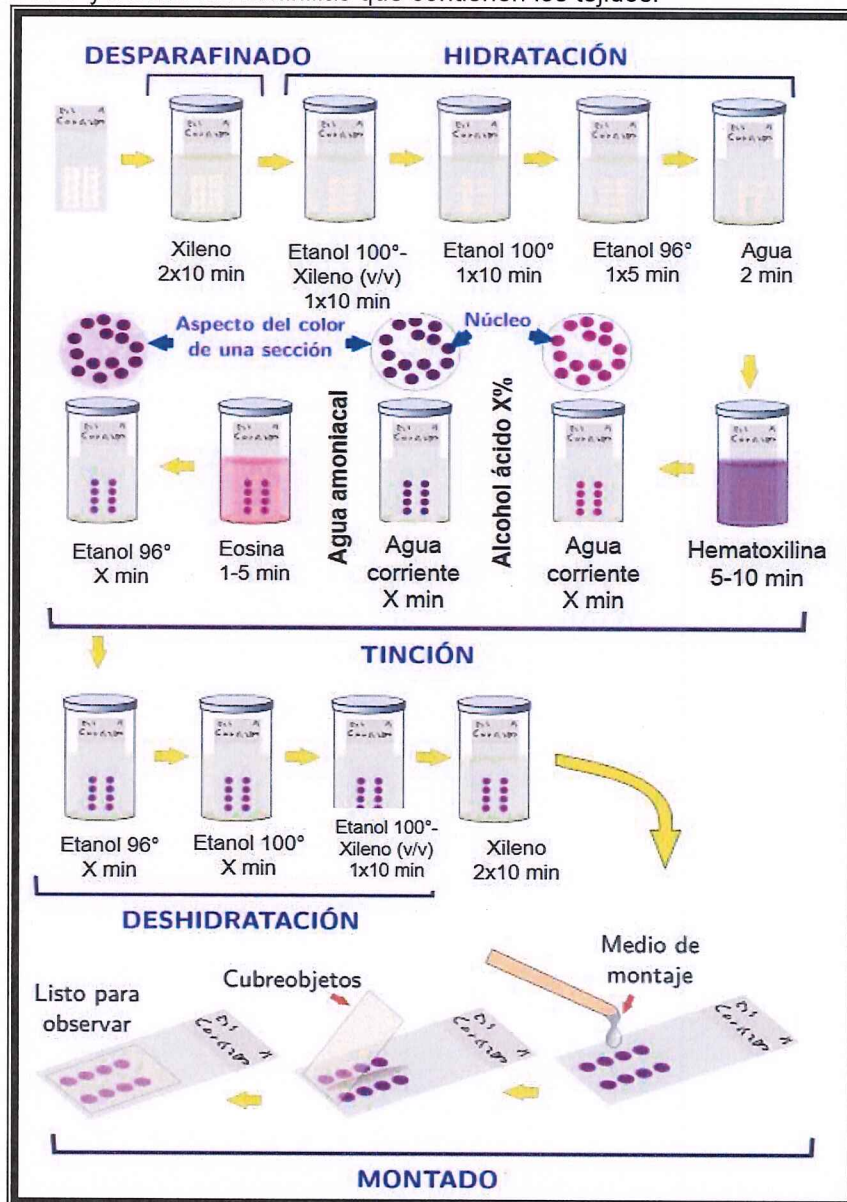


Fig. 11 Técnica de Hematoxilina y Eosina

**CONTROL DE EMISIÓN**

Elaboró:		Revisó:		Autorizó:	
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona		Dr. Raúl Rivera Moscoso	
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico		Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina	
Firma:					
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022		21-10-2022	

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 7 <b>DE:</b> 28

### Preparación de Soluciones

El Coordinador de Laboratorio de Histotecnología supervisa y otorga los reactivos necesarios para realizar las soluciones de cada tinción.

La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología prepara los reactivos para el proceso y coloca en orden en el equipo de tinción automatizada de tejidos.

La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología realiza las siguientes recomendaciones al momento de preparar los reactivos a usar en la tinción:

1. Se recomienda preparar esta solución en un matraz de 3000 ml de cuello largo.
2. Disolver la hematoxilina en el alcohol.
3. Calentar el agua a 60°C y agregar el sulfato, disolver.
4. Agregar la hematoxilina.
5. Llevar a punto de ebullición rápidamente, remover del fuego y agregar el óxido lentamente.
6. Recalentar al fuego hasta hervir por 2-3 min (hasta que tome color púrpura oscuro, remover del fuego y enfriar al chorro del agua).

Para la preparación de estos elementos de la tinción se necesitan los siguientes reactivos con sus respectivas cantidades:

#### Hematoxilina de Harris

- |   |        |
|---|--------|
| a. Hematoxilina                           | 5 g.   |
| b. Alcohol absoluto.                      | 50 ml. |
| c. Sulfato de aluminio y amonio (potasio) | 0.1 g. |
| d. Oxido rojo de mercurio.                | 2.5 g. |
| e. Aforar a 1000 ml.                      |        |

#### Eosina (solución stock)

- |                   |        |
|-------------------|--------|
| a. Eosina Y       | 1 g.   |
| b. Agua destilada | 20 ml. |
| c. Alcohol 96%    | 80 ml. |

#### Eosina Solución de trabajo

- |   |           |
|---|-----------|
| a. Eosina solución stock  | 1 parte.  |
| b. Alcohol 80%  | 3 partes. |
| c. Agregar antes de usar 0.5 ml de ácido acético por cada 100 ml de solución. |           |

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA: 8</b>  <b>DE: 28</b>

### Alcohol ácido

- |                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| a. Ácido clorhídrico concentrado | 1 ml.  |
| b. Alcohol etílico 70%           | 99 ml. |

Una vez concluido el proceso de tinción básica, la Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología ordena las laminillas por números consecutivos, verifica que los casos se encuentren completos y entrega al Coordinador del Laboratorio de Histotecnología para revisar la calidad del trabajo.

Después de revisada la integración del material, orden de casos y calidad de tinción el Coordinador de Laboratorio de Histotecnología avala la entrega del material a la Médica o Médico Especialista en Patología.

La Médica o el Médico Especialista en Patología verifica la entrega del material y procede a revisión en el microscopio óptico.

### Resultados:

Núcleos de color violeta (hematoxilina) y el citoplasma de color rosa (eosina).

### TINCIONES ESPECIALES:

Son técnicas de tinción histológicas que identifican estructuras específicas en los tejidos, según el agente infeccioso, la forma de agrupación, daño que provocan en otras estructuras como son vasos sanguíneos, tejido intersticial, etc.

Estas tinciones especiales se realizan por las Técnicas y los Técnicos de Laboratorio de Histotecnología, bajo supervisión del Coordinador de Laboratorio de Histotecnología.

Similar a la tinción de Hematoxilina y Eosina, se proporcionan las soluciones o reactivos químicos necesarios para cada una de las diferentes tinciones especiales las cuáles requieren los siguientes elementos y cantidades:

### Técnica de PAS (Reacción del Ácido Peryódico-Reactivo de Schiff).

1. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología corta el tejido en el microtomo y lo coloca en un portaobjetos y procede a desparafinar e hidratar hasta agua destilada **Fig. 10**.
2. Oxidar en ácido peryódico al 0.5% de 5 a 10 min.
3. Lavar en agua destilada (3 cambios).
4. Tratar con reactivo de Schiff de 5 a 10 min (revisar que el tejido tome un color fucsia).
5. Lavar en agua corriente.
6. Contrastar con Hematoxilina de Harris.
7. Lavar en agua corriente.
8. Decolorar en con alcohol acido al 1%.
9. Lavar en agua corriente.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

10. Deshidrata, aclarar, montar todas las laminillas que se encuentran en proceso de tinción.

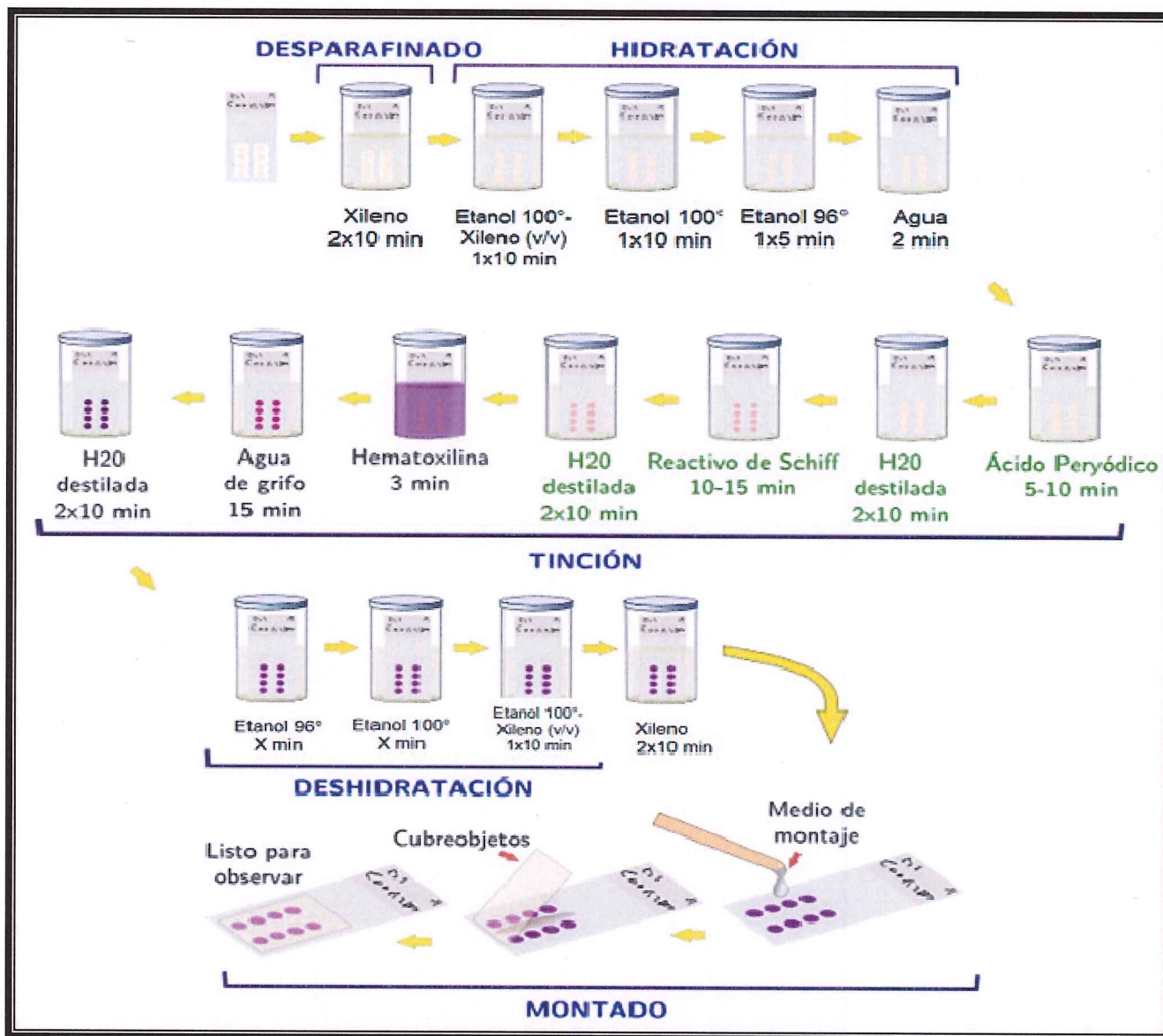


Fig. 12 Técnica de PAS (Reacción del Ácido Peryódico-Reactivo de Schiff).

**CONTROL DE EMISIÓN**

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA: 10</b>  <b>DE: 28</b>

**Preparación de Soluciones:**

La Técnica o el Técnico del Laboratorio de Histotecnología realiza el siguiente proceso para preparar los reactivos de la tinción:

**Reactivo de Schiff (McManus, 1946)**

- |                             |        |
|-----------------------------|--------|
| a. Fucsina básica           | 1 g.   |
| b. Metabisulfito de potasio | 2 g.   |
| c. Ácido Clorhídrico (37%)  | 2 ml.  |
| d. Carbón activado          | 0.2 g. |

1. Disolver 1 g. de fucsina básica en 200 ml. de agua destilada caliente a punto de ebullición.
2. Retirar del calor, dejar enfriar a 50°C.
3. Agregar 2 g de metabisulfito de potasio y agitar.
4. Dejar enfriar a temperatura ambiente, agregar 2 ml de ácido clorhídrico, mezclar y dejar reposar.
5. Agregar carbón activado 0.2 g, agitar por 3 min y filtrar con papel Whatman No. 1 (la solución tiene que ser clara o ligeramente amarillenta).
6. Guardar en frasco ámbar en el refrigerador a 4°C.

**Resultados**

Mucopolisacaridos, mucinas, membranas basales, coloide y hongos en rojo magenta.

La Técnica o el Técnico del Laboratorio de Histotecnología es responsable de realizar las siguientes actividades:

**Técnica de PAS – Diastasa**

1. Cortar el tejido y lo coloca en el portaobjetos, desparafina e hidrata hasta agua destilada **Fig. 10** (incluir una laminilla con un control).
2. Tratar las laminillas con la solución de diastasa al 1% una hora a 37°C.
3. Lavar en agua corriente de 5-10 min.
4. Oxidar con ácido periódico al 0.5%
5. Lavar en agua destilada 3 cambios.
6. Tratar con reactivo de Schiff de 5-10 min.
7. Lavar con agua destilada 3 cambios.
8. Lavar con agua corriente.
9. Contrastar con hematoxilina.
10. Deshidratar, aclarar, montar y evaluar todas las laminillas con las muestras biológicas sometidas a tinción.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 11  <b>DE:</b> 28

### Preparación de Soluciones

#### Diastasa (amilasa) 1%

- a. Diastasa 1 g.
- b. Agua destilada 100 ml.
- c. Filtrar esta mezcla antes de utilizar.

### Resultados:

El glucógeno (mucopolisacarido simple) desaparece.

### Técnica Tricromica de Masson:

Fijación en formol buffer:

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
2. Mordentar en Bouin por una hora a 56°C.
3. Lavar en agua corriente hasta que desaparezca el color amarillo.
4. Lavar en agua destilada.
5. Teñir en Hematoxilina férrica de Weigert por 10 min.
6. Lavar en agua corriente por 10 min.
7. Lavar en agua destilada.
8. Teñir en Fucsina-Escarlata 5 min.
9. Lavar en agua destilada.
10. Tratar en ácido fosfomolibdico - fosfotungstico de 10 min.
11. Teñir en azul de anilina o verde luz por 5 min.
12. Lavar en agua destilada.
13. Tratar con ácido acético al 1% de 3 a 5 min.
14. Deshidratar, aclarar, montar y evaluar todas las laminillas con las muestras sometidas a tinción.

### Preparación de Soluciones:

#### Escarlata de Biebrich-fucsina ácida

- a. Escarlata de Biebrich solución acuosa al 1% 90 m.l
- b. Fucsina ácida acuosa al 1% 9 ml.
- c. Ácido acético glacial 1 ml.

#### Ácido fosfomolibdico - fosfotúngstico

- a. Ácido fosfomolibdico 5 g.
- b. Ácido fosfotúngstico 5 g.
- c. Agua destilada 100 ml.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

**SALUD**

SECRETARÍA DE SALUD



# MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS

## Departamento de Patología

### 2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas


 INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

 CÓDIGO:  
M.T./ 0.2.4.2

REV: 01

HOJA: 12

DE: 28

#### Solución de Bouin

- |   |         |
|---|---------|
| a. Acido pícrico solución acuosa saturada | 750 ml. |
| b. Formalina 37-40%                       | 250 ml. |

#### Azul de anilina al 2%

- |                          |         |
|--------------------------|---------|
| a. Azul de anilina       | 2 g.    |
| b. Ácido acético glacial | 2 ml.   |
| c. Agua destilada        | 100 ml. |

#### Hematoxilina férrica de Weigert

##### Solución A

- |                             |         |
|-----------------------------|---------|
| a. Hematoxilina (cristales) | 1 g.    |
| b. Alcohol 96°              | 100 ml. |

##### Solución B

- |                          |        |
|--------------------------|--------|
| a. Cloruro férrico 29%   | 4 ml.  |
| b. Ácido clorhídrico 37% | 1 ml.  |
| c. Agua destilada        | 95 ml. |

#### Solución de trabajo

Partes iguales de solución A y solución B

#### Resultados:

Colágeno tipo I en azul oscuro, tipos III y IV en azul claro. Mucina en verde o azul, núcleos en negro, queratina y musculo liso en rojo.

#### TÉCNICA TRICRÓMICA DE GOMORI:

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada **Fig. 10**
2. Tratar con solución de Bouin a 56°C por una hora.
3. Lavar en agua corriente hasta quitar el color amarillo.
4. Teñir en hematoxilina férrica por 10 min.
5. Lavar en agua corriente por 5 min.
6. Teñir en solución tricrómica de Gomori de 5 a 10 min.
7. De 5 a 10 baños de agua destilada.
8. Tratar con ácido acético al 0.5% de 1 a 2 min.
9. Deshidratar, aclarar, montar y evaluar todas las laminillas con las muestras sometidas a tinción.

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 13 <b>DE:</b> 28

**Preparación de Soluciones:**

**Solución de Bouin** (previamente descrito)

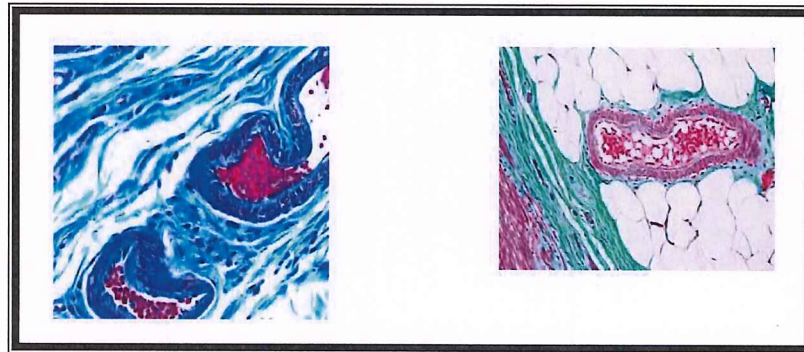
**Hematoxilina férrica de Weigert** (previamente descrito)

**Solución tricrómica**

- |                          |         |
|--------------------------|---------|
| a. Cromotropo 2R         | 0.6 g.  |
| b. Light Green           | 0.3 g.  |
| c. Ácido fosfotúngstico  | 0.8 g.  |
| d. Ácido acético glacial | 1 ml.   |
| e. Agua destilada        | 100 ml. |

**Resultado:**

Núcleos en negro, colágena en verde y músculo en rojo.



**Técnica de VAN-GIESON:**

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada
2. Teñir con hematoxilina férrica de 5 a 10 min.
3. Lavar en agua destilada.
4. Teñir con la solución de Van-Gieson de 1 a 3 min.
5. Deshidratar, aclarar, montar y evaluar todas las laminillas con las muestras sometidas a tinción.

**Preparación de Soluciones:**

**Solución de Van Gieson**

- |   |        |
|---|--------|
| a. Fucsina ácida acuosa al 1%             | 1 ml.  |
| b. Ácido pícrico solución acuosa saturada | 99 ml. |

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 14 <b>DE:</b> 28

**Solución saturada de ácido pícrico**

- |                   |         |
|-------------------|---------|
| a. Ácido pícrico  | 1.2 g.  |
| b. Agua destilada | 100 ml. |

**Hematoxilina férrica de Weigert** (previamente descrita).

**Resultado:**

Núcleos en negro, colágena en rojo, otros tejidos en amarillo.

**Técnica de RETICULO DE WILDER:**

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
2. Oxidar en ácido fosfomolibdico al 10% por 1 min.
3. Lavar abundantemente en agua corriente.
4. Sensibilizar en nitrato de uranio al 1% por 1 min.
5. Lavar en agua destilada varios cambios.
6. Impregnar en plata amoniaca por 1 min.
7. Un baño rápido en agua destilada.
8. Solución reductora por 1min. (cambiar la solución cada vez que se realiza esta técnica).
9. Lavar en agua destilada.
10. Tratar en cloruro de oro 1:500 por 1min y observar al microscopio.
11. Lavar en agua destilada.
12. Tiosulfato de sodio al 5% por 1 min.
13. Lavar en agua.
14. Contrastar con rojo nuclear rápido (kernechtrott).
15. Deshidratar, aclarar, montar y evaluar todas las laminillas con las muestras sometidas a tinción.

**Preparación de Soluciones:**

**Plata amoniaca.**

- |   |        |
|---|--------|
| a. Nitrato de Plata acuoso al 1.2%          | 5 ml.  |
| b. Hidróxido de Sodio al 3.1%               | 5 ml.  |
| c. Hidróxido de amonio (según se requiera). |        |
| d. Aforar con agua destilada a              | 50 ml. |

1. A 5 ml de Nitrato de Plata acuoso al 1.2% agregar Hidróxido de Amonio gota a gota hasta que el precipitado se disuelva.
2. Agregar 5 ml de hidróxido de sodio al 3.1% (la solución tiene que ~~debe~~ quedar poco turbia).
3. Aforar a 50 ml con agua destilada.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 15 <b>DE:</b> 28

**Solución reductora.**

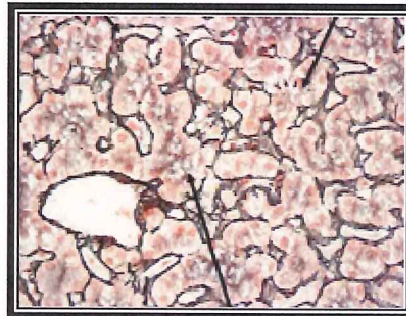
- |                            |         |
|----------------------------|---------|
| a. Formalina al 40%        | 0.5 ml. |
| b. Nitrato de uranio al 1% | 1.5 ml. |
| c. Agua destilada          | 50 ml.  |

**Nota:**

Aproximadamente de 5 a 7 laminillas pueden ser tratadas con la solución de plata amoniaca; después, la solución cambia. Si se sobreexponen los cortes en el cloruro de oro, aparecerán las fibras rojas.

**Resultado:**

Fibras reticulares negro.



**Técnica de GORDON AND SWEET:**

- Desparafinar e hidratar hasta agua destilada **Fig 10**.
- Oxidar en Permanganato de Potasio por 3 min.
- Lavar en agua corriente.
- Decolorar en ácido oxálico al 1%.
- Lavar en agua destilada.
- Tratar con Alumbre de hierro al 2.5% por al menos 15 min.
- Lavar con varios cambios de agua destilada.
- Impregnar en plata amoniaca por 2 min.
- Lavar con varios cambios de agua destilada.
- Reducir en formalina al 10% por 2 min.
- Lavar en agua corriente por 2 min.
- Diferenciar en Cloruro de Oro al 2%.
- Lavar en agua destilada.
- Fijar en Tiosulfato de Sodio al 5% por 5 min.
- Lavar en agua destilada.
- Revisar la tinción al microscopio.
- Contrastar con rojo nuclear.
- Deshidratar, aclarar, montar y evaluar todas las laminillas con las muestras sometidas a tinción.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 16 <b>DE:</b> 28

### Preparación de Soluciones

#### Permanganato de potasio acidificado

- |                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| a. Permanganato de potasio 0.5% | 95 ml. |
| b. Ácido sulfúrico              | 5 ml.  |

#### Solución de Plata

- |                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| a. Nitrato de plata acuosa 10%        | 5 ml.  |
| b. Hidróxido de sodio 3%              |        |
| c. Hidróxido de Amonio                |        |
| d. Agua destilada (cuanto baste para) | 50 ml. |

1. A 5 ml de nitrato de plata acuosa al 10% adicionar gota a gota hidróxido de amonio hasta que se disuelva completamente cualquier precipitado.
2. Adicionar 5 ml de hidróxido de sodio al 3% y agregar gota a gota hidróxido de amonio hasta disolver completamente.
3. Completar el volumen a 50 ml.

#### Nota:

Si se agrega mucho hidróxido de amonio se puede perder la sensibilidad.

#### Ácido Oxálico al 2 %

- |                   |         |
|-------------------|---------|
| a. Acido oxálico  | 2 g.    |
| b. Agua destilada | 100 ml. |

#### Alumbre de hierro 4%

- |                              |         |
|------------------------------|---------|
| a. Sulfato de amonio férrico | 4 g.    |
| b. Agua destilada            | 100 ml. |

#### Formalina al 10%

- |                   |        |
|-------------------|--------|
| a. Formaldehido   | 10 ml. |
| b. Agua destilada | 90 ml. |

#### Cloruro de Oro al 0.2%

- |   |         |
|---|---------|
| a. Cloruro de oro (tetraclorurato de Sodio) | 0.2 g.  |
| b. Agua destilada                           | 100 ml. |

Almacenar en refrigerador protegido de la luz.

#### Tiosulfato de sodio 2%

- |                        |         |
|------------------------|---------|
| a. Tiosulfato de sodio | 2 g.    |
| b. Agua destilada      | 100 ml. |

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 17 <b>DE:</b> 28

### Rojo nuclear rápido (kernechtrott)

1. Disolver 0.1 g de rojo nuclear rápido en 100 ml de sulfato de aluminio al 5% calentando gradualmente hasta punto de ebullición.
2. Enfriar con placa fría, filtrar con papel filtro y agregar 1g de timol.

#### Resultado:

Fibras reticulares en negro, núcleos rojos.

#### TÉCNICA VERHOEFF:

1. Desparafinar e hidratar las laminillas que contienen un corte histológico previamente colocado en un portaobjetos.
2. Tratar con la solución de trabajo (previamente descrito) de 15 a 30 min.
3. Lavar en agua corriente.
4. Diferenciar en cloruro férrico al 2%, controlar al microscopio hasta que las fibras elásticas se observen negras sobre un fondo gris.
5. Lavar en agua corriente.
6. Lavar en alcohol del 96%.
7. Contrastar si se solicita con Van Gieson o eosina.
8. Deshidratar, aclarar, montar y evaluar todas las laminillas con las muestras sometidas a tinción.

#### Preparación de Soluciones

##### Hematoxilina de Verhoeff

- |                        |        |
|------------------------|--------|
| a. Hematoxilina 10%    | 25 ml. |
| b. Alcohol absoluto    | 25 ml. |
| c. Cloruro férrico 10% | 25 ml. |

##### Yodo Verhoeff

- |                      |         |
|----------------------|---------|
| a. Yodo              | 2 g.    |
| b. Yoduro de potasio | 4 g.    |
| c. Agua destilada    | 100 ml. |

#### Solución de trabajo:

- |  |        |
|--|--------|
| a. Solución a                                | 20 ml. |
| b. Solución b                                | 8 ml.  |
| c. Solución c                                | 8 ml.  |
| d. Agregar en orden (a, b, c), mezclar bien. |        |

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 18  <b>DE:</b> 28

**Nota:**

En algunos casos si se tratan los cortes previamente con permanganato de potasio al 0.5%, seguido de ácido oxálico al 5%, se logra una mejor demostración de las fibras elásticas.

**Resultados:**

Fibras elásticas azul oscuro o negro; núcleos azules a negro; fibras colágenas rojo y otros elementos tisulares amarillo.

**TÉCNICA ALDEHIDO FUCSINA:**

1. Desparafinar e hidratar los cortes histológicos previamente colocados en un portaobjetos.
2. Oxidar en permanganato de potasio a 11% por 5 min.
3. Lavar en agua corriente.
4. Blanquear en ácido oxálico al 1%.
5. Lavar en agua corriente.
6. Lavar en alcohol del 70%
7. Tratar con aldehído fucsina por 15 min.
8. Lavar bien en alcohol del 70%.
9. Lavar en agua corriente.
10. Contrastar si se desea.
11. Deshidratar, aclarar, montar y evaluar todas las laminillas con las muestras sometidas a tinción.

**Solución colorante:**

- a. Disolver 1 g. de fucsina bifásica en 100 ml de alcohol del 70%.
- b. Filtrar y agregar 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y 2 ml de paraldehído.
- c. Dejar reposar a temperatura ambiente por dos días para madurar (la solución de roja cambia a púrpura).
- d. La solución se toma de rojo a púrpura.
- e. Refrigerar. a 4°C dura varias semanas.

\*Se recomienda el siguiente contraste: (páncreas):

- |                         |         |
|-------------------------|---------|
| a. Light green          | 200 mg. |
| b. Orange G             | 1 g.    |
| c. Ácido fosfotúngstico | 500 mg. |
| d. Ácido acético        | 1 ml.   |
| e. Agua destilada       | 100 ml. |

**Resultado:**

Fibras elásticas-azul púrpura. También tiñe células de páncreas, algunos hongos gránulos del cél. Cebadas, y con alguna modificación, inclusive virales de hepatitis B.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA: 19</b>  <b>DE: 28</b>

**Técnica Retyes mota (soluciones):**

**Solución I**

a. Agua destilada	30 ml.
b. Formal 10%	10 ml.
c. Ácido acético	20 gotas.
d. Carbol-fucsina	25 gotas.

**Solución II**

a. Agua destilada	30 ml.
b. Formal 10%	10 ml.
c. Ácido acético	20 gotas.

**Picrocarmín de índigo**

a. Carmín de índigo al 1%	1 parte.
b. Acido pícrico sol. Saturada	2 partes.

**Procedimiento:**

1. Desparafinar e hidratar las laminillas que contienen un corte histológico previamente colocado en un portaobjetos.
2. Mordentar en cloruro de oro al 1 x500 12 horas a temperatura ambiente o 1.
3. Tratar con tiosulfato de sodio al 5% 3 min.
4. Lavar en agua corriente.
5. Solución I por 15 min.
6. Diferenciar en solución II, controlando al microscopio hasta diferenciar las fibras.
7. Lavar en agua destilada.
8. Contrastar con picrocarmín de índigo de 5 a 10 min., escurrir el exceso de colorante.
9. Deshidratar, aclarar, montar y evaluar todas las laminillas con las muestras sometidas a tinción.

**Resultado:**

Fibras elásticas- rojo

**Técnica Gram (demostración de bacterias en frotis)**

1. Fijar el frotis seco al calor de una flama, pasándolo 3 veces.
2. Teñir con cristal violeta a 11% por 15 segundos, escurrir el colorante.
3. Cubrir con lugol por 30 segundos, escurrir.
4. Decolorar con acetona por 3-5- segundos, lavar con agua.
5. Contrastar con carbol-fucsina diluida por 29 segundos.
6. Lavar en agua y dejar secar.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 20 <b>DE:</b> 28

**Resultado:**

Organismos Gram positivos azul-negro.  
Organismos Gram negativos rojo.

**TÉCNICA GRAM BROWN-BRENN:**

**Soluciones:**

- a. Cristal violeta al 1 % . iodo de Gram.
- b. Bicarbonato de sodio al 5% eter-acetona.
- c. Fucsina básica al 0.25% (sol. Stock).
- d. Fucsina básica solución de trabajo
- e. Acetona-ácido pícrico.
- f. Acido pícrico 0.1 g.
- g. Solución stock 10 ml.
- h. Acetona 100 ml.
- i. Agua destilada 100ml.
- j. Acetona-Xilol a partes iguales.
- k. Azul negro rojo.

**Procedimiento**

1. Usar laminilla-testigo.
2. Desparafinar e hidratar.
3. Colocar las laminillas sobre un soporte (sargento).
4. Cubrir los cortes con cristal violeta (20 gotas) y agregar 5 gotas de bicarbonato de sodio por 1 min. Agregar (soplando con una pipeta).
5. Si se prefiere se pueden mezclar las dos soluciones antes de usar.
6. Lavar con agua corriente.
7. Cubrir los cortes con iodo de Gram por 1 min
8. Lavar con agua corriente y secar con papel filtro.
9. Decolorar con eter-acetona gota a gota hasta que ya no escurra colorante.
10. Fucsina básica solución de trabajo por 1 min.
11. Lavar con agua, escurrir sin dejar secar.
12. Sumergir en acetona para iniciar la diferenciación.
13. Diferenciar en ácido pícrico-acetona hasta que los cortes se vean amarillo rosado.
14. Lavar rápidamente en acetona, luego en acetona-xilol.
15. Aclarar en xilol y montar.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 21 <b>DE:</b> 28

**TÉCNICA ZIEL NEELSEN (modificada):**

**Soluciones:**

- |   |         |
|---|---------|
| a. Carbol fucsina.                                      |         |
| b. Fucsina básica                                       | 0.5 g.  |
| c. Alcohol absoluto                                     | 5 mil.  |
| d. Cristales de fenol fundidos                          | 2.5 ml. |
| e. Agua destilada                                       | 50 ml.  |
| f. Filtrar antes de usar.                               |         |
| g. Alcohol ácido al 1% en alcohol del 70%               |         |
| h. Ácido clorhídrico concentrado                        | 1 ml.   |
| i. Alcohol etílico del 70%                              | 100 ml. |
| j. Azul de metileno al 0.25% en el ácido acético al 1%. |         |

**Procedimiento:**

1. Desparafinar e hidratar los portaobjetos que contienen las muestras previamente cortadas.
2. Carbol fucsina por 30 minutos a 60°C.
3. Lavar bien en agua corriente.
4. Decolorar las laminillas en alcohol-ácido, hasta que los cortes se vean rosa pálido.
5. Lavar en agua corriente abundantemente.
6. Contrastar en azul de metileno o verde brillante al 0.2%.
7. Lavar las laminillas con agua corriente.
8. Deshidratar, aclarar y montar las laminillas que se están procesando con esta tinción.

**Resultado:**

Bacilos alcohol ácido resistentes. Rojo púrpura.

**TÉCNICA FITE FARACO:**

**Soluciones:**

- a. Xilol-aceite (cacahuete o ajonjolí).
- b. Carbol fucsina.
- c. Ácido sulfúrico al 1%.
- d. Azul de metileno al 0.25% en ácido acético al 1% o verde brillante 0.2%.

**Procedimiento:**

1. Desparafinar los portaobjetos que tienen las muestras previamente colocadas de tejidos en un cambio de xilol, seguido de un cambio de xilol-aceite.
2. Escurrir, secar con papel filtro.
3. Carbol-fucsina por 30 min.
4. Lavar en agua corriente por 3 min.
5. Diferenciar las laminillas individualmente en ácido sulfúrico hasta que los corte se vean rosa pálido, aproximadamente un minuto.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 22 <b>DE:</b> 28

6. Lavar en agua corriente por un minuto.
7. Contrastar ligeramente en azul de metileno.
8. Lavar en agua corriente hasta que identificar el viraje de la solución.
9. Secar al aire por aproximadamente 2 minutos.
10. Sumergir en xilol las laminillas con las muestras y montar con resina.

**Resultado:**

Bacilos mycobacterium leprae-rojo púrpura.

**TÉCNICA GROCOTT:**

**Soluciones:**

- |                        |                         |
|------------------------|-------------------------|
| a. Acido crómico al 4% | Nitrato de plata al 5%. |
| b. Metenamina al 3%    | Bórax al 5%.            |

**Solución stock de plata metenemina.**

- |                           |         |
|---------------------------|---------|
| a. Nitrato de plata al 5% | 5 ml    |
| b. Metenamina al 3%       | 100 ml. |

1. Después de mezclar las soluciones, se forma un precipitado blanco que se disuelve inmediatamente al agitar.
2. La solución permanece estable por meses en el refrigerador. Esta solución se puede reutilizar en varias ocasiones dependiendo el número de casos y laminillas que se lleven a cabo.

**Solución de trabajo:**

- |                   |        |
|-------------------|--------|
| a. Solución stock | 25 ml. |
| b. Agua destilada | 25 ml. |
| c. Boráx al 5%    | 2 ml.  |

Preparar antes de usar.

Bisulfito de sodio al 1%, Cloruro de oro al 0.2%, tiosulfato de sodio al 2%, Light green al 0.2%.

**Procedimiento:**

USAR LAMINILLA TESTIGO.

1. Desparafinar e hidratar.
2. Oxidar en ácido crómico por una hora.
3. Lavar en agua corriente.

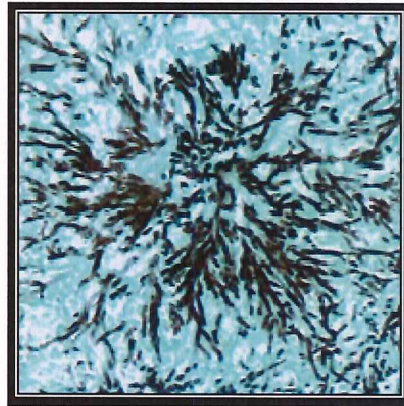
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 23 <b>DE:</b> 28

4. Bisulfito de sodio por 1 min.
5. Lavar en agua corriente por 5 min.
6. Lavar en agua destilada, tres o cuatro cambios.
7. Impregnar en plata metenamina en el horno a 60°C por 1 hora o hasta que los cortes tomen un color tabaco claro.
8. Lavar en agua destilada, seis cambios.
9. Tratar en cloruro de oro por 2-5 min.
10. Lavar en agua destilada
11. Tratar con tiosulfato de sodio por 5 min.
12. Lavar en agua corriente.
13. Contrastar con light green por 30-40 segundos.
14. Deshidratar y aclarar las muestras trabajadas para posteriormente montar con resina.

**Resultado:**

Hongo: negro    Núcleos: negro    Citoplasma color verde.



**TÉCNICA GENTA;**

**Demostración de Helicobacter pylori.**

**Soluciones:**

- a. Nitrato de uranio al 1%.
- b. Nitrato de palta al 1%.
- c. Gum mastic al 2.5% en alcohol absoluto.
- d. Hidroquinona al 2%.
- e. Nitrato de plata al 0.04%.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA: 24</b>  <b>DE: 28</b>

**Solución reductora:**

- |                              |         |
|------------------------------|---------|
| a. Gum mastic al 2.5         | 10 ml.  |
| b. Hidroquinona al 2%        | 25 ml.  |
| c. Alcohol absoluto          | 5 ml.   |
| d. Nitrato de plata al 0.04% | 2.5 ml. |

\*No filtrar este preparado.

**Procedimiento:**

- Desparafinar e hidratar los portaobjetos hasta agua destilada.
- Sensibilizar en nitrato de uranio al 11% por 3 minutos.
- Lavar en agua destilada.
- Calentar el Nitrato de plata al 1% en horno de microondas, en baño María por 1 minuto (evitar que hierva).
- Lavar en agua destilada.
- Lavar dos veces en alcohol etílico del 96°.
- Lavar dos veces en alcohol absoluto.
- Gum mastic al 2.5% por 5 minutos.
- Secar al aire por 1 minuto.
- Lavar dos veces en agua destilada.
- Colocar en solución reductora en baño María a 45°C por 30-40 minutos.
- Revisar periódicamente al microscopio.
- Lavar en agua corriente.
- Azul anciano pH 2.5 por 10 minutos.
- Lavar en agua corriente.
- Hematoxilina de Harris por 5 minutos.
- Lavar con agua corriente hasta aclarar las muestras.
- Diferenciar en alcohol-ácido.
- Lavar en agua corriente.
- Virar en agua amoniacal al 0.25%.
- Lavar en agua corriente (paso rápido).
- Pasar las laminillas a Eosina por 5 minutos.
- Lavar en agua corriente (paso rápido).
- Deshidratar, aclarar, evaluar la tinción y cubrir con cubreobjetos y resina.

**Resultados:**

Helicobacter pylori-negro.  
Metaplasia intestinal-azul-violaceo.  
Neutròfilos -rosado.  
Gránulos de eosinófilos-anaranjado brillante.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA: 25</b>  <b>DE: 28</b>

### TÉCNICA WARTHIN STARRY:

#### Soluciones:

Agua acidulada:

- a. Agua tridestilada 1000 ml.
- b. Ácido cítrico al 1%.
- c. Agregar hasta lograr un ph de 4.0, con esta agua se preparan las siguientes soluciones:
- d. Nitrato de plata al 1%.
- e. Nitrato de plata al 2%.
- f. Gelatina al 5%.
- g. Hidroquinona al 0.15%.
- h. Solución reveladora:
- i. Nitrato de plata al 2% 1.5 ml.
- j. Gelatina al 5% 3.75% ml.
- k. Hidroquinona 2 ml.

#### \*Preparar justo antes de usar.

Estos reactivos permiten su uso únicamente una vez, después de realizar la tinción se desecha.

#### Procedimiento:

1. Desparafinar e hidratar las laminillas con las muestras hasta agua destilada.
2. Impregnar en nitrato de plata al 1 % a 43°C en baño de flotación por 30 min.
3. Preparar el revelador en este momento.
4. Cubrir los cortes con la solución reveladora.
5. Dejar revelar hasta que los cortes de tejido tomen color café-claro o amarillo.
6. Revisar al microscopio el testigo para que se compare el caso problema.
7. Lavar rápido en agua caliente.
8. Lavar en agua destilada.
9. Contrastar (H.E, light-green). a consideración de la Médica o el Médico Especialista en Patología.
10. Deshidratar, aclarar las laminillas hasta que se obtiene el contraste adecuado, posteriormente montar con cubreobjeto y resina.

#### Resultado:

Espiroquetas-negro.

\*Nota: el revelado es la parte crítica del método. Se recomienda tratar cuando menos 3 laminillas con distintos tiempos de revelado.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 26 <b>DE:</b> 28

### TÉCNICA GIEMSA:

#### Soluciones:

Solución stock de Giemsa:

- |                    |         |
|--------------------|---------|
| a. Giemsa en polvo | 4 g.    |
| b. Glicerina       | 250 ml. |
| c. Metanol         | 250 ml. |

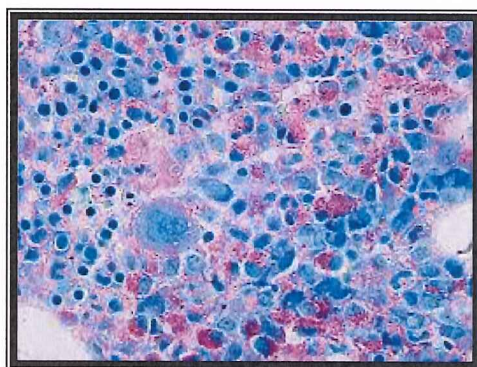
1. Disolver el polvo de Giemsa en la glicerina con ayuda de calor y agitación.
2. Agregar metanol y agitar.
3. Dejar reposar la solución por 7 días.
4. Filtrar el preparado antes de usarse.

#### Resultado:

Eritrocitos: azul.

Granulocitos: citoplasma rosa magenta.

Núcleos: azul claro.



La realización de esta técnica permite que las Médicas o Médicos Especialistas en Patología, Médicas o Médicos Residentes realicen la revisión en microscopio para la emisión de los diagnósticos anatopatológicos.

## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 27 <b>DE:</b> 28

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 Aclarar:** Es un procedimiento para cambiar las propiedades ópticas del tejido que nos permite observar nítidamente estructuras en zonas profundas de muestras gruesas.
- 9.2 Desparafinar:** Parte de la técnica histológica en la que se necesita quitar la parafina para que pueda ser hidratado el corte de tejido. Este paso se realiza a través de distintos baños en xilol, por un tiempo determinado.
- 9.3 Diferenciar:** En la técnica histológica significa el cambiar una célula de un color base a otro.
- 9.4 Hematoxilina:** Es un colorante que cuando se oxida produce hemateína que es el colorante utilizado en la tinción de "rutina" histológica de manera habitual.
- 9.5 H. Pylori:** Es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo helicoidal que habita en el epitelio gástrico humano.
- 9.6 Laminilla de control:** Es una laminilla que contiene una muestra que sirve para comparación con la laminilla que se está sometiendo a la tinción deseada y que sirve para la evaluación sistemática de la técnica, garantizando la reproducibilidad de la misma.
- 9.7 Metaplasia intestinal:** Cambio reversible en el que una célula diferenciada se sustituye por otro tipo de células.
- 9.8 Mordentar:** Proceso de preparación del mordiente que se utiliza para la fijación de un colorante sobre una tela o fibra.
- 9.9 Sulfato de Amonio** Es una sal inorgánica utilizada en el proceso de tinción en Histotecnología.
- 9.10 Virar:** Cambio de coloración de un tono a otro.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Ref. Patología, Vol. 34, pp 227-30

Métodos Histotecnológicos. Instituto de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America (AFIP). Prophet EB, Mills B., Arrington JB., Sobin LH. Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP), Washington D.C.1992.


CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>2. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción Básica y Especial de Muestras Biológicas</b>		<b>HOJA:</b> 28 <b>DE:</b> 28

### 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>3. Procedimiento Técnico para Procesar Líquidos Corporales, Citologías y Biopsias por Aspiración</b>		<b>HOJA:</b> 1  <b>DE:</b> 8

### 3. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA PROCESAR LÍQUIDOS CORPORALES, CITOLOGÍAS Y BIOPSIAS POR ASPIRACIÓN

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>3. Procedimiento Técnico para Procesar Líquidos Corporales, Citologías y Biopsias por Aspiración</b>		<b>HOJA:</b> 2 <b>DE:</b> 8

## 1.0 DEFINICIÓN DEL DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Proceso de tinción se usa en todos los laboratorios de Histotecnología para obtener una visión general de las muestras de líquidos corporales, citologías y biopsias por aspiración con aguja delgada de múltiples órganos, con lo cual las moléculas de un colorante se adsorben a una superficie. El uso de colorantes permite cambiar el color de las células de los microorganismos.

## 2.0 OBJETIVO

Realizar la tinción, montaje, lectura, interpretación, archivo y control de calidad de las muestras citológicas de las personas beneficiarias en el Instituto.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y servidores públicos de salud que participa en el procedimiento cuentan con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.

1. Médica o Médico Especialista en Patología.
2. Coordinador de Laboratorio de Histotecnología.
3. Técnica o Técnico de Laboratorio de Histotecnología.
4. Citotecnóloga.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1. Procesamiento del material Citológico:
  - I. Procesador de tejidos (Microm STP120, Thermo Scientific).
  - II. Aparato de inclusión en parafina (HistoStar, Thermo Scientific).
  - III. Impresora de laminillas (SlideMate As, Thermo Scientific).
  - IV. Micrótomos.
  - V. Baño de flotación de tejidos (section flotation bath, Thermo Scientific).
  - VI. Secador de laminillas (RotorDry, Mopec).
  - VII. Horno (Boekel).
  - VIII. Centrífuga de mesa (Jouan).
  - IX. Refrigerador (Forma, Thermo Scientific).
  - X. Microondas para procesamiento histológico (KOS Rapid Microwave Labstation).
  - XI. Equipo de tinción automatizado (Gemini AS, Thermo Scientific).

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>3. Procedimiento Técnico para Procesar Líquidos Corporales, Citologías y Biopsias por Aspiración</b>		<b>HOJA:</b> 3 <b>DE:</b> 8

XII. Microscopio óptico binocular.

2. Procesamiento de material citológico:
  - I. Citocentrifuga Aerospray.
  - II. Cytospin 4 Thermo Scientific.
3. Respecto a los colorantes se usan los siguientes:
  - I. Colorante de Hematoxilina
  - II. Colorante Orange G6
  - III. Colorante EA 50

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

El área de trabajo cuenta con ventilación de inyección y extracción controladas, campana de extracción, piso antiderrapante y con curva sanitaria, tren de tinción o equipo de tinción.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas


Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>3. Procedimiento Técnico para Procesar Líquidos Corporales, Citologías y Biopsias por Aspiración</b>		<b>HOJA:</b> 4  <b>DE:</b> 8

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.

D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.

D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.

D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

Reglamento Interno de la Comisión Nacional de Arbitraje Médico.

D.O.F 03-II-2004

Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.

D.O.F. 19-IV-2004 y sus reformas

#### NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de cáncer del cuello uterino.

D.O.F. 16-I-1995

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.

D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.

D.O.F 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.

D.O.F. 02-II-1999

Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

D.O.F. 17-II-2003



Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.

D.O.F 09-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

D.O.F. 27-III-2012

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>3. Procedimiento Técnico para Procesar Líquidos Corporales, Citologías y Biopsias por Aspiración</b>		<b>HOJA:</b> 5 <b>DE:</b> 8

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.  
D.O.F. 19-II-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.  
D.O.F. 15-X-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA3-2012, Que establece las características mínimas en relación a infraestructura y equipamientos de laboratorios de Anatomía Patológica, hospitales y consultorios de atención médica especializada.  
D.O.F. 08-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-2014, Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral- Reconocimiento, evaluación y control.  
D.O.F. 28-IV-2014

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.  
D.O.F. 21-II-2017

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

### Manejo de colorantes:

El Coordinador de Laboratorio de Histotecnología verifica la rotulación de las soluciones de acuerdo con lo siguiente; indicar: fecha de compra, solución, titulación, concentración, advertencias y fecha de caducidad.

El Coordinador de Laboratorio de Histotecnología supervisa que las Técnicas y los Técnicos de Laboratorio de Histotecnología mantengan los colorantes en envases oscuros y tapados, además del mantenimiento general de los colorantes.

La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología y/o Citotecnóloga: filtra los colorantes cada 8 días.

En caso de ser necesario se filtrará los colorantes diariamente con papel filtro de mediana velocidad (Whatman No. 1) La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología y/o Citotecnóloga limpia las cajas de todo residuo de los colorantes.

La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología y/o Citotecnóloga controlará diario el nivel de soluciones del tren de tinción y rellenará las cubetas con el colorante correspondiente.

### TÉCNICA DE PAPANICOLAOU:

La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología y/o Citotecnóloga realiza las siguientes actividades:

1. La Médica o el Médico Especialista en Patología revisa el material obtenido sea suficiente para citología y el de Biopsia por Aspiración con Aguja Fina a fin de realizar extendido y/o bloque celular.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>3. Procedimiento Técnico para Procesar Líquidos Corporales, Citologías y Biopsias por Aspiración</b>		<b>HOJA:</b> 6 <b>DE:</b> 8

2. En caso de que el material lo considere la Médica o el Médico Especialista en Patología, le indica a la Técnica o el Técnico del Laboratorio de Histotecnología o Citotecnóloga que tipo de tinción se realizará con cada muestra biológica.
3. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología y/o Citotecnóloga cuando se trata de líquidos corporales, los centrifuga a 2500 rpm por 30 min, retira el sobrenadante realiza un botón celular que se re-suspende.
4. Con el material obtenido de la centrifugación, la Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología y/o Citotecnóloga hará el extendido celular en una o más laminillas, dependiendo del material que se obtenga.
5. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología revisa que las laminillas NO tengan más de 15 días de fijación, las recibidas al momento de la toma las deja secar a temperatura ambiente.
6. La Técnica o el Técnico del Laboratorio de Histotecnología y/o Citotecnóloga realiza la tinción de Papanicolaou.
7. Si solo hay extendido se procede a realizar la tinción correspondiente Papanicolaou o Hematoxilina y Eosina, en caso de que el material sea abundante, la Técnica o el Técnico del Laboratorio de Histotecnología realiza bloque celular que será procesado con las muestras biológicas quirúrgicas diarias.
8. Al día siguiente, la Técnica o el Técnico del Laboratorio de Histotecnología incluye la muestra en parafina, realiza el bloque de parafina, corta y se realiza la tinción de Hematoxilina y Eosina.
9. La Técnica o el Técnico del Laboratorio de Histotecnología ordena por número secuencial el material en una charola de madera y presenta a Coordinador de Laboratorio de Histotecnología.
10. El Coordinador del Laboratorio de Histotecnología revisa el proceso y avala la entrega a la Médica o el Médico Especialista en Patología para su evaluación.

La tinción de Papanicolaou es un examen basado en la coloración de extendidos celulares en general (vaginal, cervical, prostático) o para fluidos corporales (peritoneal, pleural, gástrico, urinario, espinal, etc.).

#### INICIO DE TINCIÓN CELULAR:

La tinción es realizada por la Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología:

1. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología sumerge las laminillas en la caja de tinción de alcohol etílico al 96, haciendo 10 inmersiones.
2. Pasa la canastilla por agua corriente, hasta que el agua se aclare, posteriormente deja escurrir la canastilla.
3. Sumerge las laminillas en la caja de tinción con agua destilada, haciendo 10 inmersiones.
4. Sumerge las laminillas en la caja de tinción con Hematoxilina de 2 a 5 minutos.
5. Pasa las laminillas por agua corriente, hasta que el agua se aclare, posteriormente deja escurrir la canastilla.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>3. Procedimiento Técnico para Procesar Líquidos Corporales, Citologías y Biopsias por Aspiración</b>		<b>HOJA:</b> 7 <b>DE:</b> 8

6. Sumerge la canastilla de laminillas en la caja de tinción con ácido clorhídrico + alcohol etílico al 96%, hace de 3 a 5 inmersiones.
7. Sumerge la canastilla con laminillas en la caja de tinción con agua destilada, hace 10 inmersiones.
8. Sumerge la canastilla con laminillas en la caja de tinción con alcohol etílico de 96%, hace 10 inmersiones.
9. Repite el paso previo.
10. Sumerge la canastilla con laminillas en la caja de tinción con colorante Orange G6 durante 1.5 a 6 minutos y deja escurrir, según la calidad del colorante.
11. Sumerge la canastilla en la caja de tinción con alcohol etílico de 96%, hace 10 inmersiones.
12. Repite el paso previo.
13. Repite paso previo.
14. Sumerge la canastilla con laminillas en la caja de tinción con colorante Eosina A50, durante 1,5 a 6 minutos y deja escurrir.
15. Sumerge la canastilla en la caja de tinción con alcohol al 96%, hace 10 inmersiones.
16. Sumerge la canastilla con laminillas en la caja de tinción con alcohol etílico absoluto, hace 10 inmersiones.
17. Sumerge la canastilla en la caja de tinción con alcohol etílico absoluto, hace 10 inmersiones.
18. Repite paso previo.
19. Sumerge canastilla con laminillas en la caja de tinción con xilol, durante 10 minutos.
20. Repite paso previo.
21. Sumerge canastilla con laminillas en la caja de tinción con xilol durante 10 minutos.
22. Repite paso previo.
23. Repite paso previo.
24. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología y/o Citotecnologa monta las laminillas con resina bajo la campana de extracción de gases.
25. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología y/o Citotecnologa ordena el material por número consecutivo, y entrega a la Médica o el Médico Especialista en Patología.
26. La Médica o el Médico Especialista en Patología recibe, verifica material y revisa al microscopio óptico.

**Resultado de las tinciones celulares:**



Núcleos en azul, células acidófilas rojo a naranja, células basófilas verde o azul verdoso, células o fragmentos de tejido impregnados de sangre, naranja o naranja verdoso.

La realización de esta técnica permite que las Médicas o Médicos Especialistas en Patología, Médicas o Médicos Residentes realicen la revisión en microscopio para la emisión de los diagnósticos anatomatológicos.

**8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS**

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimeto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>3. Procedimiento Técnico para Procesar Líquidos Corporales, Citologías y Biopsias por Aspiración</b>		<b>HOJA:</b> 8 <b>DE:</b> 8

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 Citología:** Es una prueba que permite detectar células anormales del organismo.
- 9.2 Citología cervical:** Test o prueba de Papanicolaou: se emplea para diagnosticar de manera oportuna y precoz cáncer del cuello uterino por medio de un frote.
- 9.3 Inmersión:** Introducción completa de un cuerpo en un líquido.
- 9.4 Líquidos de cavidades serosas:** Se refiere al acúmulo de líquido en cavidad abdominal, torácica, etc. de manera anormal. Puede ser consecuencia de cáncer o padecimientos inflamatorios o autoinmunes.



## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Ref. Patología, Vol. 34, pp 227-30

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN



Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>4. Procedimiento Técnico para Procesar Muestras Biológicas y Biopsias Urgentes</b>		<b>HOJA:</b> <b>1</b>  <b>DE:</b> <b>8</b>

#### 4. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA PROCESAR MUESTRAS BIOLÓGICAS Y BIOPSIAS URGENTES

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>4. Procedimiento Técnico para Procesar Muestras Biológicas y Biopsias Urgentes</b>		<b>HOJA: 2</b>  <b>DE: 8</b>

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Procesar muestras biológicas o biopsias urgentes y el diagnóstico anatomopatológico en personas beneficiarias con estado de salud crítico.

## 2.0 OBJETIVO

Procesar muestras biológicas y biopsias urgentes a fin de emitir el diagnóstico anatomopatológico que contribuya en la toma de decisiones de las Médicas y Médicos tratantes.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA



Las servidoras y servidores públicos de salud que participa en el procedimiento cuentan con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias que requieren de la realización de la dinamometría de mano.

1. Médica o Médico Especialista en Patología.
2. Coordinador de Laboratorio de Histotecnología.
3. Técnica o Técnico de Laboratorio de Histotecnología.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1. Procesamiento con material histológico:
  - I. Procesador de tejidos (Microm STP120, Thermo Scientific).
  - II. Aparato de inclusión en parafina (HistoStar, Thermo Scientific).
  - III. Impresora de laminillas (SlideMate As, Thermo Scientific).
  - IV. Micrótomos.
  - V. Baño de flotación de tejidos (section flotation bath, Thermo Scientific).
  - VI. Secador de laminillas (RotorDry, Mopec).
  - VII. Horno (Boekel).
  - VIII. Centrífuga de mesa (Jouan).
  - IX. Refrigerador (Forma, Thermo Scientific).
  - X. Microondas para procesamiento histológico (KOS Rapid Microwave Labstation).
  - XI. Equipo de tinción automatizado (Gemini AS, Thermo Scientific).
  - XII. Microscopio óptico binocular.
2. Procesamiento con material citológico:
  - I. Citocentrífuga Aerospray.
  - II. Cytospin 4 Thermo Scientific.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>4. Procedimiento Técnico para Procesar Muestras Biológicas y Biopsias Urgentes</b>		<b>HOJA:</b> 3 <b>DE:</b> 8

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

Laboratorio de procesamiento histológico de muestras biológicas con ventilación de extracción y procesador de tejidos con programas variables, posibilidad de manejo manual, además de piso epóxico con curva sanitaria en el área de trabajo.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.  
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>4. Procedimiento Técnico para Procesar Muestras Biológicas y Biopsias Urgentes</b>		<b>HOJA: 4</b>  <b>DE: 8</b>

Reglamento Interno de la Comisión Nacional de Arbitraje Médico.  
D.O.F 03-II-2004

Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.  
D.O.F. 19-IV-2004 y sus reformas

#### DECRETOS

Decreto por el que la Secretaría de Salubridad y Asistencia organizará el registro Nacional de Cáncer, como programa permanente destinado a la prevención información y asesoría en la lucha contra el cáncer.  
D.O.F 17-XI-1982

#### NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de cáncer del cuello uterino.  
D.O.F. 16-I-1995

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.  
D.O.F 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.  
D.O.F. 02-II-1999



Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.  
D.O.F. 17-II-2003

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.  
D.O.F 09-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.  
D.O.F. 27-III-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.  
D.O.F. 19-II-2013

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>4. Procedimiento Técnico para Procesar Muestras Biológicas y Biopsias Urgentes</b>		<b>HOJA:</b> 5 <b>DE:</b> 8

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.  
D.O.F. 15-X-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA3-2012, Que establece las características mínimas en relación a infraestructura y equipamientos de laboratorios de Anatomía Patológica, hospitales y consultorios de atención médica especializada.  
D.O.F. 08-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.  
D.O.F. 21-II-2017

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

1. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología encargado revisa y registra en la bitácora correspondiente el número de muestra biológica, fecha, tipo de tejido, programa en el que se procesó y nombre de la Técnica o el Técnico que procesa la biopsia.

Fecha	Número de biopsia	Tipo de tejido	Programa	Técnico
01-01-2021	Q-21-0001	Hígado	Proceso rápido	Coordinador de Laboratorio de Histotecnología
02-01-2021	Q-21-0002	Medula ósea	Medula Ósea 2	Técnica o Técnico de Laboratorio de Histotecnología (Rol de técnicos)

2. La Médica o el Médico Especialista en Patología pone dentro de un cassette la muestra biológica que se cataloga como urgente y la deposita dentro del recipiente de vidrio en formol en el equipo procesador de tejidos.



**\*Nota importante:** La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Histotecnología encargado del proceso de muestras biológicas urgentes tiene que tomar en cuenta lo siguiente:

- a. Utilizar reactivos nuevos cada que se realiza el procedimiento de una muestra urgente.
- b. Utilizar los vasos, accesorios y adaptadores específicos del equipo.
- c. No mezclar las soluciones.
- d. Nunca dejar sin supervisión el equipo mientras se encuentre funcionando.
- e. Al terminar el proceso desechar las soluciones en los contenedores correspondientes, lavar, secar y guardar el material, y equipo.

### Procesamiento rápido de biopsias pequeñas (hígado, riñón, medula ósea, etc.), 2 a 5 horas.

Nombre del programa: Proceso rápido (tejidos blandos) Procesador de tejidos Thermo Scientific

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>4. Procedimiento Técnico para Procesar Muestras Biológicas y Biopsias Urgentes</b>		<b>HOJA:</b> 6  <b>DE:</b> 8

Se programa el procesador de tejidos Thermo Scientific para realizar el siguiente programa:

**Pre-Soaking 10 min**

Fase: **Fijación en formol**. Duración: 20 min, velocidad de agitación: 400 RPM.

Pasos:

Pasos	Tiempo	Temperatura	Max poder
1	3 min	50°C	100%
2	17 min	50°C	100%

**Lavados: Dos lavados rápidos en etanol absoluto.**

Fase: **Etanol absoluto**. Duración: 30 min, velocidad de agitación: 400 RPM.

Pasos:

Pasos	Tiempo	Temperatura	Max poder
1	10 min	65°C	100%
2	20 min	65°C	100%

Fase: **Isopropanol**. Duración: 30 min, velocidad de agitación: 400 RPM.

Pasos:

Pasos	Tiempo	Temperatura	Max poder
1	10 min	65°C	100%
2	20 min	65°C	100%

Fase: **Parafina**. Duración: 50 min, velocidad de agitación: 400 RPM.

Pasos:

Pasos	Tiempo	Temperatura	Max poder
1	10 min	60°C	100%
2	40 min	60°C	100%

**Nombre del programa en procesador de tejidos Thermo Scientific:**

Medula Ósea 2 proceso rápido aproximadamente 5 horas.

**Pre-Soaking 10 min**

Fase: **Fijación en formol**. Duración, 30 min, velocidad de agitación: 450 RPM.

Pasos:

Pasos	Tiempo	Temperatura	Max poder
1	3 min	50°C	100%
2	27 min	50°C	100%

**Lavados:**



Fase: **EDTA o Decal**. Duración: 3 horas, velocidad de agitación: 400 RPM.

Pasos:

Pasos	Tiempo	Temperatura	Max poder
1	1 min 30 seg	37°C	100%
2	2 hrs 58 min 30 seg	37°C	100%

**CONTROL DE EMISIÓN**

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>4. Procedimiento Técnico para Procesar Muestras Biológicas y Biopsias Urgentes</b>		<b>HOJA: 7</b>  <b>DE: 8</b>

Fase: **Etanol absoluto**. Duración: 30 min, velocidad de agitación: 400 RPM.

Pasos:

Pasos	Tiempo	Temperatura	Max poder
1	5 min	60°C	100%
2	25 min	60°C	100%

Fase: **Isopropanol**. Duración: 25 min, velocidad de agitación: 400 RPM.

Pasos:

Pasos	Tiempo	Temperatura	Max poder
1	3 min	50°C	100%
2	22 min	50°C	100%

Fase: **Parafina**. Duración: 50 min, velocidad de agitación: 400 RPM.

Pasos:

Pasos	Tiempo	Temperatura	Max poder
1	5 min	62°C	100%
2	45 min	62°C	100%

El Coordinador de Laboratorio de Histotecnología verifica el tiempo mínimo de fijación de cada muestra biológica urgente y designa a una Técnica o Técnico de Laboratorio de Histotecnología a cargo del procesamiento de la misma.



## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 Biopsia renal:** Es el procedimiento que se realiza para extraer una muestra de riñón por métodos no invasivos, cuando existe una urgencia médica.
- 9.2 Biopsia urgente:** Es el procedimiento que se realiza para extraer una muestra de tejido o de células del cuerpo para su análisis en un laboratorio, con proceso más rápido del ordinario para normar una conducta terapéutica.
- 9.3 Decalcificar:** Proceso por el cuál se elimina el calcio de los tejidos para permitir su proceso histológico
- 9.4 Microcentrifuga:** Equipo de laboratorio que usa para procesar muestras biológicas líquidas
- 9.5 Procesador de tejidos:** de Equipo que realiza el procesamiento de tejidos o muestras biológicas de manera automatizada

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>4. Procedimiento Técnico para Procesar Muestras Biológicas y Biopsias Urgentes</b>		<b>HOJA: 8</b>  <b>DE: 8</b>

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Boenisch T, ed. Manual de métodos inmunohistoquímicos de coloración. 3ª. Edición. 2002. DakoCytomation.

Boenisch T. Appl Immunohistochem 1999;7:300-306.

Boenisch T. Appl Immunohistochem 2001;9:176-179.

Sternberger LA, Sternberger NH. J Histochem Cytochem 1986;34:599-605.

Mikel UK, ed. Advanced laboratory methods in histology and pathology. 1994. Armed Forces Institute of Pathology.

NCCLS Quality Assurance for Immunocytochemistry approved guideline, December 1999 MM4-A Vol. 19 No.26 for more information on tissue controls.

Roche PC, et al. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. NR Rose Ed. ASM Press, 2002. ISBN 10: 1555812155 / ISBN 13: 9781555812157

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN


Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV: 01
	<b>5. Procedimiento Técnico para Realizar Procesamiento y Tinción de Inmunohistoquímica Manual</b>		HOJA: 1  DE: 13

## 5. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR PROCESAMIENTO Y TINCIÓN DE INMUNOHISTOQUÍMICA MANUAL

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>5. Procedimiento Técnico para Realizar Procesamiento y Tinción de Inmunohistoquímica Manual</b>		<b>HOJA:</b> 2  <b>DE:</b> 13

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Detectar con el uso de anticuerpos los epítopes de los tejidos o células, que se revelan con cromógenos por medio de técnica manual a fin de contribuir en la emisión de diagnósticos anatomatológicos de las personas beneficiarias.

## 2.0 OBJETIVO

Procesar las muestras biológicas hasta la tinción de inmunohistoquímica permitiendo contribuir con la emisión de diagnósticos anatomatológicos en beneficio de la población usuaria.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE LA SALUD QUE PARTICIPA

1. Médica o Médico Especialista en Patología.
2. Coordinadora de Laboratorio de Inmunohistoquímica.
3. Técnica o Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

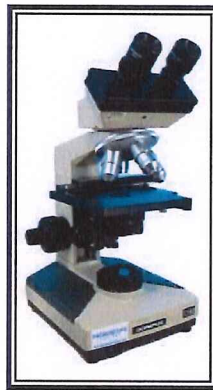
1. Estufa de secado, Hoffmann-Pinther and Bosworth, S.A.



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV:      01
	<b>5. Procedimiento Técnico para Realizar Procesamiento y Tinción de Inmunohistoquímica Manual</b>		HOJA:     3  DE:        13



2. Microscopio óptico binocular, Olympus CH-2.



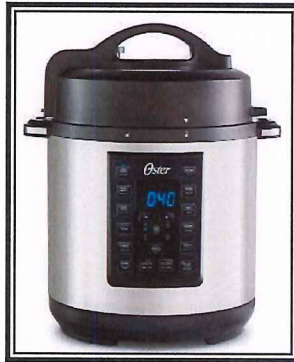
3. Micrótopo y baño de flotación de tejidos (section flotation bath, Thermo Scientific).



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>5. Procedimiento Técnico para Realizar Procesamiento y Tinción de Inmunohistoquímica Manual</b>		<b>HOJA: 4</b>  <b>DE: 13</b>

4. Olla de presión Oster.



5. Refrigerador para reactivos, Lab Research Refrigerador para reactivos, LG.

### MATERIAL

1. Micropipeta 20-200ul
2. Micropipeta 100- 1000ul
3. Micropipeta 2 – 20 ul
4. Puntillas para micropipeta 200 ul
5. Puntillas para micropipeta 1000ul
6. Agua bidestilada
7. Inmuno wash buffer
8. Tris-EDTA buffer ph 9
9. Diva decloaker
10. Diluyente para anticuerpos
11. Olla pascal
12. Racks
13. Cover plate
14. Vasos Koplik
15. Vortex mixer
16. Laminillas electrocargadas
17. Xilol
18. Alcohol al 96%
19. Alcohol absoluto
20. Carbonato de litio
21. Hematoxilina
22. Difusor squeeze 500 ml
23. Sistema de detección
24. Anticuerpos primarios

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	24-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>5. Procedimiento Técnico para Realizar Procesamiento y Tinción de Inmunohistoquímica Manual</b>		<b>HOJA:</b> 5  <b>DE:</b> 13

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

No requiere condiciones especiales para desarrollar el procedimiento.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECIFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.  
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

Reglamento Interno de la Comisión Nacional de Arbitraje Médico.  
D.O.F 03-II-2004

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV: 01
	<b>5. Procedimiento Técnico para Realizar Procesamiento y Tinción de Inmunohistoquímica Manual</b>		HOJA: 6 DE: 13

Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.  
D.O.F. 19-IV-2004 y sus reformas

## DECRETOS

Decreto por el que la Secretaría de Salubridad y Asistencia organizará el registro Nacional de Cáncer, como programa permanente destinado a la prevención información y asesoría en la lucha contra el cáncer.  
D.O.F. 17-XI-1982

## NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de cáncer del cuello uterino.  
D.O.F. 16-I-1995

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.  
D.O.F. 02-II-1999

Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.  
D.O.F. 17-II-2003

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.  
D.O.F. 09-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.  
D.O.F. 27-III-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.  
D.O.F. 19-II-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.  
D.O.F. 15-X-2012

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>5. Procedimiento Técnico para Realizar Procesamiento y Tinción de Inmunohistoquímica Manual</b>		<b>HOJA:</b> <b>7</b>  <b>DE:</b> <b>13</b>

Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA3-2012, Que establece las características mínimas en relación a infraestructura y equipamientos de laboratorios de Anatomía Patológica, hospitales y consultorios de atención médica especializada.  
D.O.F. 08-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.  
D.O.F. 21-II-2017


## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DEL PROCEDIMIENTO

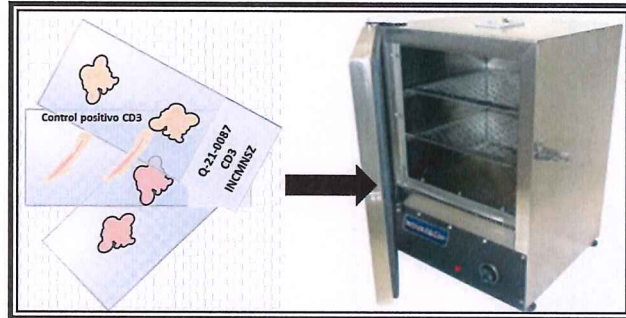
1. La Médica o el Médico Especialista en Patología encargado de un caso solicita marcadores (anticuerpos) específicos que dependerán del caso estudiado y/o del propósito de estas reacciones de inmunohistoquímica.
2. La Médica o el Médico Especialista en Patología y / o Médica o Médico Residente de Patología anota en la bitácora de solicitud de inmunohistoquímica: número de quirúrgico, marcadores o inmunofluorescencia.

Fecha	# Bloque /letra	Anticuerpos	Patólogo
09/Ago/21	Q-21-0001 A	Depende del caso	Médica o Médico Especialista en Patología
10/Ago/21	Q-21 0002 B	Depende del caso	Médica o Médico Especialista en Patología
11/Ago/21	Q-21-0056	Depende del Caso	Médica o Médico Especialista en Patología

3. La realización de la técnica manual para cada anticuerpo es diferente y depende de las características químicas del anticuerpo solicitado.
4. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica solicita los bloques del caso al archivo de bloques.
5. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica realiza cortes de 1.5  $\mu\text{m}$  de espesor en laminillas electro- cargadas para incrementar la adhesión celular.
6. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica realiza los cortes necesarios para los anticuerpos correspondientes (una por marcador), con un control positivo en cada laminilla y las coloca en la estufa de secado por 20 min a 75°C para desparafinar el tejido.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>5. Procedimiento Técnico para Realizar Procesamiento y Tinción de Inmunohistoquímica Manual</b>		<b>HOJA:</b> 8  <b>DE:</b> 13



7. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica coloca las laminillas desparafinadas e hidratadas en buffer de lavado. Una vez hidratados los tejidos, evitar que se seque el tejido durante todo el proceso hasta terminar la inmunotinción.



Tren de desparafinación e hidratación

8. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica separa las laminillas de acuerdo con el protocolo requerido para cada anticuerpo (ver anexo 1):
- Recuperación antigénica por medio de calor.
  - Digestión proteica.
  - Sin recuperación.

La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica realiza la recuperación antigénica por medio de estos 3 procesos:

- Por medio de calor: se realiza con el buffer Diva Decloaker o EDTA Decloaker de Biocare. El procedimiento consiste en colocar en un vaso coplin de plástico y se cubre con el recuperador seleccionado. Posteriormente, se colocan en olla de presión eléctrica 20 min a presión alta y se dejan enfriar sobre la mesa de trabajo.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	24-10-2022	21-10-2022



# MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS

Departamento de Patología

## 5. Procedimiento Técnico para Realizar Procesamiento y Tinción de Inmunohistoquímica Manual



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

CÓDIGO:  
M.T./ 0.2.4.2

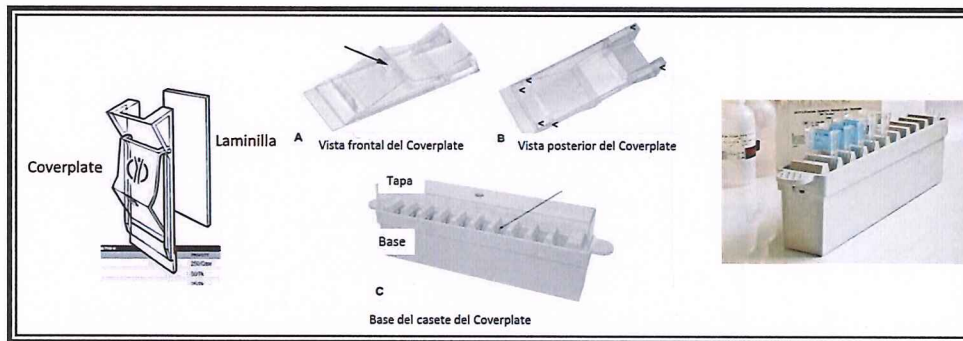
REV: 01

HOJA: 9

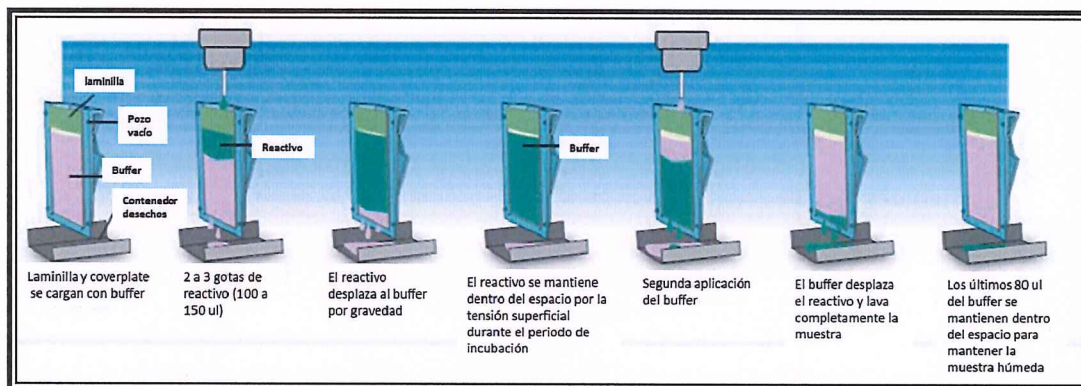
DE: 13



9. Cuando las laminillas se han enfriado a temperatura ambiente, la Técnica o el Técnico del Laboratorio de Inmunohistoquímica, monta las laminillas en el Coverplate, evitando que los tejidos no se sequen.





10. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica llena el pozo del coverplate de buffer de lavado y se espera 3 min para poner el siguiente reactivo.



### CONTROL DE EMISIÓN

Elaboró:		Revisó:		Autorizó:	
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona		Dr. Raúl Rivera Moscoso	
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico		Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina	
Firma:					
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022		21-10-2022	

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>5. Procedimiento Técnico para Realizar Procesamiento y Tinción de Inmunohistoquímica Manual</b>		<b>HOJA:</b> <b>10</b>  <b>DE:</b> <b>13</b>

### TINCIÓN DE INMUNOHISTOQUÍMICA MANUAL:

La inmuno-tinción la realiza la Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica, con el sistema de Detección HiDef Detection HRP Polymer System de Cell Marque.

El Sistema de Detección HiDef es un sistema de polímeros de dos pasos utiliza un método indirecto para formar un complejo enzima-anticuerpo, que detecta universalmente anticuerpos primarios de ratón y conejo.

El resultado de la reacción se visualiza mediante HRP (por sus siglas en inglés *Horseradish peroxidase*- Peroxidasa de rábano) compatible con cromógenos como DAB (3,3'-diaminobenzidine) y que se visualiza por medio de microscopía óptica.

Este sistema de visualización consta de dos reactivos que se utilizan de forma secuencial, el amplificador HiDef Detection™ (ratón y conejo) y el detector de polímero HRP Detection™, que amplifica la detección de los antígenos expresados.



Una vez colocadas las laminillas con los cortes y su respectivo control en el sistema de inmuno-tinción por capilaridad se empiezan a colocar los reactivos en orden secuencial de la siguiente:

1. Se colocan 3 gotas (100 a 150 ul) de bloqueador de peroxidasa y se incuba 5 min.
2. Lavar con buffer de lavado y esperar 3 min para poner el siguiente reactivo.
3. Aplicar el inhibidor de peroxidasa endógena (HiDef Detection Peroxidase Blocker) e incubar por 5 minutos.
4. Lavar con buffer de lavado y esperar 3 min para poner el siguiente reactivo.
5. Si se requiere, aplicar bloqueador de tinción inespecífica por 20 minutos.
6. Lavar con buffer de lavado y esperar 3 min para poner el siguiente reactivo.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>5. Procedimiento Técnico para Realizar Procesamiento y Tinción de Inmunohistoquímica Manual</b>		<b>HOJA:</b> 11  <b>DE:</b> 13

7. Aplicar el anticuerpo primario e incubar por 40 minutos. La dilución del anticuerpo dependerá del anticuerpo utilizado, ver anexo 1.
8. Lavar con buffer de lavado y esperar 3 min para poner el siguiente reactivo.
9. Aplicar 3 gotas (100 a 150 ul) del anticuerpo secundario biotinilado (HiDef Detection Amplifier Mouse and Rabbit) e incubar por 15 minutos.
10. Lavar con buffer de lavado y esperar 3 min para poner el siguiente reactivo.
11. Aplicar 3 gotas (100 a 150 ul) de la estreptoavidina asociada a peroxidasa (HiDef Detection HRP Polymer Detector) e incubar por 15 minutos.
12. Lavar con buffer de lavado y esperar 3 min para poner el siguiente reactivo.
13. Aplicar la diaminobencidina DAB con peróxido de hidrógeno como sustrato e incubar 8 minutos o hasta observar un precipitado de color adecuado. Revisar al microscopio que la marca sea la adecuada de acuerdo al anticuerpo utilizado.  
  
 \*Evitar tener contacto con la diaminobencidina directamente ya que es carcinogénica. El desecho se tiene que tratar con cloro antes de desecharse. Siempre utilizar guantes cuando se trabaje con DAB.
14. Lavar con buffer de lavado y esperar 3 min para poner el siguiente reactivo.



15. Aplicar hematoxilina de Gill o de Harris para contrastar el tejido e incubar por 10 minutos o hasta obtener el color de contraste deseado.
16. Lavar con agua corriente durante 3 minutos.
17. Aplicar solución de carbonato de litio para virar la hematoxilina e incubar por 5 minutos.
18. Enjuagar con abundante agua corriente.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>5. Procedimiento Técnico para Realizar Procesamiento y Tinción de Inmunohistoquímica Manual</b>		<b>HOJA:</b> 12 <b>DE:</b> 13

19. Desehidratar, aclarar y montar los cortes con resina (entellan).

**\*Nota:** Es muy importante que las laminillas no se sequen, en ningún paso del proceso, en caso de ocurrir esto, es necesario repetir el corte y volver a iniciar.

La realización de esta técnica permite que las Médicas, los Médicos Especialistas en Patología, Médicas o Médicos Residentes de Patología revisen el material biológico y emitan los diagnósticos anatomopatológicos.



## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

## 9.0 GLOSARIO DE TERMINOS

- 9.1 Anticuerpo:** Son proteínas segregadas por el sistema inmune.
- 9.2 Antígeno:** Es cualquier sustancia que provoca que el sistema inmunitario produzca anticuerpos contra sí mismo.
- 9.3 Buffer:** Es un sistema constituido por un ácido débil y su base conjugada, o por una base y su ácido conjugado que tiene capacidad tamponante, es decir, que puede oponerse a grandes cambios de pH (en un margen concreto) en una disolución acuosa.
- 9.4 Coverplate:** Es un aditamento usado en la técnica de inmunohistoquímica manual: son cubiertas planas diseñadas para cuando la arquitectura de un espacio es un factor importante, usado como sistema de inmunotinción por capilaridad.
- 9.5 Cromógeno:** Son sustancias coloreadas, finamente divididas y, como consecuencia de ello, con un fuerte poder de tinción de las restantes partículas a las que se fijan superficialmente.
- 9.6 Diamino-bencidina:** Se utiliza principalmente en ensayos de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica, con el objetivo de marcar de forma visible en una preparación de un corte tisular la molécula o estructura celular que se esté buscando en el tejido (inmunohistoquímica) o en las células (inmunocitoquímica).
- 9.7 Entellán:** Es un líquido denso y transparente que se usa en microscopía como medio de montaje libre de agua.
- 9.8 Inmunotinción:** Sistema de inmuno-tinción por capilaridad.
- 9.9 Laminilla electrocargada:** Laminilla con superficie hidrofóbica con fuerte adherencia. Puede usarse para tinciones especiales, Histotecnología de rutina y cortes congelados.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>5. Procedimiento Técnico para Realizar Procesamiento y Tinción de Inmunohistoquímica Manual</b>		<b>HOJA:</b> 13 <b>DE:</b> 13

**9.10 Peroxidasa:** Es una enzima que cataliza la oxido-reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una gran variedad de donadores de hidrógeno.

**9.11 Sistema de detección:** Es un método basado en las reacciones inmuno-enzimáticas usando anticuerpos mono o policlonales para detectar antígenos de células de tejidos.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Boenisch T, ed. Manual de métodos inmunohistoquímicos de coloración. 3ª. Edición. 2002. Dako Cytomation.

Boenisch T. Appl Immunohistochem 1999;7:300-306.

Boenisch T. Appl Immunohistochem 2001;9:176-179.

Sternberger LA, Sternberger NH. J Histochem Cytochem 1986;34:599-605.

Mikel UK, ed. Advanced laboratory methods in histology and pathology. 1994. Armed Forces Institute of Pathology.

NCCLS Quality Assurance for Immunocytochemistry approved guideline, December 1999 MM4-A Vol. 19 No.26 for more information on tissue controls.

Roche PC, et al. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. NR Rose Ed. ASM Press, 2002. ISBN 10: 1555812155 / ISBN 13: 9781555812157.

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> 1  <b>DE:</b> 22

## 6. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR INMUNOHISTOQUÍMICA AUTOMATIZADA

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV: 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		HOJA: 2  DE: 22

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Detectar epitopes en los especímenes con el uso de anticuerpos y cromógeno en ambiente de temperatura controlada por medio de plataformas automatizadas para muestras biológicas en laminillas con reactivos específicos.

## 2.0 OBJETIVO

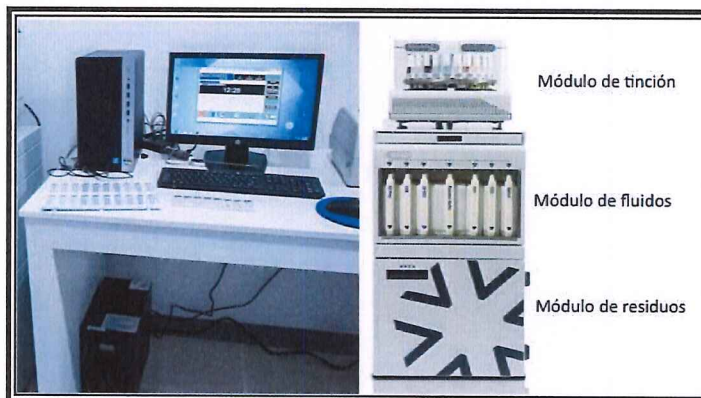
Realizar la inmunohistoquímica automatizada mediante el Sistema BenchMark GX de Ventana-Roche para la inmunohistoquímica o la hibridación in situ con el fin de emitir los diagnósticos in vitro, procesando más muestras, mejorar el tiempo de entrega y la obtención de resultados consistentes y fiables.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE LA SALUD QUE PARTICIPA

1. Médica o Médico Especialista en Patología.
2. Coordinadora de Laboratorio de Inmunohistoquímica.
3. Técnica o Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1. Sistema BenchMark GX de Ventana-Roche
2. Computadora
3. Monitor
4. Impresora de etiquetas de código de barras
5. Módulo de tinción
6. Módulo de fluidos y módulo de residuos



Sistema BenchMark GX de Ventana-Roche

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> 3  <b>DE:</b> 22

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

El área de trabajo cuenta con las siguientes instalaciones físicas para el desarrollo del procedimiento técnico:

1. Campana de extracción.
2. Campana de flujo laminar.
3. Instalación eléctrica (algunos equipos usan corriente 220 v).
4. Lavaojos.
5. Tarja con vertedero.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECIFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas



### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.  
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> <b>4</b>  <b>DE:</b> <b>22</b>

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

Reglamento Interno de la Comisión Nacional de Arbitraje Médico.  
D.O.F 03-II-2004

Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.  
D.O.F. 19-IV-2004 y sus reformas

### NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de cáncer del cuello uterino.  
D.O.F. 16-I-1995

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.  
D.O.F 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-004-STPS-1999, De protección y dispositivos de seguridad en la maquinaria y equipo que se utilice en los centros de trabajo.  
D.O.F. 31-V-1999


Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.  
D.O.F. 02-II-1999

Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.  
D.O.F. 17-II-2003

Norma Oficial Mexicana NOM-001-STPS-2008, Edificios, locales, instalaciones y áreas en los centros de trabajo Condiciones de seguridad.  
D.O.F. 24-XI-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.  
D.O.F 09-XII-2008

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> <b>5</b>  <b>DE:</b> <b>22</b>

Norma Oficial Mexicana NOM-003-SCT/2008, Características de las etiquetas de envases y embalajes, destinadas al transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.  
D.O.F. 15-VIII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.  
D.O.F. 27-III-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.  
D.O.F. 19-II-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.  
D.O.F. 15-X-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.  
D.O.F. 27-I-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.  
D.O.F. 21-II-2017

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

1. La Médica o el Médico Especialista en Patología anota en la bitácora de Inmunohistoquímica el caso, el tipo de procesamiento que requiere Inmunohistoquímica (IHQ) o hibridación in situ (SISH) y especifica que el proceso se realice por medio del equipo automatizado.
2. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica elabora una laminilla si es tejido, realiza un corte histológico con un espesor de 1.5 micras, en caso de ser citología se procederá a elaborar el extendido o botón celular del líquido corporal que se está trabajando, utiliza laminillas electro cargadas para evitar desprendimiento durante el proceso.
3. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica hace en el equipo BenchMark GX las etiquetas que utiliza para su identificación. La etiqueta lleva un código de barras, protocolo a realizar y el número de caso.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> 6  <b>DE:</b> 22



Laminilla

4. La Técnica o el Técnico de laboratorio de Inmunohistoquímica coloca las laminillas con la muestra biológica a realizar (tejido o citología) con las etiquetas adheridas y los reactivos requeridos en los carruseles del módulo de tinción.



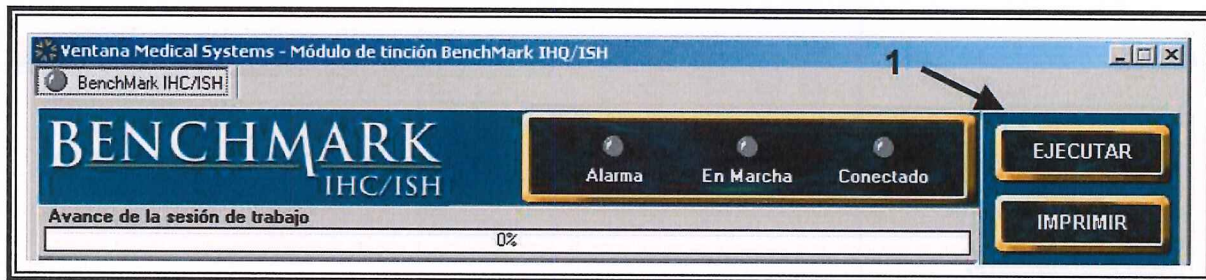
A. Carrusel de laminillas del modulo de tinción. B. Laminillas con etiqueta y codigo de barras

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> 7  <b>DE:</b> 22



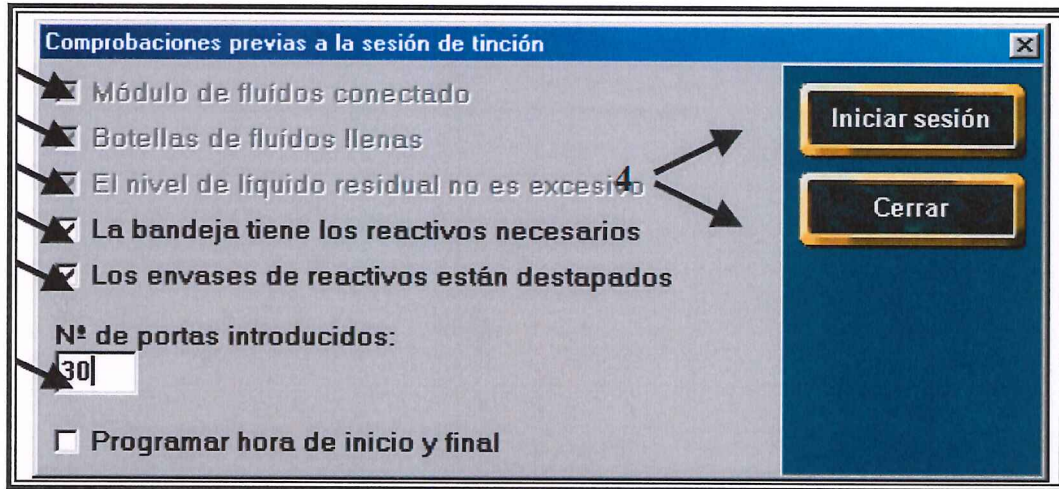
5. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica verifica laminillas y los reactivos que se van a utilizar durante los diferentes protocolos que se llevarán a cabo. Posteriormente cierra la puerta del carrusel de laminillas y ejecuta el proceso en el equipo Sistema BenchMark GX de Ventana-Roche.



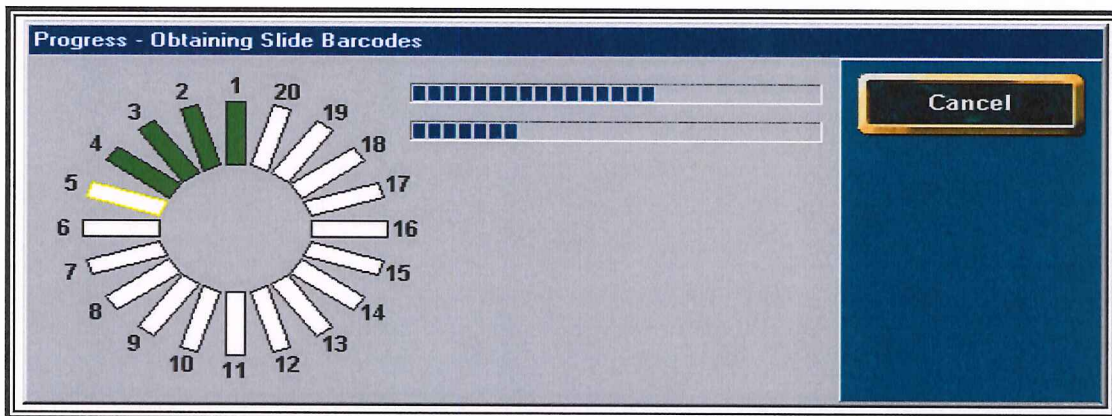
6. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica selecciona la cantidad de portaobjetos a trabajar, hora de inicio y presiona iniciar sesión.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> 8  <b>DE:</b> 22



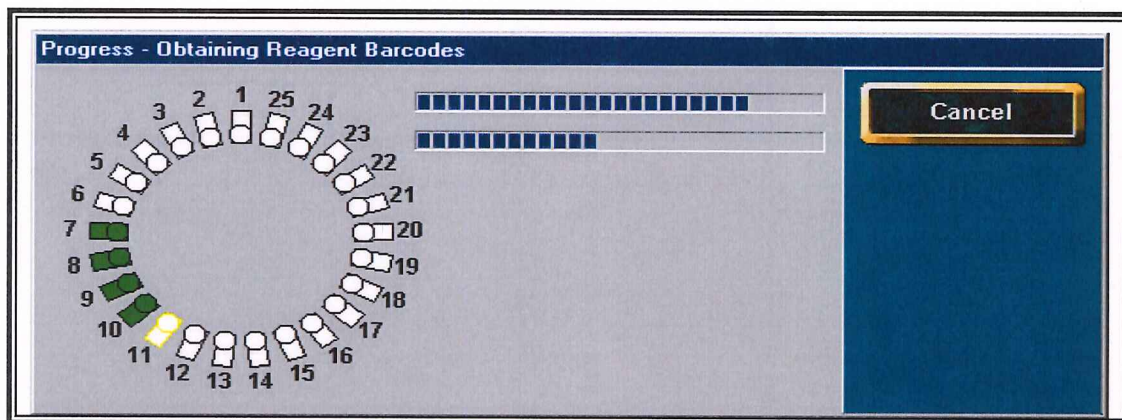
7. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica verifica que el equipo escanee los códigos de barras y verifica que se encuentren todas las laminillas.



8. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica supervisa que en el equipo estén todos los reactivos en el carrusel de tinción según los protocolos a usar (protocolos diseñados o modificados por el usuario).

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> 9 <b>DE:</b> 22



9. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica vigila que el equipo inicie el proceso automático
10. Al finalizar el proceso, la Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica retira los portaobjetos del equipo y los coloca en una canastilla en un recipiente con jabón suave, lava con agua corriente 5 minutos hasta que el aceite protector sea retirado en su totalidad.
11. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica verifica que el aceite protector se haya retirado en su totalidad y vuelve a enjuagar en agua corriente durante 3 minutos para posteriormente dejar secar al aire libre durante 15 minutos las laminillas que fueron sometidas al proceso.



12. Una vez secas las laminillas la Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica las cubre con resina (entellan) y un cubreobjetos.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA: 10</b>  <b>DE: 22</b>



13. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica ordena el trabajo realizado y verifica junto con el Coordinador de Laboratorio de Inmunohistoquímica la calidad de la técnica para entregar a la Médica o Médico Especialista en Patología.

El Coordinador de Laboratorio de Inunohistoquímica diseña protocolos requeridos para los diferentes anticuerpos que se realizan en el equipo automatizado BenchMark GX y que se utilizan de manera rutinaria en el Departamento de Patología.


Estos protocolos son:

Anticuerpo o sonda	Sistema
EBER (ISH)	Hibridación <i>in situ</i> (ISH)
HER2 DUAL (ISH)	Hibridación <i>in situ</i> (ISH)
HER2 DAB	Diaminobencidina DAB
KI-67 DAB	Diaminobencidina DAB
RE DAB	Diaminobencidina DAB
RP DAB	Diaminobencidina DAB

El Coordinador de Laboratorio de Inmunohistoquímica en colaboración con la Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica, verifica el sistema del equipo para realizar los procedimientos de mantenimiento correspondientes de acuerdo con lo siguiente:

1. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de inmunohistoquímica realiza el mantenimiento diario:
  - a. Lava superficies externas.
  - b. Comprobaciones previas a la sesión de tinción.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV: 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		HOJA: 11  DE: 22

2. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica verifica fechas del mantenimiento mensual donde realiza lo siguiente:
  - a. Enjuaga botella de lavado.
  - b. Limpia los soportes de las laminillas.
3. El Coordinador del Laboratorio de Inmunohistoquímica verifica fechas de Mantenimiento trimestral y se encarga de solicitar a la empresa correspondiente:
  - a. Comprobar la calibración BenchMark GX ión de temperatura del aire.
  - b. Desinfectar el equipo.

El Coordinador de Laboratorio de Inmunohistoquímica verifica que el equipo sea revisado por la Técnica o el Técnico Especialista cada 6 meses o 6000 laminillas teñidas, lo que suceda primero.

Con este equipo se realizan dos tipos de procesos: Inmunohistoquímica e Hibridación *In situ*.

#### TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA AUTOMATIZADA:

El Jefe de Departamento de Patología supervisa y coordina con el Coordinador de Laboratorio de Inmunohistoquímica que los reactivos necesarios para estos protocolos se encuentren con fechas de caducidad, viabilidad y suficiencia:

1. INSUMOS (uso diario):
  - a. **Solución acuosa LCS** (Pre diluida) evita la evaporación favorece un entorno acuoso estable para las reacciones de inmunohistoquímica.
  - b. **Solución EZ Prep** para desparafinar las muestra biológicas de tejido durante las reacciones de inmunohistoquímica EZ Prep 10X. Presentación de 2 litros, se diluye con agua destilada a completar un volumen total de 20 lts, no es necesario ajustar el pH.
  - c. **Solución tamponada 10X SSC**, Cloruro de Sodio, Citrato de Sodio, solución astringente para utilizarse en equipo BenchMark Ultra GX. Presentación de 2 litros, se diluye con agua destilada a completar un volumen total de 20 litros, no es necesario ajustar el pH.
  - d. **Solución de reacción concentrada (10X)**. Solución tampón Tris (pH 7,6 ± 0,2) utilizada para aclarar portaobjetos entre los pasos de tinción y para proporcionar un medio acuoso estable para inmunohistoquímica (IHC) realizadas en un equipo BenchMark Ultra GX. Presentación de 2 litros, se diluye con agua destilada a completar un volumen total de 20 lts, no es necesario ajustar el pH.
  - e. **Solución de lavado ultraView Silver Wash II**. Se utiliza para aclarar los portaobjetos entre los pasos de tinción y proporcionar un medio acuoso estable para la reacción del cromógeno en la hibridación *in situ* (ISH) para utilizarse en equipo BenchMark Ultra GX.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> 12  <b>DE:</b> 22

- f. **Etiquetas blancas con solapa plástica**, rollo con 450 etiquetas, para utilizarse en equipo BenchMark Ultra GX.
- g. **Solución CC1**. Solución de acondicionamiento celular pre diluida a base de EDTA.
- h. **Solución CC2**. Solución de acondicionamiento celular pre diluida a base de CITRATOS.

2. KITS (SEGÚN EL PROTOCOLO):

- a. **Sistema de detección ultraView SISH DNP Detection Kit**. Es un sistema indirecto desprovisto de biotina para la detección de sondas marcadas con dinitrofenilo de hapteno DNP. Este kit está destinado a la identificación de blancos por medio de hibridación in situ (ISH) con plata en secciones de tejido fijadas con formol e incluidas en parafina.
- b. **Sistema de detección ultraView Universal DAB Detection Kit**. Es un sistema indirecto y sin biotinas de detección de IgG e IgM de ratón y de anticuerpos primarios de conejo.
- c. **Sistema para hibridación in situ ISH iVIEW Blue Detection Kit**. Consiste de un anticuerpo primario de ratón anti-fluoresceína que, cuando se sigue mediante un sistema indirecto de estreptavidina biotina permite la detección de las sondas marcadas con fluoresceína.
- d. **Sistema de hibridación in situ cromogénica de dos colores, INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail**, en muestras biológicas de tejidos fijados con formol y embebidos en parafina.

3. ANTICUERPOS (SEGÚN PROTOCOLO):

- a. **Anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2** para la detección semi cuantitativa del antígeno receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano en cortes de tejido normal y neoplásico, fijados en formol y embebidos en parafina, en dispensador para utilizarse en equipo BenchMark Ultra GX.
- b. **Anticuerpo monoclonal de conejo CONFIRM anti-Estrogen Receptor** para detectar cualitativamente el antígeno del receptor del estrógeno (RE) en cortes de tejido fijado con formol e incluido en parafina en dispensador para utilizarse en equipo BenchMark Ultra GX.
- c. **Anticuerpo monoclonal de conejo CONFIRM anti-Progesterone Receptor** para detectar cualitativamente el antígeno del receptor de la progesterona (RP) en cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina, en dispensador para utilizarse en equipo BenchMark Ultra GX.
- d. **Anticuerpo monoclonal de conejo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9)** dirigido contra la porción C-terminal del antígeno Ki-67, en cortes de tejido fijado con formol y embebido en parafina, en dispensador para utilizarse en equipo BenchMark Ultra GX.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV: 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		HOJA: 13  DE: 22

4. CONTRASTE (SEGÚN PROTOCOLO):

- a. Solución de rojo sólido nuclear, dispensador de 10 ml.
- b. Solución de Hematoxilina de Gill modificada, para teñir los núcleos celulares, para utilizarse en equipo BenchMark Ultra GX.
- c. Solución de reacción azulada (Bluing Reagent) solución acuosa de carbonato de litio tamponado, para utilizarse en equipo BenchMark Ultra GX

5. SONDAS (SEGÚN PROTOCOLO):

- a. **INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail** está diseñado para detectar cuantitativamente la amplificación del gen HER2 mediante microscopía óptica gracias a la hibridación *in situ* (ISH) cromogénica de dos colores en muestras biológicas de tejidos fijados con formol y embebidos en parafina de cáncer humano de mama y gástrico, incluida la unión gastroesofágica, con un módulo de tinción automatizado.
- b. **INFORM EBER Probe** se utiliza para identificar, mediante hibridación *in situ* (ISH) y microscopía óptica, células que expresen ARN codificado de Epstein-Barr (EBER) en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina. Los resultados positivos ayudan a la identificación de células infectadas por el virus *Epstein-Barr*.

6. ENZIMAS:

- a. **Protease 3**. Reactivo para la digestión enzimática (proteasa alcalina) de los cortes de tejido fijado en formol e incluido en parafina, para utilizarse en equipo BenchMark Ultra GX.
- b. **Solución de hibridación HybReady Solution**. Tampón con formamida para ensayos de hibridación *in situ*, para utilizarse en equipo BenchMark Ultra GX.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> 14  <b>DE:</b> 22

## PROTOCOLOS

### a. PROTOCOLO EBER (ISH)

	<b>KIT:</b> INFORM iVIEW Blue ISH
	<b>DESPARAFINACION:</b> Seleccionado, ampliado
	<b>ACONDICIONADOR CELULAR:</b> SUAVE
	<b>PROTEASA ISH 3:</b> NINGUNO
	<b>SONDA:</b> INFORM EBER Probe
<b>CONTRATINCION:</b> Red Counterstain II, 4 minutos	

### b. PROTOCOLO HER2 DUAL (ISH)

	<b>KIT:</b> ultraView SISH DNP Detection Kit
	<b>DESPARAFINACION:</b> Seleccionado, ampliado
	<b>ACONDICIONADOR CELULAR:</b> SUAVE
	<b>PROTEASA ISH 3:</b> NINGUNO
	<b>SONDA:</b> INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail
<b>CONTRATINCION:</b> Hematoxilina II	

### c. PROTOCOLO HER2 DAB

	<b>KIT:</b> ultraView Universal DAB Detection
	<b>DESPARAFINACION:</b> Seleccionado, ampliado
	<b>ACONDICIONADOR CELULAR:</b> SUAVE
	<b>PROTEASA ISH 3:</b> NINGUNO
	<b>SONDA:</b> anti-HER2
<b>CONTRATINCION:</b> Hematoxilina II	

## CONTROL DE EMISIÓN

	<b>Elaboró:</b>	<b>Revisó:</b>	<b>Autorizó:</b>
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	24-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> 15  <b>DE:</b> 22

d. PROTOCOLO KI-67 DAB

	<b>KIT:</b> ultraView Universal DAB Detection
	<b>DESPARAFINACION:</b> Seleccionado, ampliado
	<b>ACONDICIONADOR CELULAR:</b> SUAVE
	<b>PROTEASA ISH 3:</b> NINGUNO
	<b>SONDA:</b> CONFIRM anti-Ki-67 (30-9)
<b>CONTRATINCION:</b> Hematoxilina II	

e. PROTOCOLO RE DAB



	<b>KIT:</b> ultraView Universal DAB Detection
	<b>DESPARAFINACION:</b> Seleccionado, ampliado
	<b>ACONDICIONADOR CELULAR:</b> SUAVE
	<b>PROTEASA ISH 3:</b> NINGUNO
	<b>SONDA:</b> CONFIRM anti-Estrogen Receptor
<b>CONTRATINCION:</b> Hematoxilina II	

f. PROTOCOLO RP DAB

	<b>KIT:</b> ultraView Universal DAB Detection
	<b>DESPARAFINACION:</b> Seleccionado, ampliado
	<b>ACONDICIONADOR CELULAR:</b>
	<b>PROTEASA ISH 3:</b> NINGUNO
	<b>SONDA:</b> CONFIRM anti-Progesterone Receptor
<b>CONTRATINCION:</b> Hematoxilina II	

CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA: 16</b>  <b>DE: 22</b>

### Anexo 1

A continuación, se presentan las condiciones de procesamiento de los anticuerpos estandarizados en el laboratorio de inmunohistoquímica, correspondiendo al pretratamiento o recuperación necesaria previa a la tinción automatizada:

Anticuerpo	Recuperación			Tiempo de Incubación (min)
	Ninguno	EDTA 8	Proteasa	
ACTH		X		40
Actina	X			40
Adenovirus	X			40
AFP	X			40
ALK-1		X		40
Amiloide A		X		40
Andrógeno (receptor)		X		40
Aspergillus				40
Bcl-2		X		40
Bcl-6		X		40
Bombesina	X			40
BrdU			X	40
CA125		X		40
Calcitonina			4 MIN	40
Calretinina		X		40
Caspasa 3		X		40
Catenina □				40
Catenina □				40
CD10		X		40
CD103		X		40
CD105 Endoglina		X		40
CD117, c-kit		X		40
CD11c		X		40
CD138		X		40
CD15		X		40
CD19		X		40
CD-1a		X		40
CD2 (parafina)		X		40

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> 17  <b>DE:</b> 22

Anticuerpo	Recuperación			Tiempo de Incubación (min)
	Ninguno	EDTA 8	Proteasa	
CD20 cy		X		40
CD21		X		40
CD23		X		40
CD3		X		40
CD30		X		40
CD31		X		40
CD33		X		40
CD34		X		40
CD35			4MIN	40
CD4		X		40
CD43		X		40
CD44		X		40
CD45 (LCA)		X		40
CD45RO/RA		X		40
CD5		X		40
CD56		X		40
CD57		X		40
CD61			4 MIN	40
CD68		X		40
CD7 (parafina)		X		40
CD79a		X		40
CD8		X		40
CD95		X		40
CD99 (MIC-2)		X		40
Cdx-2				40
CEA	X			40
Cels. Dendríticas Foliculares		X		40
C-erb B-2		X		40
CGH			4 MIN	40
Ciclina D1		X		40
CK 19		X		40
CK 20		X		40
CK 5/6		X		40

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

**SALUD**

SECRETARÍA DE SALUD



# MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS

## Departamento de Patología

### 6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada


 INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

 CÓDIGO:  
M.T./ 0.2.4.2

REV: 01

HOJA: 18

DE: 22

Anticuerpo	Recuperación			Tiempo de Incubación (min)
	Ninguno	EDTA 8	Proteasa	
CK 7		X		40
CK alto		X		40
CK bajo (8)		X		40
CMV			4 MIN	40
c-Myc				40
Colágena IV		X		40
Componente P amiloide		X		40
Cromogranina A	X			40
Desmina			4 MIN	40
EBV (EBNA2)		X		40
EBV LMP-1		X		40
EBV ZEBRA		X		40
E-cadherina		X		40
EGFR			6 MIN	40
EMA		X		40
Estrógeno (Receptor)		X		40
Factor VIII		X		40
Fascina		X		40
Galectina 3		X		40
Gastrina			4 MIN	40
GFAP	X			40
GH	X			40
Glicoforina A	X			40
Glucagon	X			40
Granzima		X		40
Hepatocitos		X		40
Herpes 1 y 2		X		40
HIV p24		X		40
HMB45			4 MIN	40
HPV	X			40
Hsp-27				40
Hsp-70				40
Ig A	X			40
Ig D	X			40

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> 19
			<b>DE:</b> 22

Anticuerpo	Recuperación			Tiempo de Incubación (min)
	Ninguno	EDTA 8	Proteasa	
Ig E	X			40
Ig G	X			40
Ig M			4 MIN	40
Inhibina		X		40
Insulina	X			40
Kappa			4 MIN	40
Ki-67		X		40
Lactógeno Placentario		X		40
Lambda			4 MIN	40
Leucemia de células peludas		X		40
Lisozima (EC 3.2.1.17)			4 MIN	40
MB2		X		40
Mieloperoxidasa	X			40
Mioglobina	X			40
MOC-31				40
MUC-1				40
MUM-1		X		40
Myo D1		X		40
Natural Killer Cell like NK1		X		40
NSE		X		40
p14		X		40
p16		X		40
p19		X		40
p21		X		40
p27 k1p1		X		40
p53		X		40
Panqueratina (coctel)			4 MIN	40
Papilomavirus Bk	X			40
PCNA		X		40
PDGFRb			6 MIN	40
Perforina		X		40
PLAP		X		40
PPP			4 MIN	40

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> 20  <b>DE:</b> 22

Anticuerpo	Recuperación			Tiempo de Incubación (min)
	Ninguno	EDTA 8	Proteasa	
Progesterona (receptor)		X		40
Prolactina	X			40
PSA		X		40
PTH			4 MIN	40
Quimiotripsina		X		40
Rb		X		40
Rhizomucor				40
S-100	X			40
Serotonina		X		40
Sinaptofisina		X		40
Somatostatina	X			40
Survivina				40
T. Gondii		X		40
TdT		X		40
Tiroglobulina	X			40
Topoisomerasa II□		X		40
Tripsina			4 MIN	40
Trombomodulina	X			40
TSH	X			40
TTF-1		X		40
Tuberculosis (MTB)			4 MIN	40
Ulex Europeus Lectina		X		40
Vimentina		X		40
VIP (M-19)		X		40

## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS



No Aplica.

## 9.0 GLOSARIO DE TERMINOS

### 9.1 Acondicionador celular:

Es una solución acuosa útil para el acondicionamiento de muestras de células previo a la hibridación en los métodos de hibridación in situ.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA: 21</b>  <b>DE: 22</b>

- 9.2 Anticuerpo Monoclonal:** Los anticuerpos monoclonales son proteínas artificiales que actúan como anticuerpos humanos en el sistema inmunitario.
- 9.3 Anticuerpo Policlonal:** Los anticuerpos policlonales (pAbs) son una mezcla heterogénea de anticuerpos que generalmente son producidos por diferentes clones de células B en el cuerpo. Pueden reconocer y unirse a muchos epítodos diferentes de un solo antígeno.
- 9.4 EBER:** Hibridación in situ para Virus de Epstein Barr.
- 9.5 Enzima:** Las enzimas son moléculas orgánicas que actúan como catalizadores, es decir, que aceleran las reacciones químicas sin consumirse ni pasar a formar parte de los productos de esa reacción.
- 9.6 Recuperación Antigénica:** Es un sustrato que forma un precipitado de color insoluble que puede verse en un microscopio. Hay dos cromógenos de uso común: DAB (marrón) o AP (rojo)  
Proceso que se lleva a cabo mediante la eliminación de barreras moleculares que impiden el reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo.
- 9.7 Sistema de Detección:** El sistema de detección se basa en el anticuerpo secundario. La detección cromogénica moderna utiliza enzimas como la peroxidasa de rábano picante (HRP) que se conjugan (unen) a un anticuerpo. A las múltiples enzimas unidas al anticuerpo se las conoce como polímeros, y estas producen una tinción más intensa, ya que hay más moléculas a las que se puede unir el cromógeno.
- 9.8 Sonda:** Una sonda es una secuencia de ADN o ARN de cadena simple que se utiliza para encontrar su secuencia complementaria en el genoma de una muestra.
- 9.9 Solución de hibridación celular:** Se refiere a una solución acuosa útil para la hibridación de una sonda de ácido nucleico a un ácido nucleico diana.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Boenisch T, ed. Manual de métodos inmunohistoquímicos de coloración. 3ª. Edición. 2002. DakoCytomation.

Boenisch T. Appl Immunohistochem 1999;7:300-306.

Boenisch T. Appl Immunohistochem 2001;9:176-179.

Sternberger LA, Sternberger NH. J Histochem Cytochem 1986;34:599-605.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>6. Procedimiento Técnico para Realizar Inmunohistoquímica Automatizada</b>		<b>HOJA:</b> 22  <b>DE:</b> 22

Mikel UK, ed. Advanced laboratory methods in histology and pathology. 1994. Armed Forces Institute of Pathology.

NCCLS Quality Assurance for Immunocytochemistry approved guideline, December 1999 MM4-A Vol. 19 No.26 for more information on tissue controls.

Roche PC, et al. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. NR Rose Ed. ASM Press, 2002. ISBN 10: 1555812155 / ISBN 13: 9781555812157.

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN



Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>7. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción de Inmunofluorescencia</b>		<b>HOJA: 1</b> <b>DE: 10</b>

## 7. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR TINCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>7. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción de Inmunofluorescencia</b>		<b>HOJA:</b> 2  <b>DE:</b> 10

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Técnica que se basa en la tinción de células con anticuerpos generados contra una proteína diana que se conjuga directamente con un fluorocromo o se usa junto a un anticuerpo secundario conjugados.

## 2.0 OBJETIVO

Realizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta de las muestras biológicas, contribuyendo en la emisión de diagnósticos anatomopatológicos para el diagnóstico y tratamiento de las tratantes de las personas beneficiarias.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE LA SALUD QUE PARTICIPA

1. Médica o Médico Especialista en Patología.
2. Coordinadora de Laboratorio de Inmunohistoquímica.
3. Técnica o Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica.


## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1. Micropipeta 20-200ul
2. Micropipeta 100- 1000ul
3. Micropipeta 2 – 20 ul
4. Puntillas para micropipeta 200 ul
5. Puntillas para micropipeta 1000ul
6. Agua bidestilada
7. Inmuno wash buffer
8. Vasos Koplik
9. Vortex mixer
10. Laminillas electrocargadas
11. Sistema de detección
12. Anticuerpos primarios

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

No requiere instalaciones especiales para desarrollar el procedimiento.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>7. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción de Inmunofluorescencia</b>		<b>HOJA:</b> 3  <b>DE:</b> 10

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECIFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.  
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas


Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

Reglamento Interno de la Comisión Nacional de Arbitraje Médico.  
D.O.F. 03-II-2004

Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.  
D.O.F. 19-IV-2004 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>7. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción de Inmunofluorescencia</b>		<b>HOJA:</b> <b>4</b>  <b>DE:</b> <b>10</b>

## DECRETOS

Decreto por el que la Secretaría de Salubridad y Asistencia organizará el registro Nacional de Cáncer, como programa permanente destinado a la prevención información y asesoría en la lucha contra el cáncer.

D.O.F 17-XI-1982

## NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de cáncer del cuello uterino  
D.O.F. 16-I-1995

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.  
D.O.F 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas  
D.O.F. 02-II-1999

Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo  
D.O.F. 17-II-2003

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo  
D.O.F 09-XII-2008



Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos  
D.O.F. 27-III-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica  
D.O.F. 19-II-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico  
D.O.F. 15-X-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA3-2012, Que establece las características mínimas en relación a infraestructura y equipamientos de laboratorios de Anatomía Patológica, hospitales y consultorios de atención médica especializada  
D.O.F. 08-I-2013

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>7. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción de Inmunofluorescencia</b>		<b>HOJA: 5</b>  <b>DE: 10</b>

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.

D.O.F. 21-II-2017

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DEL PROCEDIMIENTO

### Tinción de Inmunofluorescencia:

1. La Médica o el Médico Especialista en Patología selecciona el caso que amerita examen de inmunofluorescencia.
2. Avisa al Coordinador de Laboratorio de Inmunohistoquímica el número de caso y las pruebas a realizar.
3. El Coordinador de Laboratorio de Inmunohistoquímica avisa a la Técnica o el Técnico de Laboratorio de inmunohistoquímica para realizar el número de cortes que se llevarán a cabo para inmunofluorescencia.
4. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica realiza cortes por congelación en tejido fresco, que previamente fué congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  y embebido en medio crioprotector (OCT Optimal Cutting Temperature) para evitar la formación de cristales. (El tejido a procesar se conserva en el ultra congelador hasta que se realizan los cortes).



5. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica realiza 9 cortes a  $1.5\ \mu\text{m}$  en laminillas con cantos pulidos y banda mate. Las laminillas se dejan secar a temperatura ambiente hasta que todo el líquido se haya evaporado.

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022



	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>7. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción de Inmunofluorescencia</b>		<b>HOJA:</b> 6  <b>DE:</b> 10



6. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica marca con lápiz diamante por el reverso de la laminilla la posición del tejido, se aplica el anticuerpo fluoresceínado, incubando por 30 minutos en oscuridad.
7. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la Técnica o el Técnico del Laboratorio de Inmunohistoquímica enjuaga las laminillas 5 minutos en inmersión en buffer de lavado y las montan con medio de montaje acuosos.
8. La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica guarda las laminillas protegidas de la luz y en refrigeración hasta ser revisadas por la Médica o el Médico Especialista en Patología en el microscopio de fluorescencia.



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licono	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>7. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción de Inmunofluorescencia</b>		<b>HOJA:</b> 7 <b>DE:</b> 10

Los anticuerpos que se marcan para inmunofluorescencia son: IgA, IgG, IgM, C1q, C3c, C4, Fibrinógeno, cadenas kappa y cadenas lambda. Se emplea una dilución de 1:40 en todos los casos.

#### Preparación de reactivos:

La Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica prepara y mantiene un stock de reactivos y anticuerpos para la inmunotinción manual y automatizada e inmunofluorescencia que se realizan en el Departamento.

Los anticuerpos se diluyen dependiendo de la recuperación recomendada por el fabricante y previa titulación en el laboratorio. Todos los anticuerpos se diluyen en diluyente para anticuerpos, Diamond Cell Marque. Las diluciones más utilizadas son:

Dilución	Anticuerpo	Diluyente	Volumen total
1:40	1 ul	39 ul	40 ul
1:100	1 ul	99 ul	100 ul
1:200	1 ul	199 ul	200 ul
1:250	1 ul	249 ul	250 ul

El buffer de lavado es IHC WASH BUFFERS PLUS TWEEN 20 Cell Marque, viene concentrado 20X, se diluye en agua destilada. No es necesario ajustar el pH.

Buffer de lavado	50 ml.
Agua destilada	950 ml.
<b>Volumen total</b>	<b>1000 ml.</b>

El buffer de recuperación es Diva Decloaker o EDTA Decloaker de Biocare, viene concentrado 20X, se debe mantener en refrigeración a 4°C y se diluye a 1X al momento de ser utilizada.



Diva Decloaker	5 ml
Agua destilada	95 ml
<b>Volumen total</b>	<b>100 ml</b>

#### MANEJO DE DESECHOS:

En el laboratorio de inmunohistoquímica se generan desechos que la Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica desecha de la siguiente manera:

1. Xilol: Empleado para desparafinar y deshidratar. Se desecha en recipientes marcados como **Xilol de desecho**, que se acumulan junto con el desecho similar del laboratorio de Histotecnología y son llevados como residuos peligrosos a la Coordinación de Control Ambiental.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>7. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción de Inmunofluorescencia</b>		<b>HOJA:</b> 8 <b>DE:</b> 10

2. Alcohol: Empleado para desparafinar y deshidratar. Se desecha en recipientes debidamente marcados como **Alcohol de desecho**, que se acumulan junto con el desecho similar del laboratorio de Histotecnología y son llevados como residuos peligrosos a la Coordinación de Control Ambiental.
3. Residuos de diaminobencidina (DAB): La diaminobencidina es potencialmente carcinogénico y sus residuos se inactivan con cloro al 10% antes de ser desechados.
4. Residuos de tinción del equipo: El sistema automatizado tiene una botella de recolección de residuos. Dentro de estos residuos hay DAB y parafina líquida que emplea el sistema, antes de desechar, añadir 50 ml de cloro, y llevarlos como residuos peligrosos a la Coordinación de Control Ambiental.
5. Los restos de vidrio se depositan en recipiente rojo para objetos punzantes.


#### PROCEDIMIENTOS DE VERIFICACIÓN / CONTROL DE CALIDAD

1. La Médica o el Médico Especialista en Patología encargado del área revisa aleatoriamente las laminillas para valorar la calidad de las tinciones.
2. Si la Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica detecta marca inespecífica de fondo, se consulta directamente con la Médica o el Médico Especialista en Patología a cargo.
3. Si la Técnica o el Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica encargado del laboratorio detecta marca inadecuada en intensidad o especificidad en el control positivo presente en la laminilla, consulta directamente con la Médica o el Médico Especialista en Patología a cargo.
4. La Médica o el Médico Especialista en Patología a cargo evalúa si el caso cuenta con control positivo interno adecuado o no para aprobar la inmunotinción o desecharla.
5. El Técnico de Laboratorio de Inmunohistoquímica prepara, titula y evalúa los anticuerpos previos a su empleo en casos de estudio bajo la supervisión del Coordinador de Laboratorio de Inmunohistoquímica.
6. Todas las modificaciones a los protocolos establecidos son evaluadas por la Médica o el Médico Especialista en Patología a cargo del área y en concordancia, aprobadas por el Jefe del Departamento de Patología.

Es importante mencionar que la calidad de la inmunotinción depende de condiciones de procesamiento previo a su manipulación en el laboratorio de inmunohistoquímica, entre estos factores se incluyen:

- a. Fijación adecuada del tejido.
- b. Tamaño adecuado de la muestra biológica de tejido incluida por bloque.
- c. Procesamiento adecuado del tejido (soluciones de alcohol, xilol y parafina adecuadas).
- d. Temperatura y tiempo de procesamiento adecuados.
- e. Corte del tejido de no más de 4 µm.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>7. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción de Inmunofluorescencia</b>		<b>HOJA: 9</b>  <b>DE: 10</b>

## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

## 9.0 GLOSARIO DE TERMINOS

- 9.1 Fluorocromo:** Es un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente.
- 9.2 Inmunofluorescencia:** Es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula.
- 9.3 Inmunofluorescencia directa:** Se utiliza para diagnosticar enfermedades de tipo autoinmunitario.
- 9.4 Inmunotinción:** Es una palabra que usan los patólogos para describir una prueba llamada inmunohistoquímica.
- 9.5 Inactivar:** Supresión del efecto tóxico de un germen o una toxina, conservando propiedades de utilidad para la terapéutica.
- 9.6 Ultracongelador:** Es un refrigerador y congelador de laboratorio que permite almacenar de forma segura y fiable sustancias volátiles o inflamables, reactivos, productos químicos, sustancias tóxicas y muestras con interiores libres de chispas para así reducir el riesgo de explosiones internas.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Boenisch T, ed. Manual de métodos inmunohistoquímicos de coloración. 3ª. Edición. 2002. DakoCytomation.

Boenisch T. Appl Immunohistochem 1999; 7:300-306.

Boenisch T. Appl Immunohistochem 2001; 9:176-179.

Sternberger LA, Sternberger NH. J Histochem Cytochem 1986; 34:599-605.

Mikel UK, ed. Advanced laboratory methods in histology and pathology. 1994. Armed Forces Institute of Pathology.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>7. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción de Inmunofluorescencia</b>		<b>HOJA:</b> 10 <b>DE:</b> 10



NCCLS Quality Assurance for Immunocytochemistry approved guideline, December 1999 MM4-A Vol. 19 No.26 for more information on tissue controls.

Roche PC, et al. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. NR Rose Ed. ASM Press, 2002. ISBN 10: 1555812155 / ISBN 13: 9781555812157.

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN



Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> 1 <b>DE:</b> 25

## 8. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA DETECTAR MUTACIONES MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> <b>2</b>  <b>DE:</b> <b>25</b>

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

La pirosecuenciación es una tecnología que permite determinar el orden de los nucleótidos, cuantifica la proporción de los alelos presentes en la muestra biológica. La técnica consiste en 2 pasos principales posteriores a la obtención del ADN a analizar: a) Reacción de PCR y unión a perlas de sefarosa y b) reacción de pirosecuenciación.

## 2.0 OBJETIVO

Detectar mutaciones de los genes BRAF, NRAS y KRAS en células del tejido tumoral proveniente de personas beneficiarias con diversos tipos de cáncer. Las mutaciones en los genes mencionados se asocian a mayor riesgo de persistencia y recidiva de diversos tipos de cáncer y puede modificar el tratamiento y el seguimiento de las mismas.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participa en el procedimiento cuenta con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.

1. Coordinadora del Laboratorio del Laboratorio de Biología Molecular.
2. Técnica o Técnico de Laboratorio de Biología Molecular.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

Material biológico:

Laminilla con el tejido de interés y marcada en el área a ser analizada.



Reactivos:

### 1. Materiales

La mayoría de los materiales y reactivos enlistados para la preparación de soluciones pueden adquirirse sin especificar la marca comercial. Lo único que se requiere es que los productos sean de grado biología molecular que son materiales y reactivos libres de DNAsas y RNAsas.

También se enlistan materiales y reactivos de marcas específicas debido a que son de uso exclusivo para equipos del Departamento de Patología y son sistemas cerrados que solo aceptan reactivos de la misma marca que el equipo.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> 3  <b>DE:</b> 25



Extracción de ADN de tejido tumoral:

- I. Buffer ATL: Buffer de lisis de tejidos.
- II. Buffer AL: Buffer de lisis de leucocitos.
- III. Proteinasa K: Mantener almacenada a temperatura ambiente hasta su uso.
- IV. Etanol al 96-100%: Mantener en refrigeración (4°C).
- V. Carrier RNA: Cada alícuota se puede descongelar un máximo de 3 veces.
- VI. Buffer AW1: Almacenarse a temperatura ambiente (15–25°C) sin problemas de caducidad.
- VII. Buffer AW2: Almacenarse a temperatura ambiente (15–25°C) sin problemas de caducidad.
- VIII. Columnas QIAamp MinElute: Mantener las columnas almacenadas a 4 °C hasta su uso.
- IX. Buffer AE o ATE: mantener almacenado a temperatura ambiente.

Amplificación por PCR de los genes *BRAF*, *NRAS* y *KRAS*:

- I. *BRAF* Pyro Kit (24) Catalogo no. 970470.
  - II. PCR Primer *BRAF* 600.
  - III. PCR Primer *BRAF* 464–469.
  - IV. Mezcla de PCR PyroMark 2X.
  - V. Concentrado CoralLoad® 10x .
  - VI. H<sub>2</sub>O 3 x 1.9 ml.
  - VII. Control negativo de ADN, 10 ng/μl 100 μ.
  - VIII. Agua libre de nucleasas.
- I. *NRAS* Pyro Kit (24) Catalogo no. 970530.
  - II. PCR Primer *NRAS* 12-13.
  - III. PCR Primer *NRAS* 61.
  - IV. Mezcla de PCR PyroMark 2X.
  - V. Concentrado CoralLoad® 10x.
  - VI. H<sub>2</sub>O 3 x 1.9 ml.
  - VII. Control negativo de ADN, 10 ng/μl 100 μ.
  - VIII. Agua libre de nucleasas.
- I. *KRAS* Pyro Kit (24) Catalogo no. 970460.
  - II. PCR Primer *KRAS* 12-13.
  - III. PCR Primer *KRAS* 61.
  - IV. Mezcla de PCR PyroMark 2X.
  - V. Concentrado CoralLoad® 10x.
  - VI. H<sub>2</sub>O 3 x 1.9 ml.
  - VII. Control negativo de ADN, 10 ng/μl 100 μ.
  - VIII. Agua libre de nucleasas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Taniñóto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA: 4</b>  <b>DE: 25</b>

Electroforesis:

- I. Agarosa, LE, Grado analítico de baja electroendosmosis. Presentación 500 mg (Cualquier marca).
- II. Na OH.
- III. Trizma base.
- IV. Ácido bórico.
- V. EDTA.

Purificación de productos de PCR:



- I. Sefarosa de alto rendimiento acoplada a estreptoavidina (GE Healthcare, cat. no.17-5113-01).
- II. Solución de desnaturalización PyroMark.
- III. Buffer de lavado PyroMark 10x.

Reacción de secuenciación de los genes *BRAF*, *NRAS* y *KRAS*:

- I. Seq Primer *BRAF* 600.
  - II. Seq Primer *BRAF* 464–469.
  - III. Buffer de union PyroMark.
  - IV. Buffer de alineamiento PyroMark.
  - V. Mezcla de enzima.
  - VI. Sustrato.
  - VII. dATP.
  - VIII. dCTP.
  - IX. dGTP.
  - X. dTTP.
- 
- I. Seq Primer *NRAS* 12-13.
  - II. Seq Primer *NRAS* 61.
  - III. Buffer de union PyroMark.
  - IV. Buffer de alineamiento PyroMark.
  - V. Mezcla de enzima.
  - VI. Sustrato.
  - VII. dATP.
  - VIII. dCTP.
  - IX. dGTP.
  - X. dTTP.
- 
- I. Seq Primer *KRAS* 12-13.
  - II. Seq Primer *KRAS* 61.
  - III. Buffer de union PyroMark.
  - IV. Buffer de alineamiento PyroMark.
  - V. Mezcla de enzima.
  - VI. Sustrato.
  - VII. dATP.
  - VIII. dCTP.
  - IX. dGTP.
  - X. dTTP.

**CONTROL DE EMISIÓN**

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> 5  <b>DE:</b> 25

Equipo:

1. Centrífuga
2. Guantes desechables
3. Gradillas
4. Tubos eppendorf 1.5ml
5. Tubos eppendorf 0.6ml
6. Vaso de precipitado
7. Frascos de 20 ml con tapón
8. Micropipetas 1000, 200, 100, 10 y 2  $\mu$ l
9. Puntas para micropipeta de 1000, 200, y 10  $\mu$ l
10. Cámara de electroforesis horizontal
11. Sistema de documentación de geles
12. Espectrofotómetro Nanodrop, marca ThermoFisher®
13. Termociclador de punto final
14. Placa de calentamiento a 80 C
15. Agitador Vortex
16. PyroMark Q24 Vacuum Workstation (cat. no. 9001516 [110V])
17. Pirosecuenciador Pyromark Q24

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

No se requiere de instalaciones especiales para la realización de esta técnica.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas



### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> <b>6</b>  <b>DE:</b> <b>25</b>

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

**REGLAMENTOS**

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.  
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

Reglamento Interno de la Comisión Nacional de Arbitraje Médico.  
D.O.F 03-II-2004

Reglamento Interior de la Secretaria de Salud.  
D.O.F. 19-IV-2004 y sus reformas

**DECRETOS:**

Decreto por el que la Secretaria de Salubridad y Asistencia organizará el registro Nacional de Cáncer, como programa permanente destinado a la prevención información y asesoría en la lucha contra el cáncer.  
D.O.F 17-XI-1982

**NORMAS OFICIALES**

Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de cáncer del cuello uterino.  
D.O.F. 16-I-1995

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.  
D.O.F. 01-07-1996

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Taniimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> <b>7</b>  <b>DE:</b> <b>25</b>

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.

D.O.F 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-001-STPS-2008, Edificios, locales, instalaciones y áreas en los centros de trabajo Condiciones de seguridad.

D.O.F. 24-XI-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.

D.O.F 09-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.

D.O.F. 19-II-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.

D.O.F. 15-X-2012

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.

D.O.F. 09-X-2015

Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.

D.O.F. 27-I-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.

D.O.F. 21-II-2017

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

La Coordinadora del Laboratorio de Biología Molecular y la Técnica o el Técnico de Biología Molecular son responsables de realizar las siguientes actividades:

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

Etanol 70%


Etanol absoluto            70.0ml

Agua destilada            30.0

Homogenizar perfectamente y almacenar en un frasco a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Kit QIAamp DNA Mini (250) Marca Qiagen. Cat No./ID: 51306

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> <b>8</b>  <b>DE:</b> <b>25</b>

El kit está compuesto por los siguientes reactivos y algunos tienen que ser preparados antes de su uso:

Buffer ATL: Buffer de lisis de celular.

Buffer AL: Buffer de lisis de leucocitos.

Proteinasa K: Mantener almacenada a temperatura ambiente hasta su uso.

Etanol al 96-100%: Mantener en refrigeración (4°C).

Buffer AW1: Antes de su uso se agregan 25 ml etanol (96–100%) al frasco que contiene 19 ml de buffer AW1 concentrado. Una vez diluido con el etanol, el buffer AW1 puede almacenarse a temperatura ambiente (15–25°C) sin problemas de caducidad. Antes de cada procedimiento se agita.

Buffer AW2: Antes de su uso se agregan 30 ml etanol (96–100%) al frasco que contiene 13 ml de buffer AW2 concentrado. Una vez diluido con el etanol, el buffer AW2 puede almacenarse a temperatura ambiente (15–25°C) sin problemas de caducidad. Antes de cada procedimiento tiene que agitarse

Columnas QIAamp: Mantener las columnas almacenadas a temperatura ambiente (15–25°C).

Buffer AE: mantener almacenado a temperatura ambiente.

Cloro al 0.6%

Cloro al 7%

Agua destilada

Homogenizar y almacenar a temperatura ambiente.

Homogenizar la solución, concentración inicial es 0.8%. Al final del procesamiento la concentración final de la solución es del 0.6%. La muestra biológica se inactiva aproximadamente 45 minutos, tiempo restante para finalizar el procedimiento de extracción de ADN y se desecha en el drenaje.

Electroforesis

EDTA 0.5M, pH 8

EDTA                    186.1g

NaOH                    19 a 20 g para ajustar pH

Aforar a 1.0 lt con agua destilada. Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente

TBE 10x

Trizma base            108.0g

Acido bórico            55.0g

EDTA                    40.0 ml del stock 0.5, pH 8

Aforar a 1 lt con agua destilada. Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente

TBE 1x

TBE 10 X                10.0 ml

Aforar a 100 ml con agua destilada



Gel de agarosa 1%

Agarosa                1.0g

TBE 1X                100ml

La solución se calienta hasta que el agarosa se disuelve, adicionar 1.5 ml de una solución de bromuro de etidio 10mg/ml. Verter a la cámara de electroforesis y esperar 45 min. aproximadamente a que polimerise el gel.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto López	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> 9  <b>DE:</b> 25

Gel de agarosa 3%

Agarosa 3.0g

TBE 1X 100ml

La solución se calienta hasta que el agarosa se disuelve, adicionar 3.0 ml de una solución de bromuro de etidio 10mg/ml. Verter a la cámara de electroforésis y esperar 45 min. aproximadamente a que polimerise el gel.

Buffer de carga

Azul de bromofenol (0.25%) 0.25 g

Xilen-cianol (0.25%) 0.25 g

Glicerol (30%) 30 ml

Disolver el glicerol en agua destilada y homogenizar la solución con agitación, posteriormente adicionar los colorantes y aforar a 100ml con agua destilada.

#### Aceptabilidad:

La aceptabilidad de un reactivo está determinada por la presentación de la fecha de caducidad y de los insertos con las especificaciones de cada uno de los reactivos que así lo ameriten

#### Almacenamiento y estabilidad:

Los reactivos se mantendrán almacenados de acuerdo con las condiciones que indique el fabricante. En el caso de reactivos que se mantienen a una temperatura de 4oC o -20oC

#### Extracción de ADN de células tumorales

Los pasos básicos involucrados en la extracción de ADN de células cultivo y tejidos animales son los mismos La mayoría de las células de cultivo son más fáciles de lisar utilizando sólo detergentes. Sin embargo, el tejido necesita primero ser homogeneizado mecánicamente o tratando con enzimas (proteínasa K) para ser lisado. La lisis celular es seguida de la separación del ADN de otros componentes celulares y su purificación.

Protocolo para extraer AND de tejido parafinado fijado en portaobjetos con columnas de sílica:

El ADN se une específicamente a membranas/esferas/partículas de sílica en presencia de ciertas sales y a un pH particular. Se utilizan sales caotrópicas para promover la desnaturalización de proteínas y la extracción del ADN. Los contaminantes celulares son eliminados mediante diferentes pasos de lavado. El ADN es eluido o desprendido de la membrana usando agua o en un búfer de baja salinidad o búfer con tris y EDTA.

Antes de la extracción:

- Si el material a extraer está fijado a la laminilla sin cubreobjetos, colocarla en un vaso coplin con xilol durante 2 minutos, luego se deja secar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Si el material a extraer está fijado a la laminilla con cubreobjetos, colocarla en un vaso coplin con xilol durante dos días para despegar el cubreobjetos. Si no se despegar dejar una noche más. Una vez despegado el cubreobjetos dejar secar durante 5 minutos a temperatura ambiente.



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA: 10</b>  <b>DE: 25</b>

Extracción:

1. Despegar las células con una punta de micropipeta agregando 20 µl Buffer ATL y colocarlas en un tubo de microcentrifuga de 0.2 ml
  2. Agregar 180 µl de buffer ATL y 30 µl de proteinasa K, mezclar en el agitador vortex por 15 seg.
  3. Colocar el tubo con la muestra biológica en un termo-mixer o una incubadora a 56°C Si el tubo se coloca termo-mixer, dejarlo agitando por 1:30 horas. Si es en incubadora sin agitación dejarlo toda la noche.
  4. Agregar 200 µl de buffer AL, 1 µl de carrier RNA, cerrar el tubo y agitar por 15 seg. Para que la lisis celular sea eficiente es necesario mezclar el buffer AL hasta formar una mezcla homogénea.
  5. Agregar 50 µl de etanol (96–100%), cerrar el tubo y mezclar en vortex por 15 seg. Incubar después 5 min a temperatura ambiente (15–25°C).
- \*\*Nota:** Si la temperatura del laboratorio es superior a 25°C, mantener el etanol en hielo antes de agregar al tubo.
6. Centrifugar rápidamente el tubo de 0.2 ml para bajar las gotas de la tapa.
  7. Con una micropipeta transferir todo el lisado a la columna QIAamp MinElute que se encuentra dentro de un tubo de colecta. Es importante evitar tocar la membrana de la columna con la punta de la micropipeta.
  8. Cerrar la columna y centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Colocar la columna QIAamp MinElute en un tubo de colecta nuevo y desechar la solución centrifugada.
  9. Abrir la columna QIAamp MinElute y agregar 500 µl de Buffer AW1 sin tocar la membrana. Cerrar el tubo y centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Colocar la columna en un tubo de colecta nuevo y desechar la solución centrifugada.
  10. Abrir la columna QIAamp MinElute y agregar 650 µl de Buffer AW2 sin tocar la membrana. Cerrar el tubo y centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Colocar la columna en un tubo de colecta nuevo y desechar la solución centrifugada.
  11. Abrir la columna QIAamp MinElute y agregar 650 µl de etanol (96–100%) sin tocar la membrana. Cerrar el tubo y centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Colocar la columna en un tubo de colecta nuevo y desechar la solución centrifugada.
  12. Centrifugar a máxima velocidad (14,000 rpm) por 3 min para secar la membrana completamente.
  13. Colocar la columna QIAamp MinElute column en un tubo limpio de 1.5 ml y desechar la solución del tubo de colecta. Abrir la tapa de la columna e incubar 10 min a temperatura ambiente o 3 min a 56°C
  14. Agregar a la membrana de la columna 20–30µl de Buffer AE agua bidestilada. Cerrar el tubo e incubar 5 min a temperatura ambiente. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad (14,000 rpm) por 1 min.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> <b>11</b>  <b>DE:</b> <b>25</b>

### CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS:

La cuantificación del ADN se realiza en el espectrofotómetro Nanodrop Marca Termofisher® (Fig 3) y para ello se aplica una 1 microlitro de muestra biológica en el lector óptico del equipo. La absorbancia de luz de la muestra biológica será documentada empleando el programa ND-1000 instalado en la computadora conectada al equipo.




En el caso de ADN de doble cadena, una unidad densidad óptica (D.O.) equivale a 50 mg/ml o 50 ng/μl. Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas.

Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos, resina de las columnas de purificación.

### AMPLIFICACIÓN POR PCR:

Para la amplificación por PCR de cada una de las secuencias de los genes de interés (*BRAF*, *NRAS*, *KRAS*) se utilizarán la mezcla de enzima Pyromark PCR Master de la marca Qiagen® que contiene 250 unidades de AND polimerasa HotStarTaq, Buffer de PCR con 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs a una concentración 400 μM C/U, y Agua libre de RNAsas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> <b>12</b>  <b>DE:</b> <b>25</b>

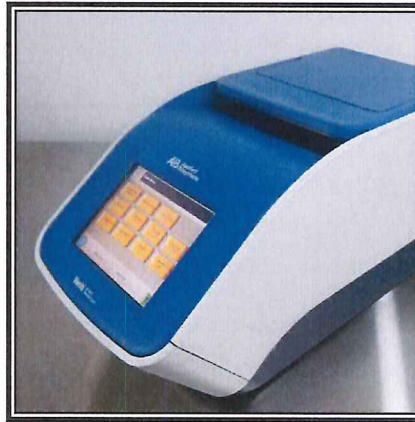


Fig. 4 Termociclador

Se prepara una mezcla de reacción para el fragmento de interés de acuerdo con los siguientes volúmenes de reactivo:

Concentración del stock de reactivos	Concentración final de los reactivos en la reacción	1 reacción de 15 µl
Pyromark PCR mastermix 2x	Pyromark PCR mastermix 1 x	7.5 µl
Primer 10X	Primer 0.8 X	0.12 µl
ADN 20 ng/µl	ADN 100 ng/µl	2 µl
Agua	Agua	5.26 µl

Las condiciones de amplificación para el fragmento 1 son:

- Paso 1: 94°C/15 min
- Paso 2: 94°C/45 seg
- Paso 3: 53°C/45 seg
- Paso 4: 72°C/45 seg
- Paso 5: repetir del paso 2 al 4 40 veces
- Paso 6: 72°C/7 min
- Paso 7: 4°C ∞

Una vez corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa que el fragmento fue amplificado y coincide con el tamaño esperado para la secuenciación

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> 13 <b>DE:</b> 25

**ELECTROFORESIS:**

Para visualizar ADN total o amplificados se prepara un gel pequeño. Es necesario pesar 1 gr de agarosa y disolver en 50 ml de buffer TBE 1X, calentar en microondas hasta disolver completamente (2 min). Agregar 5 µl de SybrGreen (10000x). Agitar y vaciar en la base (Fig 4).

Para visualizar el ADN se coloca el gel en un transiluminador que tiene lámparas de luz ultravioleta por lo que tiene que evitarse al máximo mirarla directamente durante la visualización del ADN. La exposición a ella tiene que ser mínima y empleando siempre protección para cara, ojos (careta y/o lentes) y manos (guantes).

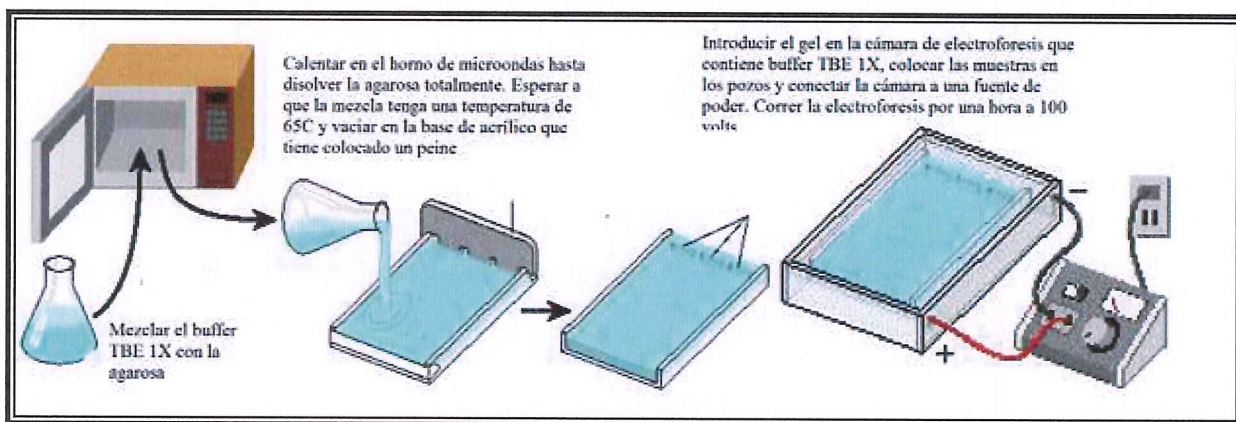


Fig. 4 Preparación de gel de agarosa y electroforesis.



Evitar el contacto con las manos, piel y ojos, por lo que se utiliza guantes durante su manipulación.

**REACCIÓN DE PYROSECUENCIACIÓN:**

Antes de empezar:

1. Dejar que todos los reactivos y soluciones necesarios alcancen la temperatura ambiente (15-25°C) antes de comenzar.
2. Encender el equipo PyroMark Q24 al menos 30 minutos antes de comenzar la prueba. El interruptor de encendido se encuentra en la parte posterior del instrumento.
3. Colocar un soporte de placas PyroMark Q24 en un bloque de calentamiento precalentado a 80°C.
4. Dejar un segundo portaplacas PyroMark Q24 a temperatura ambiente (15-25°C).
5. El buffer de lavado PyroMark se suministra como un concentrado 10x. Antes de utilizarlo por primera vez, diluir la solución de trabajo 1x añadiendo 225 ml de agua libre de nucleasas a 25 ml de buffer de lavado PyroMark 10x (volumen final de 250 ml).
6. Preparar la estación de trabajo de vacío PyroMark Q24.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tapimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> 14 <b>DE:</b> 25

**PROCEDIMIENTO:**

1. Agitar suavemente el frasco que contiene Sefarosa de alto rendimiento acoplada a estreptoavidina hasta que sea una solución homogénea.
2. Preparar una mezcla maestra para la inmovilización de ADN de acuerdo con la siguiente:  
Prepare un volumen mayor que el necesario para el número total de reacciones a realizar (para el número de reacciones + una extra).

**Reacción de inmovilización del ADN**

Reactivo	Volumen por muestra biológica ( $\mu$ l)
Buffer de unión PyroMark	40
Agua libre de ADNasas y ARNasas	29
Sefarosa	1
Volumen total	70

3. Añadir 70  $\mu$ l de la mezcla maestra a tubos de PCR, se recomienda que sean tubos en tira.
4. Añadir 10  $\mu$ l de producto de PCR biotinilado. El volumen total por pozo tiene que ser de 80  $\mu$ l tras la adición de la mezcla maestra y el producto de la PCR.
5. Sellar los tubos de PCR y asegurar de que no haya fugas entre los tubos
6. Agitar la placa PCR a temperatura ambiente (15-25°C) durante 5-10 minutos a 1400 rpm. Durante este paso, proceder inmediatamente con la preparación del cartucho de la secuenciación.

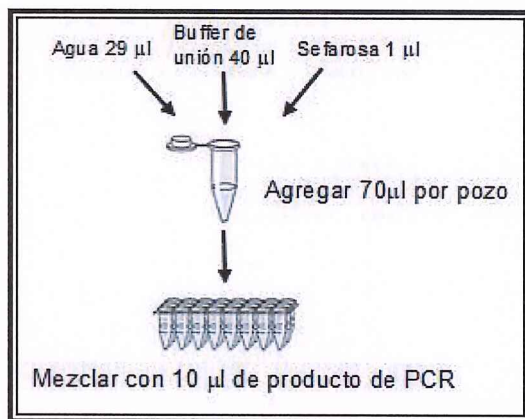




Fig. 5 Reacción de inmovilización del ADN

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> 15 <b>DE:</b> 25

### PURIFICACIÓN DE MEZCLA DE PCR Y SEPHAROSA:

Procedimiento:

1. Diluir una cantidad suficiente de cada primer de secuenciación, Seq Primer *BRAF* 600 o Seq Primer *BRAF* 464-469, en el buffer de secuenciación PyroMark como se indica en la tabla siguiente:

Preparar un volumen de primer de secuenciación diluido mayor que el necesario para el número total de muestras biológicas a secuenciar (para el número de muestra biológicas + una extra). No diluya y almacene más primer de secuenciación.

#### Dilución de primers de secuenciación de la mutación en el codón 600

Reactivo	Volumen por muestra biológica ( $\mu$ l)
Buffer de alineamiento PyroMark	24.6
Primer de secuenciación <i>BRAF</i> 600	0.4
Volumen total	25

2. Añadir 25  $\mu$ l de primer de secuenciación diluido en cada pozo de la placa PyroMark Q24 de acuerdo con la configuración del experimento. Mantener uno de los soportes de placas PyroMark Q24 (suministrados con la estación de trabajo de vacío PyroMark Q24) a temperatura ambiente (15-25°C), y utilícelo como soporte al preparar y mover la placa.
3. Encender la bomba de vacío de la estación de trabajo de vacío PyroMark Q24.
4. Colocar los tubos con los productos de PCR del Protocolo 3 y la placa PyroMark Q24 en la estación de vacío (Figura 6).
5. Inspeccionar los tubos de PCR y revisar que las perlas de sefarosa están en solución.

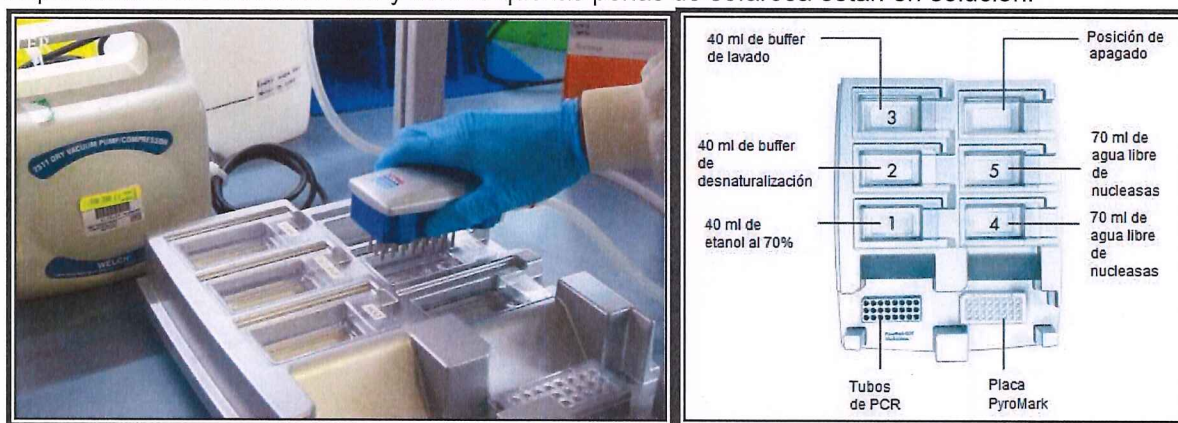



Figura 6. Estación de vacío PyroMark Q24

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> 16 <b>DE:</b> 25

6. Aplicar el vacío del dispositivo abriendo el interruptor para ello.
7. Bajar lentamente las sondas de filtro del dispositivo de vacío a los tubos de PCR para capturar las perlas que contienen la plantilla inmovilizada. Mantenga las sondas en su lugar durante 15 segundos. Tenga cuidado al recoger el dispositivo de vacío. Las perlas de sefarosa se sedimentan rápidamente. La captura de las perlas se coloca en un lugar específico inmediatamente después de la agitación. Si ha transcurrido más de 1 minuto desde que se agitación de la placa, vuelva a agitarla durante 1 minuto antes de capturar las microesferas. Inspeccione los tubos de PCR para comprobar que el dispositivo de vacío ha captado completamente todas las muestras biológicas.
8. Transferir el dispositivo de vacío a la cubeta que contiene 40 ml de etanol al 70% (Figura 6). Enjuague las sondas del filtro durante 5 segundos.
9. Transferir el dispositivo de vacío a la cubeta que contiene 40 ml de de solución de desnaturalización (Figura 6). Enjuague las sondas de filtrado durante 5 segundos.
10. Transferir el dispositivo de vacío a la cubeta que contiene 50 ml de buffer de lavado (Figura 3). Enjuague las sondas de filtrado durante 10 segundos.
11. Levantar el dispositivo de vacío hacia arriba y hacia atrás, más allá de los 90° verticales, durante 5 segundos para drenar el líquido de las sondas del filtro (Figura 7).

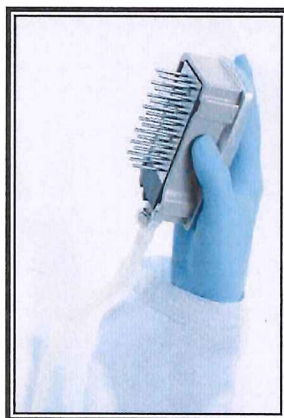




Figura 7. Ilustración del dispositivo de vacío elevada hasta más allá de los 90° de verticalidad

12. Cerrar el interruptor de vacío del dispositivo (off), mientras el dispositivo de vacío se mantiene sobre la placa PyroMark Q24.
13. Liberar las perlas en la placa PyroMark Q24 bajando las sondas del filtro en el primer de secuenciación diluido y moviendo la herramienta de vacío, de un lado a otro. Tenga cuidado de no dañar la superficie de la placa PyroMark Q24 rayándola con las sondas de filtrado.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> <b>17</b>  <b>DE:</b> <b>25</b>



14. Transfiera el dispositivo de vacío al contenedor con agua libre de nucleasas (Figura 6) y agítelo durante 10 segundos.
15. Lave los filtros del dispositivo de vacío sumergiéndolas en agua libre de nucleasas (Figura 6) y aplicando el vacío. Enjuague los filtros nuevamente con 70 ml de agua libre de nucleasas.
16. Levante el dispositivo de vacío hacia arriba y hacia atrás, más allá de la vertical de 90°, durante 5 segundos para drenar el líquido del filtro (Figura 7).
17. Cierre el interruptor de vacío del aspirador (Off), y coloque el aspirador en la posición de estacionamiento (P).
18. Apague la bomba de vacío. Al final de una jornada de trabajo, los residuos líquidos y las soluciones restantes se tienen que desechar y comprobar que la estación de trabajo de vacío PyroMark Q24 no tenga polvo ni derrames.
19. Caliente la placa PyroMark Q24 con las muestra biológicas a 80°C durante 2 minutos utilizando un bloque de calentamiento.
20. Retire la placa PyroMark Q24 de la placa de calentamiento para dejar que las muestra biológicas se enfríen a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.
21. Proceda con el "Protocolo 5: Ejecución del PyroMark Q24"

#### PIROSECUENCIACIÓN:

Procedimiento:

1. Disolver cada una de las mezclas de enzimas y sustratos liofilizados en 620 µl de agua (H<sub>2</sub>O, suministrada en el kit).
2. Mezclar agitando suavemente el vial. (sin agitar). Para que la mezcla se disuelva completamente, dejar a temperatura ambiente (15-25°C) durante 5-10 minutos. Evitar que la solución sea turbia antes de llenar el cartucho PyroMark Q24. Si los reactivos se utilizan posteriormente, colóquelos en hielo.
3. Deje que los reactivos y el cartucho PyroMark Q24 alcancen temperatura ambiente (20-25°C).
4. Coloque el cartucho PyroMark Q24 con la etiqueta hacia usted.
5. Cargue el cartucho PyroMark Q24 con los volúmenes requeridos de nucleótidos, la enzima y las mezclas de sustrato de acuerdo con la Figura 8. Evitar que se transfieran burbujas de aire de la pipeta al cartucho.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> <b>18</b>  <b>DE:</b> <b>25</b>

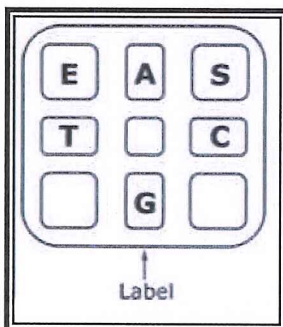


Figura 8. Ilustración del cartucho PyroMark Q24 visto desde arriba.



6. Abra la puerta del cartucho (Fig. 8) e insértelo con la etiqueta hacia fuera. Empuje el cartucho completamente y luego empújelo hacia abajo.



Fig.8 Sitio de colocación del cartucho dentro del equipo Pyromark Q24

7. La línea tiene que ser visible delante del cartucho, una vez realizado, cierre la compuerta.  
8. Abrir el marco de sujeción de la placa y colóquela en el bloque calefactor.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> <b>19</b>  <b>DE:</b> <b>25</b>

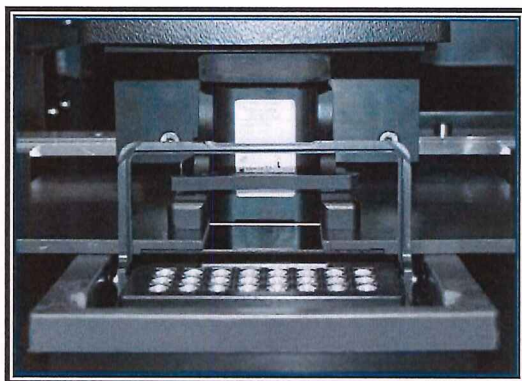


Fig. 9 Marco para placas de secuenciación dentro del equipo Pyromark Q24

9. Cerrar el marco para placas (Fig. 9) y la tapa del instrumento.
10. Insertar la memoria USB (que contiene el archivo de ejecución) en el puerto frontal del instrumento. No extraiga la memoria USB antes de finalizar el experimento.
11. Una vez finalizada la ejecución y cuando el instrumento confirme que el archivo de ejecución se ha guardado en la memoria USB.
12. Retirar la memoria USB.
13. Abrir la tapa del instrumento.
14. Abrir la compuerta del cartucho y retire el cartucho de reactivo levantándolo hacia arriba y tirando de él (Fig. 8).
15. Cerrar la compuerta.
16. Abrir el marco de sujeción de la placa y retirar la placa del bloque de calentamiento (Fig. 9).
17. Cerrar el marco portaplacas y la tapa del equipo.
18. Desechar la placa y limpiar el cartucho, según las instrucciones de la proveedora o proveedor.
19. Analizar la corrida

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022



# MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS

Departamento de Patología

## 8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

CÓDIGO:  
M.T./ 0.2.4.2

REV: 01

HOJA: 20

DE: 25

### INTERPRETACIÓN DE ELECTROFEROGRAMAS:

De acuerdo con las instrucciones de la proveedora o proveedor, se considera como positivo cualquier valor de frecuencia alélica mayor al 5%

Los resultados representativos de la pirosecuenciación del gen *BRAF* se muestran en las figuras 10-12.

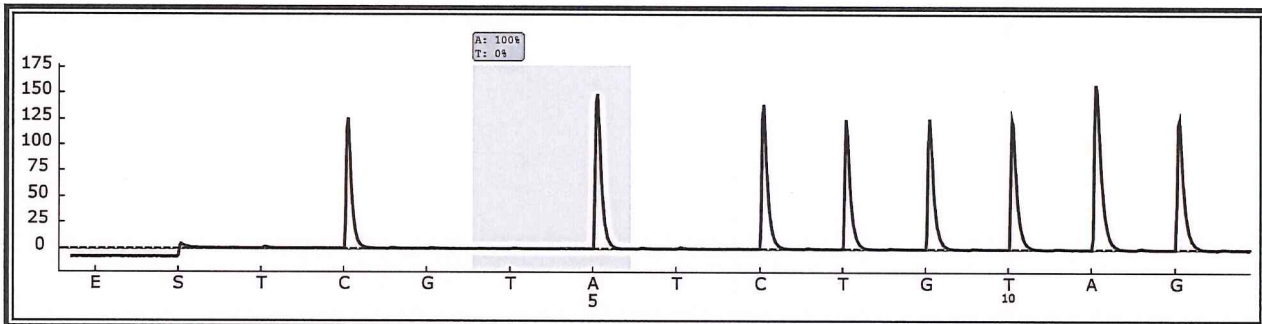


Figura 10. Pirograma obtenido tras el análisis de una muestra biológica con un genotipo de tipo silvestre en el codón 600 de *BRAF*.

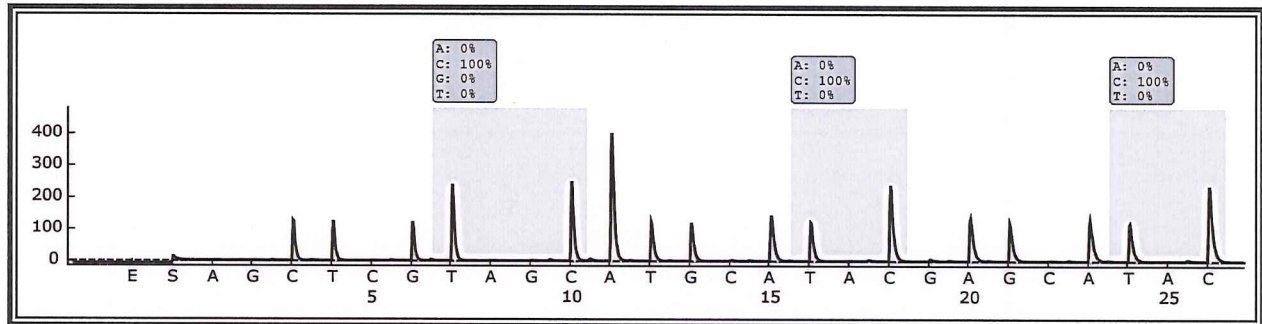


Figura 11. Pirograma obtenido tras el análisis de una muestra biológica con un genotipo de tipo silvestre en los codones 464-469 de *BRAF*.

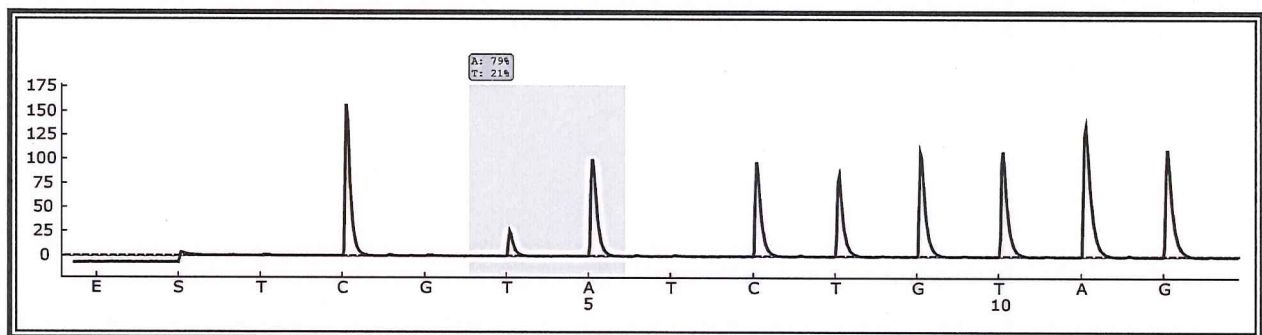


Figura 12. Pirograma obtenido tras el análisis de muestras biológicas con una mutación GTG GAG en la base 2 del codón 600 de *BRAF* (nucleótido 1799).

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022



Los resultados representativos de la pirosecuenciación del gen *NRAS* se muestran en las figuras 13-15.

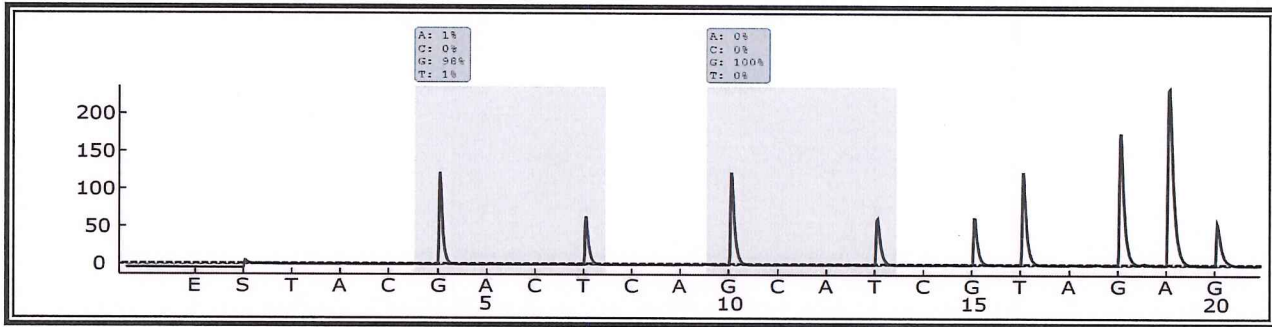


Figura 13. Pirograma del genotipo silvestre de los codones 12 y 13 del gen *NRAS*

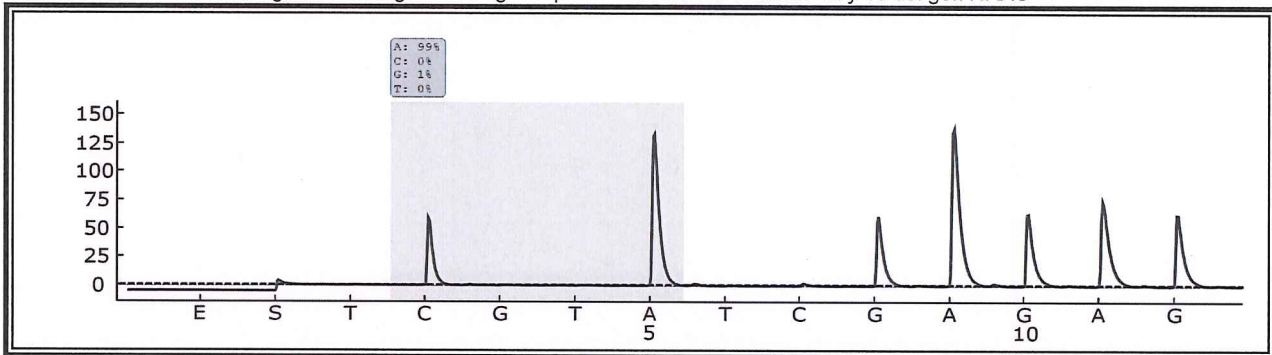


Figura 14. Pirograma del genotipo silvestre del codón 61 del gen *NRAS*

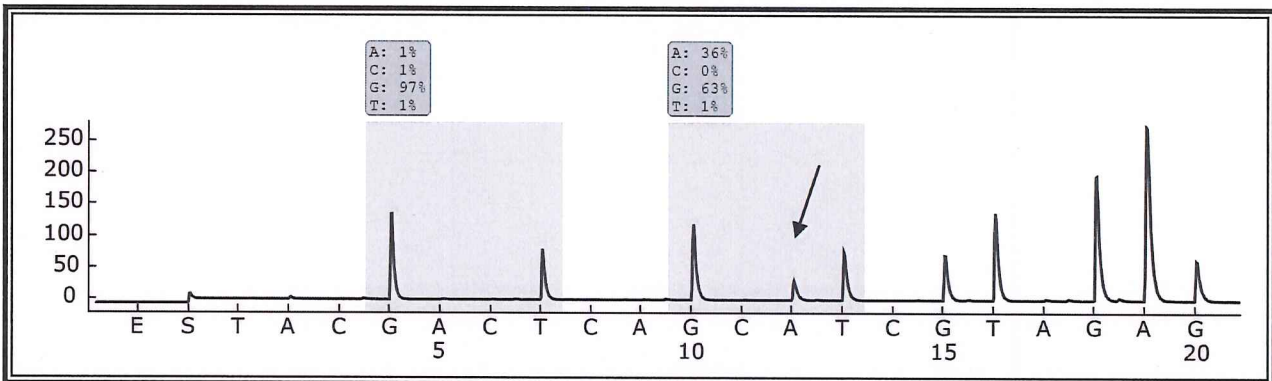


Figura 15. Pirograma de una muestra biológica con la mutación GGT GAT en la segunda base del codón 13 del gen *NRAS* (indicado con la flecha negra).

**CONTROL DE EMISIÓN**

Elaboró:		Revisó:		Autorizó:	
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Nombre:	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Nombre:	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Cargo-puesto:	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Cargo-puesto:	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:		Firma:		Firma:	
Fecha:	21-10-2022	Fecha:	21-10-2022	Fecha:	21-10-2022



Los resultados representativos de la pirosecuenciación del gen *KRAS* se muestran en las figuras 16-18.

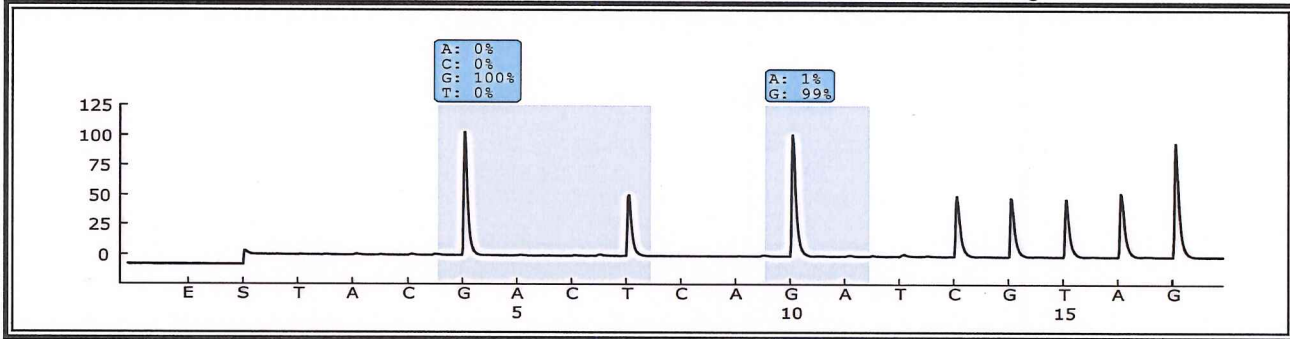


Figura 16. Pirograma del genotipo silvestre de los codones 12 y 13 del gen *KRAS*

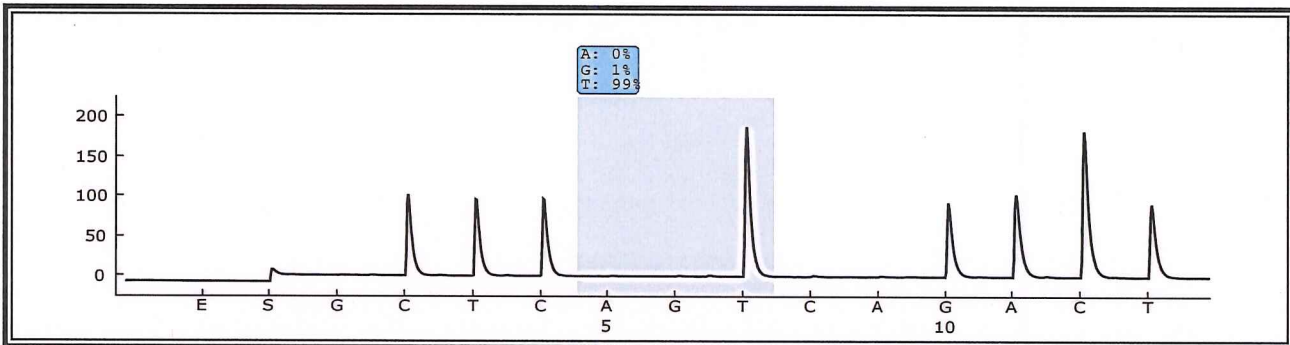


Figura 17. Pirograma del genotipo silvestre del codón 61 del gen *KRAS*

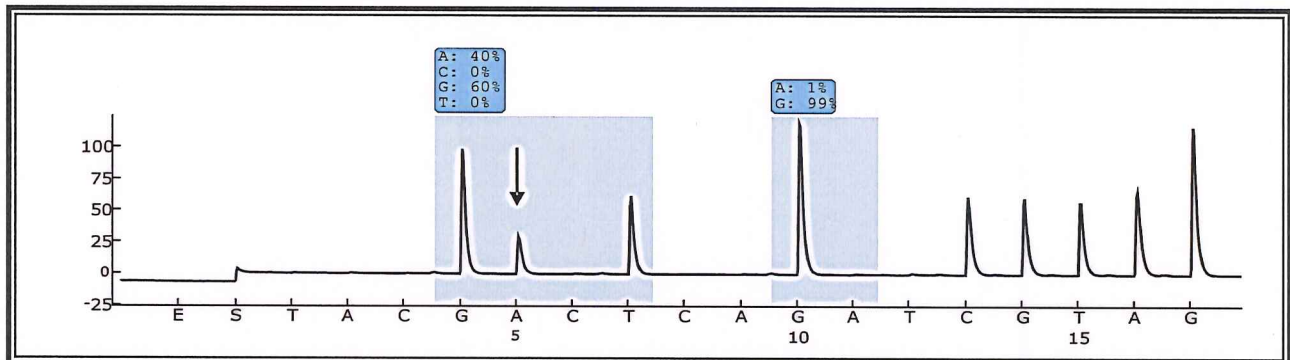



Figura 18. Pirograma de una muestra biológica con la mutación GGT GAT en la segunda base del codón 12 del gen *KRAS* (indicado con la flecha negra).

**CONTROL DE EMISIÓN**

	<b>Elaboró:</b>	<b>Revisó:</b>	<b>Autorizó:</b>
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> 23 <b>DE:</b> 25



## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

Para verificar el tamaño del producto de amplificado en las electroforesis, se utiliza un estándar de peso molecular que permita calcular cualitativamente el tamaño aproximado de los fragmentos que se analizarán mediante secuenciación. Este estándar de peso molecular se correra en paralelo junto con la (las) muestra biológica (s) problema en las electroforesis. Después del análisis de secuenciación por electroforesis capilar el equipo graficará los resultados para conocer la secuencia exacta de los nucleótidos de la muestra biológica analizada las cuales serán comparadas con la secuencia normal de los genes *BRAF*, *NRAS* y *KRAS* reportadas en bases de datos del genoma humano <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS



- 9.1 ADN:** Abreviación de Ácido Desoxirribonucleico.
- 9.2 Alelo:** Una de las diversas formas de un gen en un locus o de un marcador particular en un cromosoma. Diferentes alelos de un gen producen variaciones en las características hereditarias.
- 9.3 Amplificación:** Copias repetidas de un fragmento del ADN.
- 9.4 Angiogénesis:** Formación de nuevos vasos a partir de la vasculatura existente secundaria a la migración y proliferación de las células endoteliales.
- 9.5 Apoptosis:** También conocida como muerte celular programada. Mecanismo activo de muerte celular en el que la degradación del ADN y la destrucción nuclear preceden a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y la necrosis celular.
- 9.6 BRAF:** Gen que codifica para una serina/treonina quinasa que activa la cascada RAS/RAF/MEK/ERK implicada en la proliferación celular.
- 9.7 Codón:** Un triplete de nucleótidos que codifican para un aminoácido.
- 9.8 Columna QIAamp MinElute:** Mini-columna de sílice para la absorción de ácidos nucleicos.
- 9.9 EDTA:** Ácido etilendiamino tetracético.
- 9.10 Electroforesis:** Migración de moléculas en solución por un campo eléctrico a través de un gel u una matriz porosa.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> <b>24</b>  <b>DE:</b> <b>25</b>

- 9.11 Exón:** Región del ADN de un gen que codifica para una parte de la proteína. Están intercalados entre secuencias no codificantes o intrones.
- 9.12 Gen:** La unidad física y funcional de la herencia, que se pasa de padres a hijos. Los genes están compuestos por ADN y la mayoría de ellos contiene la información para elaborar una proteína específica
- 9.13 KRAS:** Gen que codifica para la proteína oncogénica K-ras con actividad GTPasa
- 9.14 µl:** Microlitro.
- 9.15 Muestra biológicas:** Material biológico proveniente de cualquier organismo extraído por métodos que permiten considerarlo representativo del mismo para efectuar un análisis.
- 9.16 Mutación:** El cambio de un gen de una forma normal a otra alterada.
- 9.17 NRAS:** Gen que codifica para la proteína oncogénica N-ras con actividad GTPasa.
- 9.18 Nucleótido:** Uno de los componentes estructurales o unidades constituyentes del ADN o del ARN. Un nucleótido consta de una base (adenina, timina, guanina, uracilo o citosina), más una molécula de azúcar y una de ácido fosfórico.
- 9.19 Oncogen:** Un gen defectivo que ha sufrido mutaciones y toma parte en la causa del crecimiento tumoral. Son formas alteradas de genes que normalmente están involucrados en estimular diversas vías de proliferación celular.
- 9.20 PCR (Polymerase Chain Reaction):** Proceso de amplificación de secuencias específicas de ADN mediante una técnica específica.
- 9.21 pH:** Concentración de iones de hidrógeno presentes en las soluciones y también se conoce como la medida de acidez o alcalinidad
- 9.22 Pirograma:** Representación gráfica de las lecturas o secuencias del ADN obtenida de un secuenciador.
- 9.23 Placa Pyromark Q24:** Bases rectangulares de plástico transparente de 4 x 8 cm con 24 pozos.
- 9.24 Pozo:** Contenedores de líquido de las placas Pyromark Q24.
- 9.25 Primer oligonucleótido:** Una secuencia corta de oligonucleótidos que se une en forma complementaria específica a una cadena única de ácido nucleico e inicia la síntesis de esa cadena en presencia de ADN polimerasa y nucleótidos en una reacción de PCR.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>8. Procedimiento Técnico para Detectar Mutaciones Mediante Pirosecuenciación</b>		<b>HOJA:</b> <b>25</b>  <b>DE:</b> <b>25</b>

- 9.26 Protoncogen:** Un gen que funciona para promover la división celular. Cuando estos genes están mutados ellos producen varios productos que promueven la división celular de una manera anormal.
- 9.27 PyroMark Q24:** Equipo automatizado de la marca Qiagen® para la secuenciación de ácidos nucleicos mediante el método de pirosecuenciación.
- 9.28 QIAamp MinElute:** Kit.
- 9.29 Secuenciación:** Es la asignación de bases nitrogenadas de determinada región del DNA.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=6ac1ddca-5a91-4885-8025-92eac73f0781&lang=en>

Liu S, Zhang B, Zhao Y, Chen P, Ji M, Hou P, Shi B. Association of BRAFV600E mutation with clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma: a study on a Chinese population. Int J Clin Exp Pathol. 2014; 7(10):6922-8.

Spittle C, Ward MR, Nathanson KL, et al. Application of a BRAF pyrosequencing assay for mutation detection and copy number analysis in malignant melanoma. J Mol Diagn. 2007;9:464-471.

Tan YH, Liu Y, Eu KW, et al. Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing. Pathology. 2008;40:295-298. Laurini JA, Aoun P, Iqbal J, Chan W, Greiner TC. Investigation of the BRAF V600E mutation by pyrosequencing in lymphoproliferative disorders. Am J Clin Pathol. 2012 Dec;138(6):877-83

Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. JAMA. 2013;309:1493-1501.

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> 1  <b>DE:</b> 18

## 9. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA CONVENCIONAL

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	24-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> <b>2</b>  <b>DE:</b> <b>18</b>

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Proceso, inclusión, corte y observación de muestra biológicas con el uso resina epóxica para observación en microscopio electrónico de transmisión.

## 2.0 OBJETIVO

Describir de manera sistemática y ordenada el proceso por medio del cuál se obtiene una muestra biológica para análisis ultraestructural

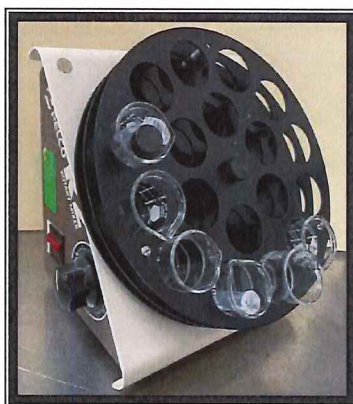
## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participa en el procedimiento cuentan con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.

1. Responsable de Laboratorio de Microscopia Electrónica.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1. Rotador para infiltración y mezcla de las resinas.



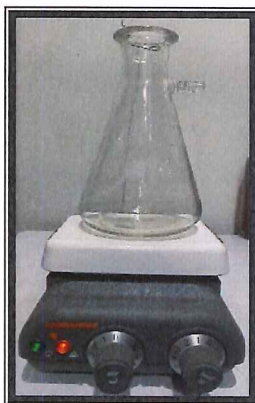
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	Departamento de Patología		REV: 01
	9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional		HOJA: 3 DE: 18

2. Centrifuga refrigerada.



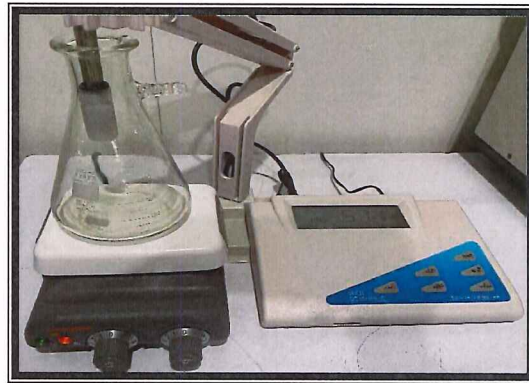
3. Parrilla de agitación y de calentamiento.



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> 4  <b>DE:</b> 18

4. Potenciometro



5. Ultra-procesador



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> <b>5</b>  <b>DE:</b> <b>18</b>

6. Cortadora de cuchillas.



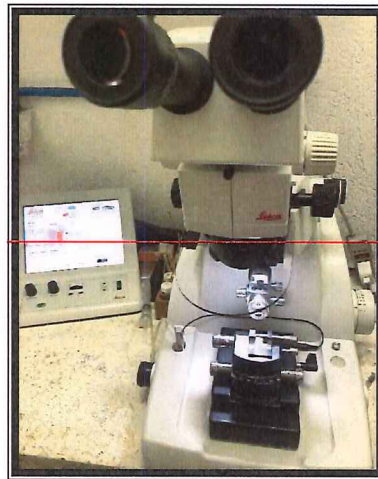
7. Estufa de polimerización.



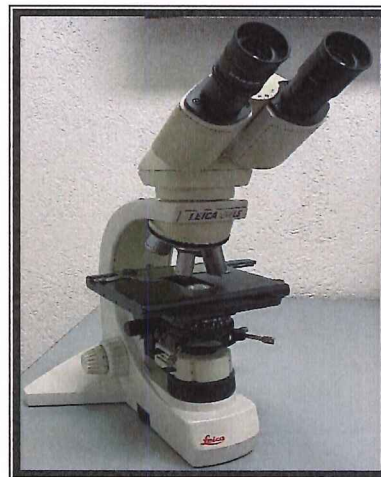
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> <b>6</b>  <b>DE:</b> <b>18</b>

8. Ultramicrotomo



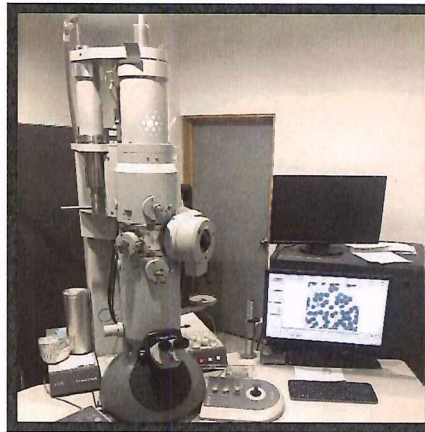
9. Microscopio óptico



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> 7 <b>DE:</b> 18

10. Microscopio electrónico de transmisión.



11. Refrigerador.

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

El Microscopio Electrónico requiere de un cuarto específico e independiente para el sistema de refrigeración del equipo, ambos espacios se mantienen a 20°C, el equipo no se apaga por lo que el sistema de aire acondicionado se mantiene en funcionamiento permanentemente.

Para corte y procesamiento se cuenta con un cuarto libre de vibraciones y con sistema de ventilación adecuado para liberación de vapores de solventes.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> 8 <b>DE:</b> 18

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.

D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.

D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.

D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

Reglamento Interno de la Comisión Nacional de Arbitraje Médico.

D.O.F. 03-II-2004

Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.

D.O.F. 19-IV-2004 y sus reformas

### DECRETOS

Decreto por el que la Secretaría de Salubridad y Asistencia organizará el registro Nacional de Cáncer, como programa permanente destinado a la prevención información y asesoría en la lucha contra el cáncer.

D.O.F. 17-XI-1982

### NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de cáncer del cuello uterino.

D.O.F. 16-I-1995

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> <b>9</b>  <b>DE:</b> <b>18</b>

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.  
D.O.F 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-001-STPS-2008, Edificios, locales, instalaciones y áreas en los centros de trabajo Condiciones de seguridad.  
D.O.F. 24-XI-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.  
D.O.F 09-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.  
D.O.F. 19-II-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.  
D.O.F. 15-X-2012

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.  
D.O.F. 09-X-2015

Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.  
D.O.F. 27-I-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.  
D.O.F. 21-II-2017

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

1. Las muestras biológicas para estudio de microscopía electrónica son recibidas por las y los Médicos Residentes de Patología, revisadas, seccionadas y anotadas en la bitácora de solicitud de estudio.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV: <b>01</b>
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		HOJA: <b>10</b>  DE: <b>18</b>

El Responsable de Laboratorio de Microscopia Electrónica es encargado de realizar las siguientes actividades:

- a. Verificar que las muestras biológicas, antes de iniciar el proceso tendrán un tamaño menor a 3mm<sup>3</sup>.
  - b. Preparar las soluciones máximo a un mes de anticipo.
  - c. Revisar que las muestras biológicas que se analizarán en el microscopio electrónico están libres de suciedad, sin vibraciones de corte, sin precipitados de contratantes.
2. El fragmento designado para microscopía electrónica tiene que ser seccionado de un tamaño menor a 3mm<sup>3</sup> y fijado en Glutaraldehído al 2.5% diluido en buffer de cacodilatos (0.15M, pH 7.2) y mantenido en refrigeración a 4°C.
  3. Las muestras biológicas se lavan en buffer de cacodilatos y mantenidas en refrigeración hasta continuar el proceso.



Muestras biológicas almacenadas en buffer a 4°C

#### PROCESO DE LA MUESTRA BIOLÓGICA:

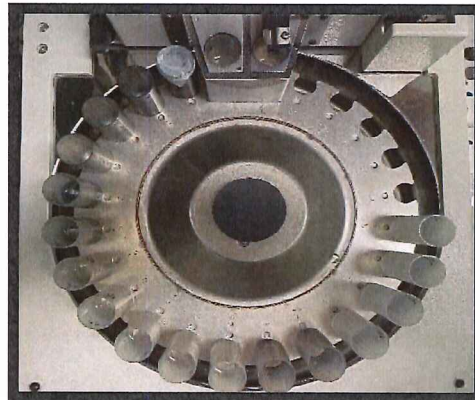
1. En el procesador de tejidos se realizan los siguientes pasos de la técnica de inclusión en resina epóxica (EMBED-812) para tejidos de difícil infiltración resina epóxica de baja viscosidad (Spurr), anotando específicamente la localización de cada tejido con su respectiva nota de clasificación:
  - a. Lavado en buffer de cacodilatos.
  - b. Post-fijación con tetraóxido de osmio diluido en buffer de cacodilatos
  - c. Lavado en buffer de cacodilatos.
  - d. Deshidratación en alcohol etílico en concentración gradual de menor a mayor.
  - e. Infiltración con resina epóxica diluida y resina epóxica pura e Infiltración con resina epóxica de baja viscosidad diluida y resina epóxica de baja viscosidad pura (Spurr) para tejidos de difícil infiltración.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA: 11</b> <b>DE: 18</b>

\*Los tiempos y temperatura en cada paso se describen en la plantilla de programación del procesador de tejidos.

- Las muestras biológicas son colocados en los moldes de inclusión con resina epoxica y en resina epoxica de baja viscosidad para tejidos de difícil infiltración, designando a cada muestra biológica un número consecutivo de clasificación en el laboratorio.
- El molde de inclusión se coloca en la estufa de polimerización a 60°C por 48 horas para solidificar la resina epóxica.



Carrusel del procesador de tejidos.

#### CORTE Y CONTRASTE DE LA MUESTRA BIOLÓGICA:

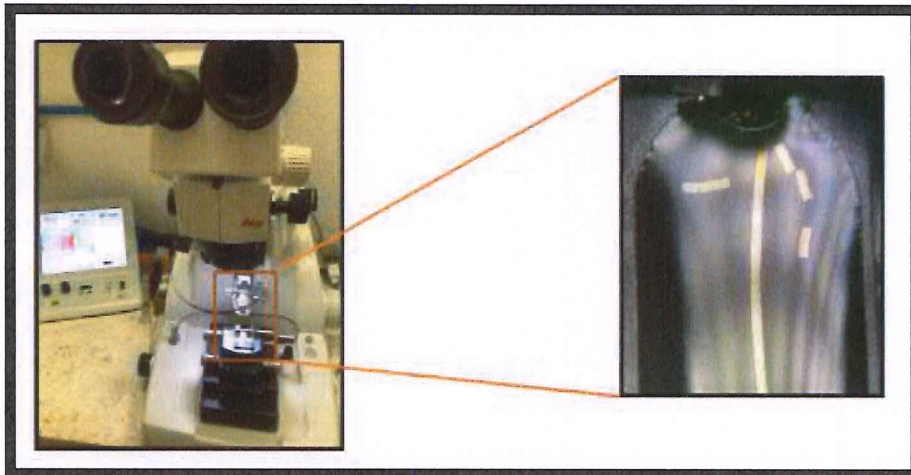
Todos estos pasos los realiza el Responsable de Laboratorio de Microscopia Electrónica:

- Cortes de los bloques con cuchillas de cristal templado a un grosor de un micrómetro, se adhieren a una laminilla de vidrio y se tiñe con azul de toluidina para ser observado en el microscopio óptico.
- A partir del corte revisado en el microscopio óptico se elige la zona de la muestra biológica (área) que se necesita revisar en el microscopio electrónico.
- Con una navaja, retira el exceso de resina, dando forma de cuadrilátero a la cara de corte de la que se realizó el corte anterior, este cuadrilátero no tiene que exceder 1mm<sup>2</sup> para su fácil corte.
- Se realizan cortes de 70 a 100 nanómetros de espesor con cuchilla de diamante de acuerdo al tejido y a los objetivos de estudio, estos cortes son montados en rejillas de cobre de 3mm de diámetro.

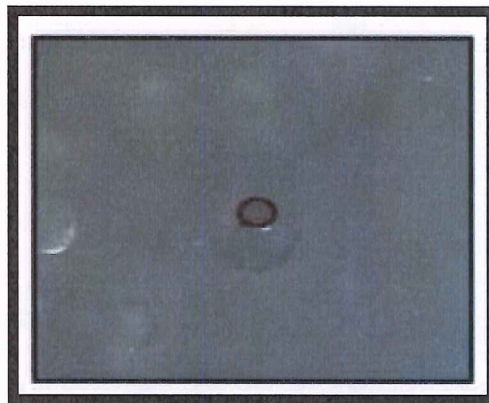
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> <b>12</b>  <b>DE:</b> <b>18</b>

5. Los cortes montados en rejillas son puestos en contacto con acetato de uranilo y con citrato de plomo, estas soluciones son usadas como medio de contraste.



Ultramicrotomo del área de corte, cuchilla de diamante con tira de cortes finos de 80nm de grosor.



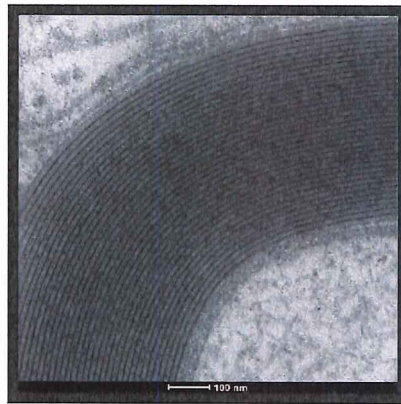
Contraste de rejilla con cortes finos.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

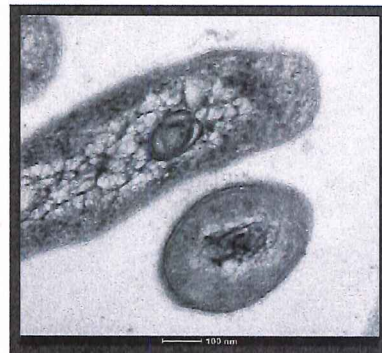
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> 13  <b>DE:</b> 18

**OBSERVACIÓN E INTERPRETACIÓN DE IMÁGENES:**

1. Las rejillas son revisadas en el microscopio electrónico de transmisión. El microscopio regularmente se usa a 80kV, preferentemente en un SpotSize de 1 o 2.
2. Se recomienda que las muestras biológicas no se mantengan demasiado tiempo en contacto con el haz de electrones, por lo que se tiene que realizar una selección del área a fotografiar. Las fotografías se realizan mediante la cámara digital con sensor específico de electrones instalada en el microscopio electrónico.
3. Las imágenes digitales son por usadas por las Médicas, Médicos, investigadoras e investigadores del Departamento de Patología para la interpretación y/o diagnóstico de las muestras biológicas procesadas.



Contraste de rejilla con cortes finos.



Muestra biológica procesada para Microscopía Electrónica Convencional en tejidos de difícil infiltración (*Mycobacterium tuberculosis*).

**REGLAS GENERALES**

Todas las muestras biológicas tienen que ser trabajadas con guantes y bata.

Las muestras biológicas para Microscopía Electrónica Convencional, tienen que ser seccionadas menores a 3mm<sup>3</sup>.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> <b>14</b>  <b>DE:</b> <b>18</b>

Las muestras biológicas se tienen que manejar en condiciones de higiene.

Ninguna muestra biológica y ningún reactivo tendrá contacto con la piel de quién procesa.

### MANEJO DE DESECHOS

Glutaraldehído y Paraformaldehído en buffer de cacodilatos y de fosfatos: Se desecha en recipientes debidamente marcados como "Desecho de aldehídos" y son llevados como residuos peligrosos a la coordinación de Control Ambiental del Instituto.

Alcohol etílico: se desecha en recipiente sellado y debidamente marcado como "Alcohol-Azul de toluidina" y son llevados como residuos peligrosos a la coordinación de Control Ambiental del Instituto.

Tetraóxido de Osmio: es una solución muy corrosiva y volátil por lo que se tiene que manejar siempre en campana de extracción, se desecha en recipiente sellado y debidamente marcado como "Tetraóxido de Osmio" y es llevado como residuos peligrosos a la coordinación de Control Ambiental del Instituto

Resinas: terminando el proceso se retira de los viales en los que se embeben los tejidos dentro del procesador de tejidos y se desechan en recipientes marcados como "Resina epoxica" o "Resina acrílica" según sea el caso y son llevados como residuos peligrosos a la coordinación de Control Ambiental del Instituto.

### ERRORES O MAL FUNCIONAMIENTO EN EQUIPO

Los errores o mal funcionamiento de los equipos utilizados en el proceso de muestra biológicas para microscopía electrónica se reportan al Departamento de Ingeniería Biomédica.

Los equipos en contrato de servicio únicamente son revisados por el proveedor y/o ingeniero de Laboratorio autorizados por el Departamento de Ingeniería Biomédica.

### ERRORES DE PROCESAMIENTO DE MUESTRA BIOLÓGICAS

Los artefactos o errores en el procesamiento de las muestras biológicas se reportan con la Coordinadora o el Coordinador correspondiente para resolver el inconveniente.

Cuando existen errores en el procesamiento de la muestra biológica se recomienda procesar un nuevo fragmento de muestra biológica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> 15 <b>DE:</b> 18

**ANEXOS**

Plantilla de programación del Procesador de tejidos para ME -Resina Epóxica-

Leica EM TP

**Specimen Program 01 "EM Conv"**

Laboratorio de Microscopia Electrónica

Departamento de Patología

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición S. Z.

Tubo	Reactivo	Tiempo	Temp	Agitación
1	Buffer cacodilatos	0:15	15°C	3
2	Buffer cacodilatos	0:15	15°C	3
3	OsO4 1%	2:00	15°C	3
4	Buffer cacodilatos	0:25	15°C	3
5	Buffer cacodilatos	0:25	15°C	3
6	Alcohol 30%	0:15	15°C	3
7	Alcohol 50%	0:15	15°C	3
8	Alcohol 70%	0:15	15°C	3
9	Alcohol 80%	0:15	15°C	3
10	Alcohol 96%	0:15	15°C	3
11	Alcohol 96%	0:15	15°C	3
12	Alcohol 100%	0:15	15°C	3
13	Alcohol 100%	0:15	15°C	3
14	Oxido de propileno	0:40	15°C	3
15	Oxido de propileno	0:40	15°C	3
16	PO EPON 2:1	3:20	15°C	3
17	PO EPON 1:1	3:20	15°C	3
18	EPON	4:00	20°C	1
19	EPON	4:00	20°C	1
20				
21				
22				
23				
24				

CANCELADO

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	24-10-2022


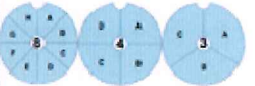
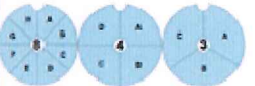
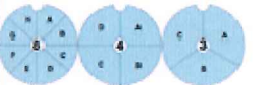
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> 16 <b>DE:</b> 18

Plantilla de registro de tejidos para proceso de EM en procesador.

## Leica EM TP

### Specimen Record Pad/Electron Microscopy Lab/INCMNSZ

Operator: \_\_\_\_\_ Program: \_\_\_\_\_  
 Date: \_\_\_\_\_ Start time: \_\_\_\_\_ #

Basket No.	Specimen Details								
<b>S1/L1</b>	<b>A</b>							<b>E</b>	
	<b>B</b>							<b>F</b>	
	<b>C</b>							<b>G</b>	
	<b>D</b>							<b>H</b>	
<b>S2/L2</b>	<b>A</b>							<b>E</b>	
	<b>B</b>							<b>F</b>	
	<b>C</b>							<b>G</b>	
	<b>D</b>							<b>H</b>	
<b>S3/L3</b>	<b>A</b>							<b>E</b>	
	<b>B</b>							<b>F</b>	
	<b>C</b>							<b>G</b>	
	<b>D</b>							<b>H</b>	
<b>S4</b>	<b>A</b>							<b>E</b>	
	<b>B</b>							<b>F</b>	
	<b>C</b>							<b>G</b>	
	<b>D</b>							<b>H</b>	

CANCELADO

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> <b>17</b>  <b>DE:</b> <b>18</b>

## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 Acetato de uranilo:** Sal utilizada en solución como medio de contraste.
- 9.2 Buffer:** Solución amortiguadora de osmolaridad y pH.
- 9.3 Citrato de plomo:** Sal utilizada en solución como medio de contraste.
- 9.4 Contraste:** Proceso mediante el cual se impregnan sales de metales pesados (generalmente citrato de plomo y acetato de uranilo) a los cortes que van a ser observados en el microscopio electrónico.
- 9.5 Estufa de polimerización:** Estufa en la cual se mantiene una temperatura constante para el adecuado endurecimiento de los bloques.
- 9.6 Glutaraldehído:** Fijador ideal para microscopia electrónica, preserva las proteínas mediante un doble enlace aldehídico.
- 9.7 Microscopio electrónico:** Instrumento usado para aumentar la imagen de una muestra biológica hasta límites ultraestructurales que usa como sistema óptico lentes electromagnéticas, alto voltaje y un sistema de vacío dentro de la columna por donde viajan los electrones.
- 9.8 Paraformaldehído:** Fijador usado para la mínima fijación de proteínas, es usado en técnicas en las que se requiere hacer una localización de anticuerpos o proteínas.
- 9.9 Resina epoxica:** Medio de inclusión hidrofóbico ideal para hacer cortes de un grosor adecuado para ser observados al microscopio electrónico (60 a 120nm), la marca usada en el laboratorio es EMBED-812.
- 9.10 Técnica de microscopía electrónica:** Proceso de preparación de muestras biológicas para ser observadas en el microscopio electrónico.
- 9.11 Tetraóxido de osmio:** Fijador que usado junto con el glutaraldehído mejora los resultados para la microscopia electrónica, fija y contrasta los lípidos insaturados.
- 9.12 Ultramicrotomo:** Aparato usado para tallar bloques de resina epoxica y realizar cortes de hasta 60 nm de grosor.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>9. Procedimiento Técnico para Realizar Microscopía Electrónica Convencional</b>		<b>HOJA:</b> 18 <b>DE:</b> 18

- 9.13 Azul de Toluidina:** Colorante usado para teñir cortes semifinos.
- 9.14 kV:** Kilo Volts, Termino de voltage al que se usa el microscopio electrónico.
- 9.15 SpotSize:** Intensidad de electrones seleccionada en la configuración del microscopio electrónico.
- 9.16 Haz de electrons:** Conjunto de electrones de un mismo origen alineados en un centro específico.
- 9.17 Inmunolocalización:** Procedimiento basado en la afinidad entre un antígeno y un anticuerpo para localizar proteínas específicas.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Dykstra M. S. 1992. Biological Electron Microscopy. Theory, Techniques and Troubleshooting. Plenum Press Corp. U. S. A.
- Hayat M. A. 1981. Fixation for Electron Microscopy. Academic Press. U. S. A.
- Sabatini D. D., Bensch K. & Barnett R. J. 1963. Cytochemistry and Electron Microscopy. The Preservation of Cellular Ultrastructure and Enzymatic Activity by Aldehyde Fixation. Journal Cell Biology 17; 19-58.
- Santander R. G. 1969. Técnicas de Microscopía Electrónica en Biología. Ed. Aguilar. España.
- Sjöstrand F. S. 1971. Electron Microscopy of cells and tissues. Vol. 1. Instrumentation and techniques. Fourth Printing. Academic Press INC. U. S. A.
- Stoward P. J. 1973. Fixation in histochemistry. Hapman and Hall Ltd. U. S. A.
- Vázquez N. G., Echeverría M. O. 2000. Introducción a la Microscopía Electrónica aplicada a las ciencias biológicas. UNAM-Fondo de Cultura Económica. México.

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> <b>1</b>  <b>DE:</b> <b>16</b>

## 10. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR INMUNO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> 2
		<small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>DE:</b> 16

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Realizar el proceso, inclusión, corte y observación de muestras biológicas con inmuno localización de las áreas de interés, usando resina acrílica para observación en microscopio electrónico de transmisión.

## 2.0 OBJETIVO

Procesar las muestras biológicas para el examen inmuno-microscópico.

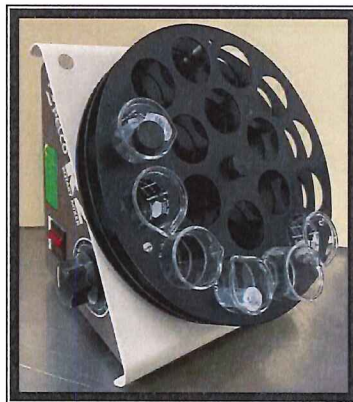
## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participa en el procedimiento cuentan con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.

1. Responsable de Laboratorio de Microscopia Electrónica.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1. Rotador para infiltración y mezcla de las resinas.



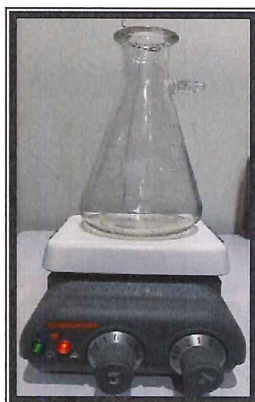
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> <b>3</b>  <b>DE:</b> <b>16</b>

2. Centrifuga refrigerada.



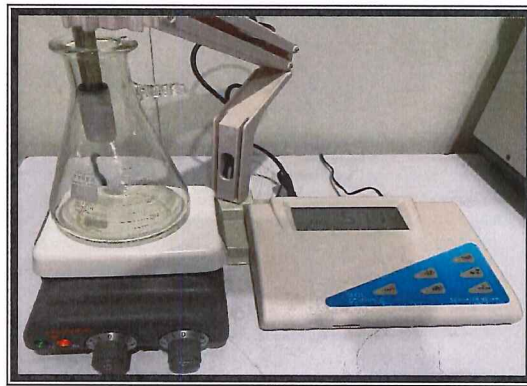
3. Parrilla de agitación y de calentamiento.



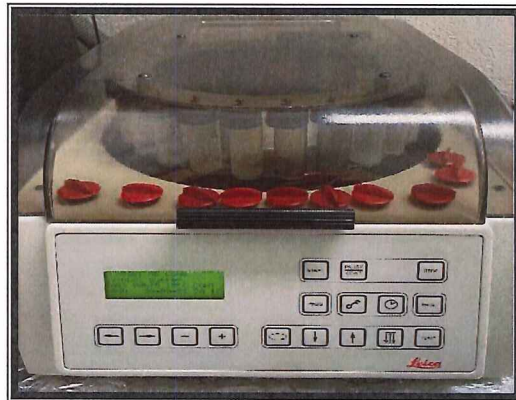
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> 4  <b>DE:</b> 16

4. Potenciometro



5. Ultra-procesador



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licono	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> 5 <b>DE:</b> 16

6. Cortadora de cuchillas.



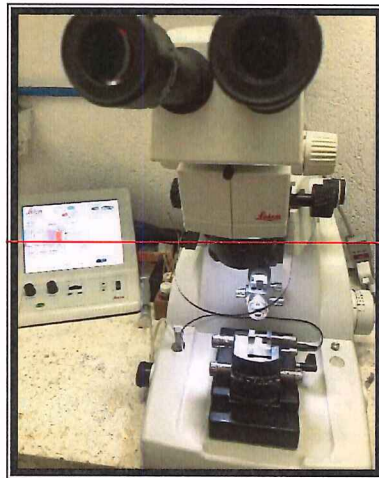
7. Estufa de polimerización.



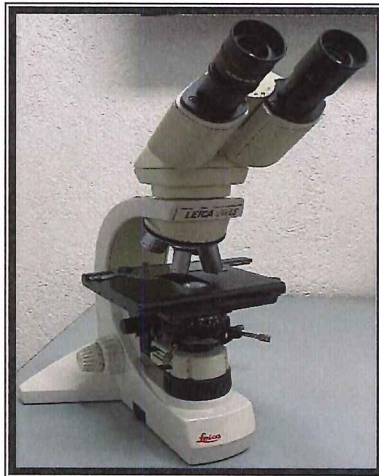
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> 6  <b>DE:</b> 16

8. Ultramicrotomo



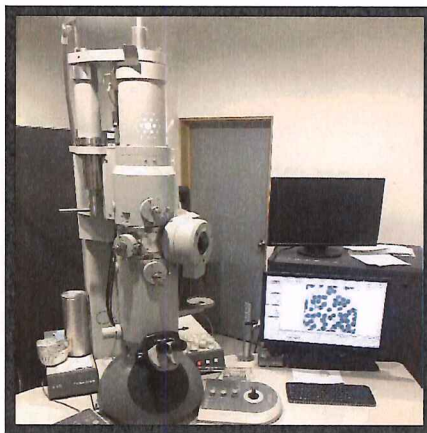
9. Microscopio óptico



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> <b>7</b>  <b>DE:</b> <b>16</b>

10. Microscopio electrónico de transmisión.



11. Refrigerador.

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

El Microscopio Electrónico requiere de un cuarto específico e independiente para el sistema de refrigeración del equipo, ambos espacios se mantienen a 20°C, el equipo no se apaga por lo que el sistema de aire acondicionado se mantiene en funcionamiento permanentemente.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> 8
			<b>DE:</b> 16

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

## REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.  
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

Reglamento Interno de la Comisión Nacional de Arbitraje Médico.  
D.O.F. 03-II-2004

Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.  
D.O.F. 19-IV-2004 y sus reformas

## NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-054-SEMARNAT-1993, Que establece el procedimiento para determinar la incompatibilidad entre dos o más residuos considerados como peligrosos.  
D.O.F. 22-X-1993

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.  
D.O.F. 02-II-1999

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> <b>9</b>  <b>DE:</b> <b>16</b>

Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.  
D.O.F. 23-VI-2006

Norma Oficial Mexicana NOM-001-STPS-2008, Edificios, locales, instalaciones y áreas en los centros de trabajo Condiciones de seguridad.  
D.O.F. 24-XI-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.  
D.O.F. 09-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-003-SCT/2008, Características de las etiquetas de envases y embalajes, destinadas al transporte de substancias, materiales y residuos peligrosos.  
D.O.F. 15-VIII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-116-STPS-2009, Seguridad-equipo de protección servidora o servidor público - respiradores purificadores de aire de presión negativa contra partículas nocivas-especificaciones y métodos de prueba.  
D.O.F. 22-XII-2009 y sus reformas

Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.  
D.O.F. 27-III-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.  
D.O.F. 19-II-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA3-2012, Que establece las características mínimas en relación a infraestructura y equipamientos de laboratorios de Anatomía Patológica, hospitales y consultorios de atención médica especializada.  
D.O.F. 08-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-2014, Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral-Reconocimiento, evaluación y control.  
D.O.F. 28-IV-2014

Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de substancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.  
D.O.F. 27-I-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-133-SEMARNAT-2015, Protección ambiental-Bifenilos Policlorados (BPCs)-Especificaciones de manejo.  
D.O.F. 23-II-2016

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> 10 <b>DE:</b> 16

Norma Oficial Mexicana NOM-138-SSA1-2016, Que establece las especificaciones sanitarias del alcohol etílico desnaturalizado, utilizado como material de curación, así como para el alcohol etílico de 96 grados G.L. sin desnaturalizar, utilizado como materia prima para la elaboración y o envasado de alcohol etílico desnaturalizado como material de curación.

D.O.F. 25-IV-2017

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.

D.O.F. 21-II-2017

Norma Oficial Mexicana NOM-003-NUCL-2021, Clasificación de instalaciones que utilizan fuentes abiertas.

D.O.F. 12-X-2021

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

### RECEPCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA MUESTRA BIOLÓGICAS: -

1. Las muestras biológicas para estudio de inmuno-microscopía electrónica son recibidas por las y los Médicos Residentes de Patología, revisadas, seccionadas y anotadas en la bitácora de solicitud de estudio.

El Responsable de Laboratorio de Microscopia Electrónica es encargado de realizar las siguientes actividades:

- a. Las muestras biológicas, antes de iniciar el proceso tendrán un tamaño menor a 3mm<sup>3</sup>.
  - b. Las soluciones tienen que ser preparadas máximo a un mes de anticipo.
  - c. Las muestras biológicas revisadas en el microscopio electrónico tienen que estar libres de suciedad, sin vibraciones de corte, sin precipitados de contratantes.
2. El fragmento designado para microscopía electrónica tiene que ser seccionado de un tamaño menor a 3mm<sup>3</sup> y fijado en Paraformaldehído al 4% diluido en Buffer de Fosfatos Sörensen (0.2M, pH 7.4) y mantenido en refrigeración a 4°C.
  3. Las muestras biológicas tienen que ser lavadas en Buffer de Fosfatos Sörensen y mantenidas en refrigeración hasta continuar el proceso.

### PROCESO DE LA MUESTRA BIOLÓGICA:

1. En el procesador de tejidos se llevan a cabo los siguientes pasos de la técnica de inclusión en resina acrílica (LR-White), anotando específicamente la localización de cada tejido con su respectiva nota de clasificación:
  - a. Lavado en Buffer de Fosfatos Sörensen (0.2M, pH 7.4).
  - b. Deshidratación en alcohol etílico en concentración gradual de menor a mayor.
  - c. Infiltración con Resina Acrílica diluida (LR-White-Alcohol etílico) y Resina Acrílica pura (LR-White).

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> <b>11</b>  <b>DE:</b> <b>16</b>

\*Los tiempos y temperatura en cada paso se describen en la hoja de programación del procesador de tejidos.

- Las muestras biológicas son colocadas en cápsulas de inclusión herméticas embebidos en Resina Acrílica (LR-White) pura designando a cada tejido un número de clasificación en el laboratorio.
- La cápsula de inclusión se coloca en la cámara de Luz UltraVioleta a temperatura ambiente por 48 horas para solidificar la resina acrílica.

### CORTE, INCUBACIÓN Y CONTRASTE DE LA MUESTRA BIOLÓGICA:

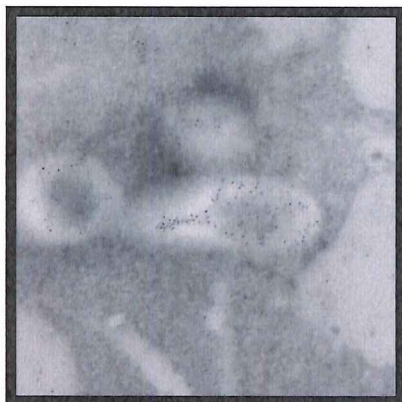
- Se realizan cortes de los bloques con cuchillas de cristal templado a un grosor de un micrómetro, se adhieren a una laminilla de vidrio y se tiñe con azul de toluidina para ser observado en el microscopio óptico.
- A partir del corte revisado en el microscopio óptico se elige la zona del tejido que se necesita realizar la inmune-localización y revisar en el microscopio electrónico.
- Con una navaja se retira el exceso de resina, dando forma de cuadrilátero a la cara de corte de la que se realizó el corte anterior, este cuadrilátero no tiene que exceder 1mm<sup>2</sup> para su fácil corte.
- Se realizan cortes de 70 a 100 nanómetros de espesor con cuchilla de diamante de acuerdo con el tejido y a los objetivos de estudio, estos cortes son montados en rejillas de níquel de 3mm de diámetro.
- Los cortes montados en rejillas de níquel son puestos en contacto con anticuerpos a diferentes diluciones a 4°C durante toda la noche (12hrs) para realizar la inmunolocalización se lavan las rejillas en Buffer de Sørensen y después se ponen en contacto con el anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro coloidal Considerar la fuente de obtención del anticuerpo primario y el tamaño de la partícula de oro para una adecuada localización).
- Las rejillas incubadas en ambos anticuerpos son puestas en contacto con acetato de uranilo, se usa como medio de contraste.

### OBSERVACIÓN E INTERPRETACIÓN DE IMÁGENES:

- Las rejillas son revisadas en el microscopio electrónico de transmisión. El microscopio tiene que usarse a 80kV, preferentemente en un SpotSize de 1 o 2.
- Se recomienda que las muestras biológicas no se mantengan demasiado tiempo en contacto con el haz de electrones, por lo que se tiene que realizar una selección del área a fotografiar. Las fotografías se realizan mediante la cámara digital con sensor específico de electrones instalada en el microscopio electrónico.
- Las imágenes digitales son por usadas por las Médicas, Médicos, investigadoras e investigadores para la interpretación y/o diagnóstico de las muestras biológicas procesadas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> <b>12</b>  <b>DE:</b> <b>16</b>



Muestra biológica procesada para Inmuno-Microscopía Electrónica (inmunolocalización con partículas de oro coloidal de 5nm -puntos negros).

**REGLAS GENERALES:**

Todas las muestras biológicas tienen que ser trabajadas con guantes y bata.

Las muestras biológicas para Inmuno-Microscopía Electrónica tienen que ser seccionadas no mayores a 3mm<sup>3</sup>.

Las muestras biológicas se tienen que manejar en condiciones de higiene.

Ninguna muestra biológica y ningún reactivo tendrá contacto con la piel de quién procesa.

**MANEJO DE DESECHOS:**

Glutaraldehído y Paraformaldehído, buffer de cacodilatos y de fosfatos: Se desecha en recipientes debidamente marcados como "Desecho de aldehídos" y son llevados como residuos peligrosos a la coordinación de Control Ambiental del Instituto.

Alcohol etílico se desecha en recipiente sellado y debidamente marcado como "Alcohol-Azul de toluidina" y son llevados como residuos peligrosos a la coordinación de Control Ambiental del Instituto.

Tetraóxido de Osmio: es una solución muy corrosiva y volátil por lo que se tiene que manejar siempre en campana de extracción, se desecha en recipiente sellado y debidamente marcado como "Tetraóxido de Osmio" y es llevado como residuos peligrosos a la coordinación de Control Ambiental del Instituto

Resinas: Terminando el proceso se retira de los viales en los que se embeben los tejidos dentro del procesador de tejidos y se desechan en recipientes marcados como "Resina epoxica" o "Resina acrílica" según sea el caso y son llevados como residuos peligrosos a la coordinación de Control Ambiental del Instituto.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> <b>13</b>  <b>DE:</b> <b>16</b>

**ERRORES O MAL FUNCIONAMIENTO EN EQUIPO:**

Los errores o mal funcionamiento de los equipos utilizados en el proceso de muestra biológicas para inmuno-microscopía electrónica se reportan al Departamento de Ingeniería Biomédica.

Los equipos en contrato de servicio únicamente son revisados por la proveedora, proveedor y/o ingeniero de Laboratorio autorizado por el Departamento de Ingeniería Biomédica.

**ERRORES DE PROCESAMIENTO DE MUESTRA BIOLÓGICAS:**

Los artefactos o errores en el procesamiento de las muestras biológicas se reportan con la Coordinadora o el Coordinador Correspondiente para resolver el inconveniente.

Cuando existen errores en el procesamiento de la muestra biológica se recomienda procesar un nuevo fragmento de muestra biológica.

**ANEXOS**

Plantilla de programación del Procesador de tejidos para ME -Resina Acrílica-

Leica EM TP			
Specimen Program 02 "EM LRW "			
Laboratorio de Microscopia Electrónica			
Departamento de Patología			
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición S. Z.			
1	Buffer fosfatos	0:25	15°C
2	Alcohol 30%	0:14	15°C
3	Alcohol 50%	0:14	15°C
4	Alcohol 70%	0:14	15°C
5	Alcohol 80%	0:14	15°C
6	Alcohol 96%	0:14	15°C
7	Alcohol 96%	0:14	15°C
8	Alcohol 100%	0:20	15°C
9	Alcohol 100%	0:20	15°C
10	OH 2:1 LRW	3:00	15°C
11	OH 1:1 LRW	3:00	15°C
12	LRW	3:00	15°C
13	LRW	3:00	15°C
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			

**CONTROL DE EMISIÓN**

	<b>Elaboró:</b>	<b>Revisó:</b>	<b>Autorizó:</b>
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

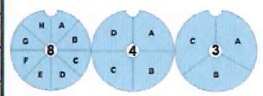
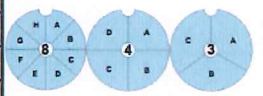
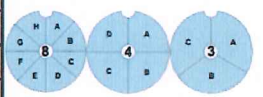
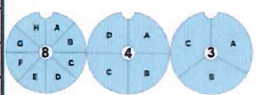
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> 14 <b>DE:</b> 16

Plantilla de registro de tejidos para proceso de EM en procesador

## Leica EM TP

### Specimen Record Pad/Electron Microscopy Lab/INCMNSZ

Operator: \_\_\_\_\_ Program: \_\_\_\_\_  
 Date: \_\_\_\_\_ Start time: \_\_\_\_\_ #

Basket No.	Specimen Details				
<b>S1/L1</b>	<b>A</b>			<b>E</b>	
	<b>B</b>			<b>F</b>	
	<b>C</b>			<b>G</b>	
	<b>D</b>			<b>H</b>	
<b>S2/L2</b>	<b>A</b>			<b>E</b>	
	<b>B</b>			<b>F</b>	
	<b>C</b>			<b>G</b>	
	<b>D</b>			<b>H</b>	
<b>S3/L3</b>	<b>A</b>			<b>E</b>	
	<b>B</b>			<b>F</b>	
	<b>C</b>			<b>G</b>	
	<b>D</b>			<b>H</b>	
<b>S4</b>	<b>A</b>			<b>E</b>	
	<b>B</b>			<b>F</b>	
	<b>C</b>			<b>G</b>	
	<b>D</b>			<b>H</b>	

CANCELADO

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> 15 <b>DE:</b> 16

## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 Acetato de uranilo:** Sal utilizada en solución como medio de contraste.
- 9.2 Buffer:** Solución amortiguadora de osmolaridad y pH.
- 9.3 Citrato de plomo:** Sal utilizada en solución como medio de contraste.
- 9.4 Contraste:** Proceso mediante el cual se impregnan sales de metales pesados (generalmente citrato de plomo y acetato de uranilo) a los cortes que van a ser observados en el microscopio electrónico.
- 9.5 Estufa de polimerización:** Estufa en la cual se mantiene una temperatura constante para el adecuado endurecimiento de los bloques.
- 9.6 Glutaraldehído:** Fijador ideal para microscopia electrónica, preserva las proteínas mediante un doble enlace aldehídico.
- 9.7 Microscopio electrónico:** Instrumento usado para aumentar la imagen de una muestra biológica hasta límites ultraestructurales que usa como sistema óptico lentes electromagnéticas, alto voltaje y un sistema de vacío dentro de la columna por donde viajan los electrones.
- 9.8 Paraformaldehido:** Fijador usado para la mínima fijación de proteínas, es usado en técnicas en las que se requiere hacer una localización de anticuerpos o proteínas.
- 9.9 Resina acrílica:** Medio de inclusión hidrofílico ideal para hacer cortes de un grosor adecuado para ser observados al microscopio electrónico (60 a 120nm) y para la localización ultraestructural de antígenos, la marca usada en el laboratorio es LR-White.
- 9.10 Técnica microscopía electrónica:** Proceso de preparación de muestras biológicas para ser observadas en el microscopio electrónico.
- 9.11 Tetraóxido de osmio:** Fijador que usado junto con el glutaraldehído mejora-los-resultados para la microscopia electrónica, fija y contrasta los lípidos insaturados.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>10. Procedimiento Técnico Para Realizar Inmuno-Microscopía Electrónica</b>		<b>HOJA:</b> 16 <b>DE:</b> 16

**9.12 Ultramicrotomo:** Aparato usado para tallar bloques de resina epoxica y realizar cortes de hasta 60 nm de grosor.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Dykstra M. S. 1992. Biological Electron Microscopy. Theory, Techniques and Troubleshooting. Plenum Press Corp. U. S. A.

Hayat M. A. 1981. Fixation for Electron Microscopy. Academic Press. U. S. A.

Sabatini D. D., Bensch K. & Barnett R. J. 1963. Cytochemistry and Electron Microscopy. The Preservation of Cellular Ultrastructure and Enzymatic Activity by Aldehyde Fixation. Journal Cell Biology 17; 19-58.

Santander R. G. 1969. Técnicas de Microscopía Electrónica en Biología. Ed. Aguilar. España.

Sjöstrand F. S. 1971. Electron Microscopy of cells and tissues. Vol. 1. Instrumentation and techniques. Fourth Printing. Academic Press INC. U. S. A.

Stoward P. J. 1973. Fixation in histochemistry. Hapman and Hall Ltd. U. S. A.

Vázquez N. G., Echeverría M. O. 2000. Introducción a la Microscopía Electrónica aplicada a las ciencias biológicas. UNAM-Fondo de Cultura Económica. México.

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN



Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>11. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)</b>		<b>HOJA: 1</b> <b>DE: 10</b>

## 11. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC)

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>11. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)</b>		<b>HOJA:</b> 2 <b>DE:</b> 10

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

La concentración mínima inhibitoria es la concentración (microgramos/ml) más baja de un compuesto que inhibe el crecimiento de una determinada bacteria.

## 2.0 OBJETIVO

Determinar la concentración mínima de un compuesto de origen animal, vegetal, sintético que disminuye la viabilidad de las micobacterias con respecto a los controles.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participa en el procedimiento cuenta con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.

1. Investigadora o Investigador de Patología Experimental.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO



### MATERIAL:

1. Celdas de plástico
2. Pipetas de 2ml y 10 ml
3. Cajas Petri estériles
4. Tubos de 50ml
5. Microtubos de 1.5ml
6. Caldo de cultivo 7h9 complementado con OADC y glicerol
7. Medio sólido 7h10
8. Puntas amarillas, azules estériles
9. Filtros de 0.22micras
10. Placas de 96 sin tapa estériles.

### EQUIPO:

1. Agitador
2. Pipetor eléctrico
3. Micropipetas de 20, 200 y 1000 µL
4. Multicanal 20 a 200 µL
5. Gradillas para los diferentes tubos
6. Sonicador
7. Incubadora de agitación

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>11. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)</b>		<b>HOJA:</b> 3 <b>DE:</b> 10

8. Cabina de flujo laminar
9. Espectrofotómetro
10. Lupa
11. Incubadora a 37°C y 5 % CO2

## REACTIVOS

1. Caldo de cultivo 7H9 complementado con OADC y glicerol
2. Medio sólido 7H10
3. Resazurina
4. Antibióticos
5. Agua estéril

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

Cuarto de cultivo del laboratorio de patología experimental.

Sistema inyección y extracción de aire operado por manejadoras y una condensadora (Sistema HVAC, del inglés Heating – Ventilation - Air Conditioning, en español: Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado) ubicados en la azotea del edificio de patología; este sistema provee la presión negativa (-30pa) al interior del cuarto de cultivo, además de proporcionar la temperatura (21+/-3 °C) y humedad relativa (45%) necesarias para mantener condiciones de bioseguridad.



Sistema HVAC filtra el aire a través de un banco de filtros con poro de diferentes calibres, comenzando con un filtro grueso hasta llegar a un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) con un porcentaje de eficiencia de 99.9997%, es durante este proceso que el sistema HVAC lo enfría/calienta y humedece según la necesidad del cuarto de cultivo.

Sistema de esclusamiento a la entrada del cuarto de cultivo, esta mantiene una presión positiva (+30pa) formando una barrera (cortina de aire) que evita que salga el aire del interior o que el aire exterior entre al cuarto. El sistema de esclusamiento cuenta con puertas de cierre hermético cuyo acceso es biométrico sin permitir que se abran las dos puertas al mismo tiempo evitando con esto la pérdida de presión positiva/negativa dentro del cuarto de cultivo.

Antes de ingresar se verifica que los manómetros marquen -30 pascales (manómetro superior, reporta la presión dentro del cuarto) y +30 pascales (manómetro inferior que marca la presión dentro de la esclusa). El recambio de aire filtrado se hace 18 veces por hora, el aire que se incorpora al medio ambiente también es filtrado a través de un banco de filtros de tipo Bag-in Bag-out para incorporarse al ambiente de manera estéril libre de patógenos y/o partículas.

Dentro del cuarto se cuenta con dos campanas de flujo laminar, 3 incubadoras estáticas, una incubadora en agitación, una centrifuga, dos homogeneizadores de tejidos, un equipo de enfriamiento a base de nitrógeno líquido, un fotomicroscopio invertido con lámpara de fluorescencia y monitor con CPU, un microscopio estereoscópico, dos agitadores, un espectrofotómetro, un baño maría de temperatura regulable, un equipo pipetor semiautomático, dos juegos de micro pipetas de 1ml, 0.2ml y 0.020ml, una micropipeta multicanal, gavetas para guardar material.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Liconá	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>11. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)</b>		<b>HOJA:</b> 4 <b>DE:</b> 10

El cuarto de cultivo se trabaja con micobacterias patógenas para la humanidad, consideradas dentro del grupo de riesgo 3 de microorganismos patógenos cuya transmisión puede ser por vía aérea. También se trabaja con cultivos celulares de diferentes líneas (macrófagos, pneumocitos, etc.), que requieren un ambiente de trabajo con un nivel de esterilidad alto.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS



Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.  
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>11. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)</b>		<b>HOJA:</b> <b>5</b>  <b>DE:</b> <b>10</b>

## NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-054-SEMARNAT-1993, Que establece el procedimiento para determinar la incompatibilidad entre dos o más residuos considerados como peligrosos.

D.O.F. 22-X-1993

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.

D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.

D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.

D.O.F. 02-II-1999

Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-2014, Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral- Reconocimiento, evaluación y control.

D.O.F. 28-IV-2014

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.

D.O.F. 09-X-2015

Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.

D.O.F. 27-I-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.



D.O.F. 21-II-2017

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

La Investigadora y/o el Investigador de Patología Experimental son responsables de realizar las siguientes actividades:

1. Iniciar un cultivo con 60 mL de 7H9 + 1000 µL de bacteria H37Rv Stanford y esperar 14 días.

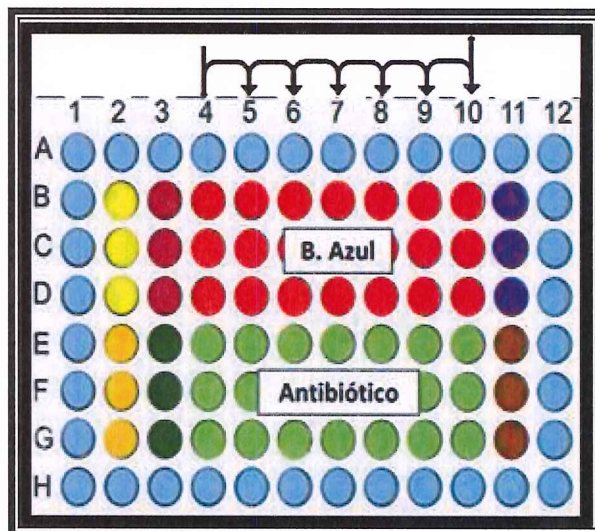
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>11. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)</b>		<b>HOJA:</b> 6  <b>DE:</b> 10



- Leer en una celda de plástico la densidad óptica del cultivo a 600 nm y ajustar con 7H9 hasta obtener 0.05 de densidad óptica leída a 600 nm.
- Realizar una solución de antibiótico filtrada en medio 7H9 con una concentración final de 2 veces la concentración inicial a probar [2x].



- Preparar el compuesto a probar en concentración 2x en caldo de cultivo 7H9
- Agregar 100 µL de medio 7H9 a los pozos de las filas (B-G), columnas (4-11) y 200 µL en las filas (B-D) columna 2 (pozos del control de caldo de cultivo 7h9). Dejar vacía la columna 3.



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>11. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)</b>		<b>HOJA:</b> <b>7</b>  <b>DE:</b> <b>10</b>

●	200 µL de agua inyectable estéril				
●	<b>Control de medio:</b> 200 µL de 7H9				
●	<b>Control de MIC:</b> 198 µL de 7H9 + 2 µL de bacteria				
●	<b>Control de disolvente:</b> 100 µL de disolvente + 100 µL de bacteria				
●	<b>Control de bacteria:</b> 100 µL de 7H9 + 100 µL de bacteria				
●	100 µL de B. Azul + 100 µL de bacteria				
●	100 µL de Antibiótico + 100 µL de bacteria				
●	100 µL de 7H9 + 100 µL de B. Azul	➔	Difusiones seriadas	➔	+ 100 µL de bacteria
●	100 µL de 7H9 + 100 µL de Antibiótico				

Esquema usado para la determinación de la MIC de un compuesto (ej. benzoquinona azul) y los antibióticos de primera y segunda línea: Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida, Etionamida, Amikacina y Moxifloxacino usando Mtb H37Rv o MDR.



6. Agregar 200 µL del compuesto a evaluar a las filas B-D y 200 µL de los antibióticos [2x] E-G, columna 3.



7. Agregar 100 µL del disolvente a la máxima concentración usada a las filas E-F, columna 11 (control del solvente).

8. Re suspender y transferir 100 µL iniciando en la columna 3 a la columna siguiente, así sucesivamente hasta llegar a la columna 10, en este punto se descartan 100 µL de la solución.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>11. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)</b>		<b>HOJA:</b> 8 <b>DE:</b> 10

9. Mezclar la bacteria en el agitador, sonicar 45 segundos y añadir 100  $\mu$ L a las filas B-G columna 11 a la columna 3 de la suspensión de bacteria previamente preparada.



10. Agregar 198  $\mu$ L de medio 7H9 + 2  $\mu$ L de bacteria (previamente preparada) en las filas (E-G), columna 2. Estos pozos sirven como control de la concentración mínima inhibitoria MIC (1% de bacteria).

11. Tapar y sellar la placa de dos lados con cinta adhesiva.

12. Hacer diluciones seriadas en microtubos de 1.5 ml de la bacteria con 7H9 y sembrar 10  $\mu$ L en placas 7H10 como un control del ensayo.

13. Colocar las placas en un contenedor sellado en una cámara húmeda y con una placa que contenga agua estéril a la incubadora a 35 °C en agitación a 70 rpm durante 7 días.

14. Agregar a todos los pozos 30  $\mu$ L de una solución de Resazurina 0.02% (peso/vol) en agua destilada, recién preparada y filtrada, (puede ser mantenida a 4 °C durante máximo una semana cubierta con papel aluminio), con la luz de la campana apagada.



15. Incubar a 37 °C por 48 hrs y observar si hay cambio de color, sembrar aquellos pozos (azules, muertas) en donde se evitó el cambio de color a rosa (vivas).

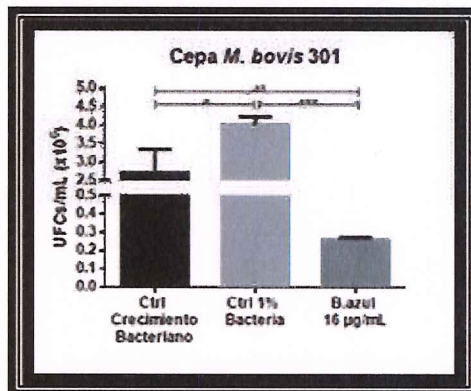
16. Hacer diluciones seriadas en placas de 96 pozos y sembrar por duplicado 10 de la dilución en 7H10 incubar a 37°C por 12 días.

17. Puntear y contar las UFC, releer 7 días después de la primera lectura, capturar los datos en una hoja de cálculo ya sea Excel o prisma, hacer gráficas y estadística.

La realización de esta técnica permite que se emitan los diagnósticos anatomopatológicos y el desarrollo de protocolos y proyectos de investigación que se realizan en el Departamento de Patología.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>11. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)</b>		<b>HOJA:</b> <b>9</b>  <b>DE:</b> <b>10</b>





## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 7H10:** Medio sólido específico para el crecimiento de micobacteria enriquecido con OADC
- 9.2 7H9:** Medio líquido específico para el crecimiento de micobacterias enriquecido con OADC.
- 9.3 Amikacina:** Antibiótico del grupo de los aminoglucósidos utilizado en el tratamiento de infecciones bacterianas.
- 9.4 benzoquinona azul:** Es una quinona derivada del veneno de alacrán.
- 9.5 Control:** Pozos contra los que se compara el resultado.
- 9.6 H37Rv Stanford:** Cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* donada por la Universidad de Stanford, California, USA.
- 9.7 Inhibitoria:** Que causa inhibición. es decir que impide el crecimiento de un microorganismo.
- 9.8 Isoniazida:** Fármaco antituberculoso utilizado para cepas sensibles.
- 9.9 MIC:** Concentración mínima inhibitoria.
- 9.10 Moxifloxacino:** Antibiótico para tratar infecciones bacterianas, se utiliza en conjunto con otros antibióticos para tratar cepas multidrogoresistentes.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>11. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)</b>		<b>HOJA:</b> 10 <b>DE:</b> 10

- 9.11 OADC:** Ácido oleico, dextrosa y catalasa
- 9.12 Pirazinamida:** Antibiótico para tratar la tuberculosis sensible.
- 9.13 Resazurina:** Es un indicador redox que permite detectar la viabilidad de las células, se mantiene azul si las células o bacterias están muertas y rosa si las células o bacterias están vivas
- 9.14 Rifampicina:** Es un antibiótico actúa sobre bacterias gram positivas
- 9.15 Sonicar:** Es el acto de aplicar energía de sonido (ultrasonido) para agitar las partículas de una muestra biológica.
- 9.16 UFC:** Unidades formadoras de colonias
- 9.17 µL:** Microlitro.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Ursolic and oleanolic acids as antimicrobial and immunomodulatory compounds for tuberculosis treatment. Jiménez-Arellanes A, Luna-Herrera J, Cornejo-Garrido J, López-García S, Castro-Mussot ME, Meckes-Fischer M, Mata-Espinosa D, Marquina B, Torres J, Hernández-Pando R. BMC Complement Altern Med. 2013 Oct 7;13:258. doi: 10.1186/1472-6882-13-258.

Mendoza Trujillo Ilse, 2021. Tesis de Maestría, UNAM (esquema).

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>12. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (Mic) en Sinergia con un Antifímico (Damas Chinas)</b>		<b>HOJA:</b> <b>1</b>  <b>DE:</b> <b>12</b>

**12. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) EN SINERGIA CON UN ANTIFÍMICO (DAMAS CHINAS)**

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV: 01
	<b>12. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (Mic) en Sinergia con un Antifímico (Damas Chinas)</b>		HOJA: 2 DE: 12

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Este ensayo de sinergia busca disminuir la concentración mínima inhibitoria para que se utilice menos compuesto en presencia del antifímico y se reduzca la actividad citotóxica del compuesto y antifímico.

## 2.0 OBJETIVO

Determinar si el compuesto de origen animal, vegetal, sintético con actividad anti micobacteriana en presencia de un antifímico conocido, potencia su efecto y disminuyen la MIC del compuesto solo.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participan en el procedimiento cuentan con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.

1. Investigadora o Investigador de Patología Experimental.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

### Material

1. Celdas de plástico.
2. Pipetas de 2 ml y 10 ml.
3. Cajas Petri estériles.
4. Tubos de 50 ml.
5. Microtubos de 1.5 ml.
6. Puntas amarillas, azules estériles.
7. Filtros de 0.22 micras.
8. Placas de 96 sin tapa estériles.
9. Marcador de punto fino indeleble.

### Equipo

1. Agitador.
2. Pipetor eléctrico.
3. Micropipetas de 20, 200 y 1000  $\mu$ L.
4. Multicanal 20 a 200  $\mu$ L.
5. Gradillas para los diferentes tubos.
6. Sonicador.
7. Incubadora de agitación.
8. Cabina de flujo laminar.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>12. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (Mic) en Sinergia con un Antifímico (Damas Chinas)</b>		<b>HOJA:</b> <b>3</b>  <b>DE:</b> <b>12</b>

9. Espectrofotómetro.
10. Lupa.
11. Incubadora a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>.

### Reactivos

1. Caldo de cultivo 7H9 complementado con OADC y glicerol.
2. Medio sólido 7H10.
3. Resazurina.
4. Antibióticos.
5. Agua estéril.

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

Cuarto de cultivo del laboratorio de patología experimental.

Sistema inyección y extracción de aire operado por manejadoras y una condensadora (Sistema HVAC, del inglés Heating – Ventilation - Air Conditioning, en español: Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado) ubicados en la azotea del edificio de patología; este sistema provee la presión negativa (-30pa) al interior del cuarto de cultivo, además de proporcionar la temperatura (21+/-3 °C) y humedad relativa (45%) necesarias para mantener condiciones de bioseguridad.

Sistema HVAC filtra el aire a través de un banco de filtros con poro de diferentes calibres, comenzando con un filtro grueso hasta llegar a un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) con un porcentaje de eficiencia de 99.9997%, es durante este proceso que el sistema HVAC lo enfría/calienta y humedece según la necesidad del cuarto de cultivo.

Sistema de esclusamiento a la entrada del cuarto de cultivo, esta mantiene una presión positiva (+30pa) formando una barrera (cortina de aire) que evita que salga el aire del interior o que el aire exterior entre al cuarto. El sistema de esclusamiento cuenta con puertas de cierre hermético cuyo acceso es biométrico sin permitir que se abran las dos puertas al mismo tiempo evitando con esto la pérdida de presión positiva/negativa dentro del cuarto de cultivo.

Antes de ingresar se verifica que los manómetros marquen -30 pascales (manómetro superior, reporta la presión dentro del cuarto) y +30 pascales (manómetro inferior que marca la presión dentro de la esclusa). El recambio de aire filtrado se hace 18 veces por hora, el aire que se incorpora al medio ambiente también es filtrado a través de un banco de filtros de tipo Bag-in Bag-out para incorporarse al ambiente de manera estéril libre de patógenos y/o partículas.

Dentro del cuarto se cuenta con dos campanas de flujo laminar, 3 incubadoras estáticas, una incubadora en agitación, una centrifuga, dos homogeneizadores de tejidos, un equipo de enfriamiento a base de nitrógeno líquido, un fotomicroscopio invertido con lámpara de fluorescencia y monitor con CPU, un microscopio estereoscópico, dos agitadores, un espectrofotómetro, un baño maría de temperatura regulable, un equipo pipetor semiautomático, dos juegos de micro pipetas de 1ml, 0.2ml y 0.020ml, una micropipeta multicanal, gavetas para guardar material.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 <b>SALUD</b> <small>SECRETARÍA DE SALUD</small> 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>12. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (Mic) en Sinergia con un Antifímico (Damas Chinas)</b>		<b>HOJA:</b> <b>4</b>  <b>DE:</b> <b>12</b>

El cuarto de cultivo se trabaja con micobacterias patógenas para la humanidad, consideradas dentro del grupo de riesgo 3 de microorganismos patógenos cuya transmisión puede ser por vía aérea. También se trabaja con cultivos celulares de diferentes líneas (macrófagos, pneumocitos, etc.), que requieren un ambiente de trabajo con un nivel de esterilidad alto.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas




Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

### NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-054-SEMARNAT-1993, Que establece el procedimiento para determinar la incompatibilidad entre dos o más residuos considerados como peligrosos.  
D.O.F. 22-X-1993

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 <b>SALUD</b> SECRETARÍA DE SALUD 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>12. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (Mic) en Sinergia con un Antifímico (Damas Chinas)</b>		<b>HOJA: 5</b>  <b>DE: 12</b>

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.

D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.

D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.

D.O.F. 02-II-1999

Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-2014, Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral-Reconocimiento, evaluación y control.

D.O.F. 28-IV-2014

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.

D.O.F. 09-X-2015

Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.

D.O.F. 27-I-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.


D.O.F. 21-II-2017

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

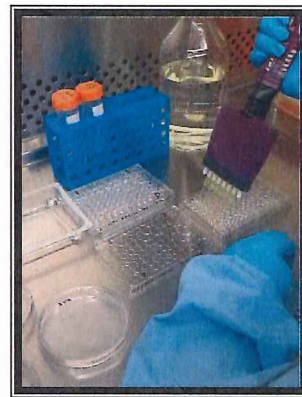
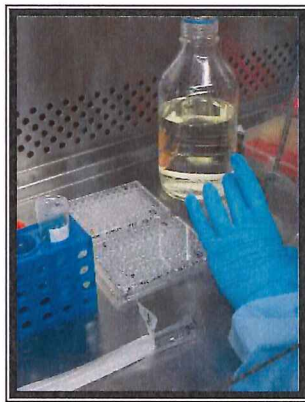
La Investigadora y/o el Investigador de Patología Experimental son responsables de realizar las siguientes actividades:

- 1 Iniciar un cultivo con 60 mL de 7H9 + 1000  $\mu$ L de bacteria *M tuberculosis* H37Rv Stanford y esperar 14 días.
- 2 Leer en una celda de plástico la densidad óptica del cultivo a 600 nm y ajustar con 7H9 hasta obtener 0.05 de densidad óptica leída a 600 nm.
- 3 Realizar una solución de antibiótico filtrada en medio 7H9 con una concentración final de 4 veces la concentración inicial a probar [4x], hacer cálculos para que queden en 50  $\mu$ L.
- 4 Preparar el compuesto a probar en concentración 4x en caldo de cultivo 7H9 hacer cálculos para que quede 4 veces concentrado, pues el volumen final será de 200  $\mu$ L.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>12. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (Mic) en Sinergia con un Antifímico (Damas Chinas)</b>		<b>HOJA:</b> 6 <b>DE:</b> 12

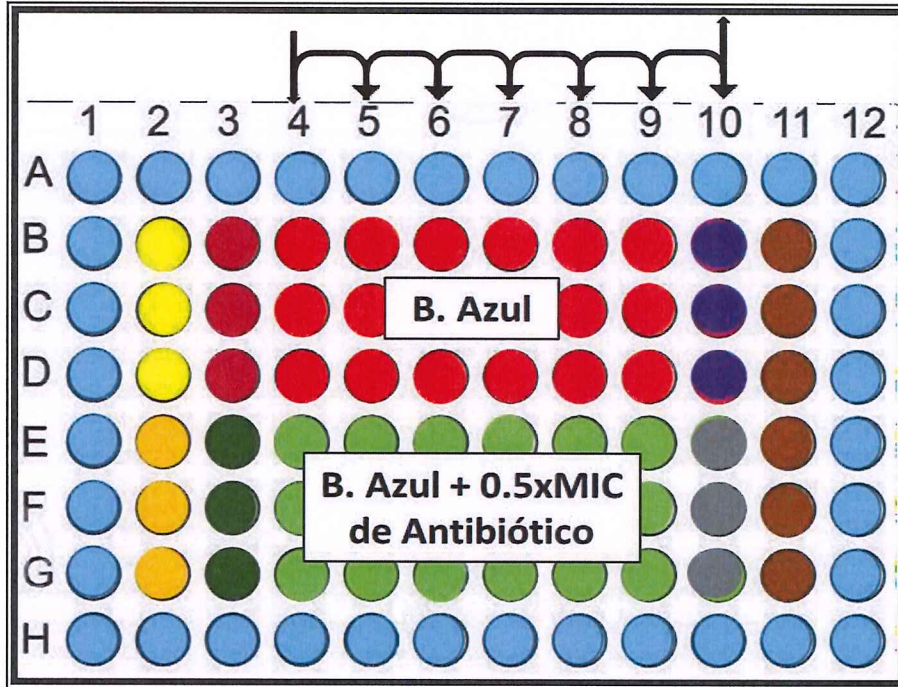
- 5 Agregar 100  $\mu$ L de medio 7H9 a los pozos de las filas (B-D), columnas (4-11) y 200  $\mu$ L en las filas (B-D) columna 2 (pozos del control de caldo de cultivo 7H9). Dejar vacía la columna 6. Agregar 200  $\mu$ L del compuesto a evaluar en la columna 3 filas B-D y transferir 100  $\mu$ L a la columna 4 y hacer diluciones seriadas hasta la columna 10 donde se eliminan los últimos 100  $\mu$ L.



- 6 Agregar 100  $\mu$ L del disolvente a la máxima concentración usada a las filas E-F, columna 11 (control del solvente).
- 7 Agregar 50  $\mu$ L de medio 7H9 a los pozos de las filas (E-G), columnas (4-11)
- 8 Agregar 100  $\mu$ L del compuesto a evaluar en la columna 3 filas B-D y transferir 50  $\mu$ L a la columna 4 y hacer diluciones seriadas hasta la columna 10 donde se eliminan los últimos 50  $\mu$ L
- 9 Agregar 50  $\mu$ L del antibiótico 4x (mic 0.5x) a los pozos de la columna (11-4)
- 10 Mezclar la bacteria en el agitador, sonicar 45 segundos y añadir 100  $\mu$ L a las filas B-G columna 11 a la columna 3 de la suspensión de bacteria previamente preparada.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>12. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (Mic) en Sinergia con un Antifímico (Damas Chinas)</b>		<b>HOJA:</b> 7 <b>DE:</b> 12

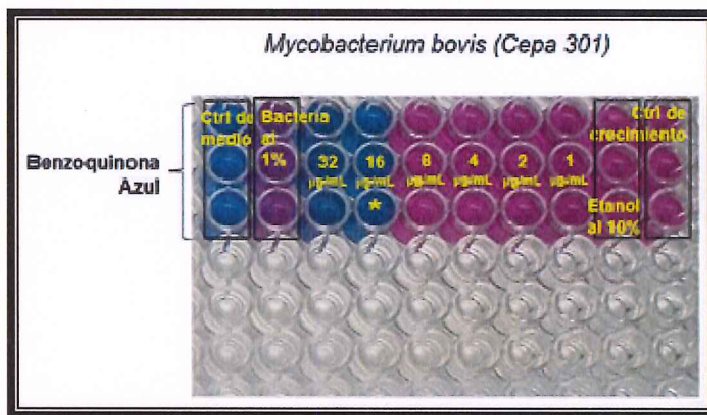


- 200 µL de agua inyectable estéril
- **Control de medio:** 200 µL de 7H9
- **Control de MIC:** 198 µL de 7H9 + 2 µL de bacteria
- **Control de disolvente:** 100 µL de disolvente + 100 µL de bacteria
- **Control de bacteria:** 100 µL de 7H9 + 100 µL de bacteria
- **Control de Antibiótico:** 50 µL de 7H9 + 50 µL de Antibiótico + 100 µL de bacteria
- 100 µL de B. Azul + 100 µL de bacteria
- 50 µL de Antibiótico + 50 µL de B. Azul + 100 µL de bacteria
- 100 µL de 7H9 + 100 µL de B. Azul → Diluciones seriadas → + 100 µL de bacteria
- 50 µL de 7H9 + 50 µL de B. Azul → Diluciones seriadas → + 50 µL de Antibiótico → + 100 µL de bacteria

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>12. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (Mic) en Sinergia con un Antifímico (Damas Chinas)</b>		<b>HOJA: 8</b>  <b>DE: 12</b>

- 11 Agregar 198  $\mu\text{L}$  de medio 7H9 + 2  $\mu\text{L}$  de bacteria (previamente preparada) en las filas (E-G), columna 2. Estos pozos sirven como control de la concentración mínima inhibitoria MIC (1% de bacteria).
- 12 Tapar la placa y sellar de dos lados con cinta adhesiva.
- 13 Hacer diluciones seriadas en microtubos de 1.5ml de la bacteria con 7H9 y sembrar 10  $\mu\text{L}$  de la dilución en placas 7H10 como un control del ensayo.
- 14 Colocar las placas en un contenedor sellado en una cámara húmeda y con una placa que contenga agua estéril a la incubadora a 35°C en agitación a 70 rpm durante 7 días.
- 15 Agregar a todos los pozos 30  $\mu\text{L}$  de una solución de Resazurina 0.02% (peso/vol) en agua destilada, recién preparada y filtrada, (puede ser mantenida a 4 °C durante máximo una semana cubierta con papel aluminio), con la luz de la campana apagada.
- 16 Incubar a 37 °C por 48 hrs y observar si hay cambio de color, sembrar aquellos pozos que corresponden a la MIC del compuesto aquellos pozos donde se evita el cambio de color (azules, muertas) a rosa (vivas).



- 17 Hacer diluciones seriadas en placas de 96 pozos y sembrar por duplicado 10  $\mu\text{L}$  de la dilución en 7H10.
- 18 Incubar a 37°C por 12 días, puntear con marcador indeleble y contar las UFC, releer 7 días después de la primera lectura, capturar los datos en una hoja de cálculo (Excel o prisma), hacer gráficas y estadística.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>12. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (Mic) en Sinergia con un Antifímico (Damas Chinas)</b>		<b>HOJA:</b> <b>9</b>  <b>DE:</b> <b>12</b>

La determinación de sinergia se realizó haciendo uso de la siguiente fórmula 76:

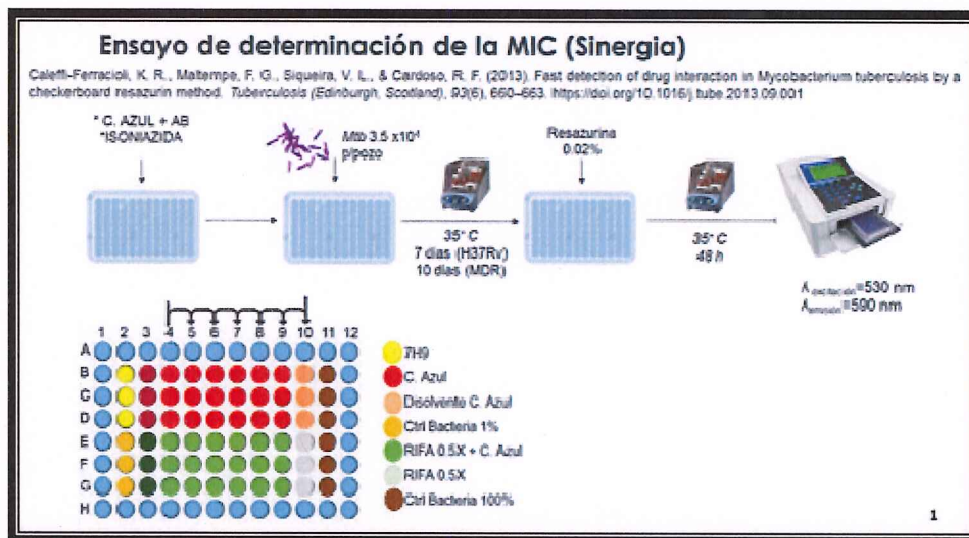
$$FICI = \frac{MIC\ A\ en\ combinació\ n}{MIC\ A} + \frac{MIC\ B\ en\ combinació\ n}{MIC\ B}$$

Donde A y B representa la MIC de los dos fármacos en combinación, mientras MIC A y MIC B se refiere a la MIC de los fármacos solos.

Los resultados de FICI obtenidos se interpretaron de la siguiente manera<sup>76</sup>:

≤ 0.5	sinergia
0.5 - 1	sinergia parcial
1	aditivo
1 - 4	indiferente
4	antagonismo

Esquema usado en el ensayo de tablero de damas chinas para la determinación de la MIC de un compuesto (ej. la benzoquinona azul) en conjunto de los antibióticos de primera y segunda línea: Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida, Etionamida, Amikacina y Moxifloxacino usando *M tuberculosis* H37Rv o MDR.



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>12. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (Mic) en Sinergia con un Antifímico (Damas Chinas)</b>		<b>HOJA:</b> 10 <b>DE:</b> 12

**0.5xMIC MIX**

Rifampicina: **0.0625** µg/mL  
Pirazinamida: **64** µg/mL  
Isoniazida: **0.03125** µg/mL

**Fractional Inhibitory Concentration Index:**

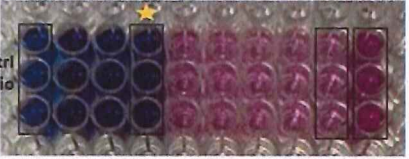
$$FICI = \frac{MIC\ Azul_{combinación}}{MIC\ Azul_{solo}} + \frac{MIC\ Antibiótico_{combinación}}{MIC\ Antibiótico_{solo}}$$

**FICI**

≤ 0.5 sinergia  
> 0.5 - 1 sinergia parcial  
1 aditivo  
> 1 - 4 indiferente  
> 4 antagonismo

**C. azul: 8 - 0.125 µg/mL**

+ MIX: **2** µg/mL      **Ctrl**  
MIX Bacteria



**FICI<sub>Rifampicina</sub>** =  $\frac{2\ \mu\text{g/mL}}{2\ \mu\text{g/mL}} + \frac{0.125\ \mu\text{g/mL}}{0.0625\ \mu\text{g/mL}} = 1.5$   
indiferente

**FICI<sub>Pirazinamida</sub>** =  $\frac{2\ \mu\text{g/mL}}{2\ \mu\text{g/mL}} + \frac{64\ \mu\text{g/mL}}{128\ \mu\text{g/mL}} = 1.5$   
indiferente

**FICI<sub>Isoniazida</sub>** =  $\frac{1\ \mu\text{g/mL}}{2\ \mu\text{g/mL}} + \frac{0.03125\ \mu\text{g/mL}}{0.0625\ \mu\text{g/mL}} = 1^*$   
aditivo

4

La realización de esta técnica permite que se emitan los diagnósticos anatomopatológicos y el desarrollo de protocolos y proyectos de investigación que se realizan en el Departamento de Patología.




## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 7H10:** Medio sólido específico para el crecimiento de micobacteria enriquecido con OADC
- 9.2 7H9:** Medio líquido específico para el crecimiento de micobacterias enriquecido con OADC.
- 9.3 Actividad citotóxica:** Es la capacidad de un compuesto para eliminar bacterias o células, se reporta en porcentaje de viabilidad.
- 9.4 Amikacina:** Antibiótico del grupo de los aminoglucósidos utilizado en el tratamiento de infecciones bacterianas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</b>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>12. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (Mic) en Sinergia con un Antifímico (Damas Chinas)</b>		<b>HOJA:</b> 11 <b>DE:</b> 12

- 9.5 Antifímico:** Son fármacos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis, se dividen en antifímicos de primera línea para cepas sensibles o de segunda línea para cepas resistentes a los fármacos de primera línea.
- 9.6 Control:** Pozos contra los que se compara el resultado.
- 9.7 Etionamida:** Antibiótico para tratar la tuberculosis resistente a fármacos, que se utiliza en combinación con otros fármacos.
- 9.8 Isoniazida:** Fármaco antituberculoso utilizado para cepas sensibles.
- 9.9 H37Rv Stanford:** Cepa virulenta de Mycobacterium tuberculosis donada por la Universidad de Stanford, California, USA.
- 9.10 Inhibitoria:** Que causa inhibición. es decir que impide el crecimiento de un microorganismo.
- 9.11 Isoniazida:** Fármaco antituberculoso utilizado para cepas sensibles.
- 9.12 MDR:** Multidrogorresistente.
- 9.13 MIC:** Concentración mínima inhibitoria.
- 9.14 OADC:** Ácido oleico, dextrosa y catalasa
- 9.15 Pirazinamida:** Antibiótico para tratar la tuberculosis sensible.
- 9.16 Resazurina:** Es un indicador redox que permite detectar la viabilidad de las células, se mantiene azul si las células o bacterias están muertas y rosa si las células o bacterias están vivas
- 9.17 Rifampicina:** Es un antibiótico actúa sobre bacterias gram positivas
- 9.18 Sonicar:** Es el acto de aplicar energía de sonido (ultrasonido) para agitar las partículas de una muestra biológica.
- 9.19 UFC:** Unidades formadoras de colonias
- 9.20 µL:** Microlitro.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>12. Procedimiento Técnico para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (Mic) en Sinergia con un Antifímico (Damas Chinas)</b>		<b>HOJA:</b> 12 <b>DE:</b> 12

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Mendoza Trujillo Ilse, 2021. Tesis de Maestría, UNAM (esquema).


Mahmud, H. A., Seo, H., Kim, S., Islam, M. I., Sultana, O. F., Nam, K. W., Lee, B. E., Sadu, V. S., Lee, K. I., & Song, H. Y. (2021). Synthesis and activity of BNF15 against drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Future medicinal chemistry*, 13(3), 251–267. DOI: 10.4155/fmc-2019-015.

Caleffi-Ferracioli, K. R., Maltempe, F. G., Siqueira, V. L., & Cardoso, R. F. (2013). Fast detection of drug interaction in Mycobacterium tuberculosis by a checkerboard resazurin method. *Tuberculosis*, 93(6), 660–663. DOI: 10.1016/j.tube.2013.09.001.

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN



Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>13. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Citotoxicidad en Células In Vitro</b>		<b>HOJA:</b> <b>1</b>  <b>DE:</b> <b>9</b>

### 13. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS IN VITRO

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>13. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Citotoxicidad en Células In Vitro</b>		<b>HOJA:</b> <b>2</b>  <b>DE:</b> <b>9</b>

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Evaluar si un compuesto tiene efectos tóxicos sobre células vivas. Se utiliza la resazurina (azul) que es reducida a resofurina (rosa) por óxido-reductasas, que se encuentran principalmente en las mitocondrias de las células vivas.

## 2.0 OBJETIVO

Determinar la concentración a la que un compuesto es tóxico en una línea celular, ya sea MHS, J774 u A549.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participan en el procedimiento cuentan con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.



1. Investigadora o Investigador de Patología Experimental.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

### Material

1. Pipetas de 2ml y 10 ml
2. Cajas Petri estériles
3. Tubos de 50 ml
4. Microtubos de 1.5 ml
5. Puntas amarillas, azules estériles
6. Placas de 96 sin tapa estériles
7. Marcador de punto fino indeleble
8. Placa de 12 pozos o de 96 pozos
9. Botella de 75 cm<sup>2</sup> con células al 80% de confluencia en RPMI 10%
10. Botellas de vidrio de boca ancha para recuperar desechos
11. Bolsas rojas especiales para autoclavar material con bacterias
12. Bolsa de plástico para basura

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>13. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Citotoxicidad en Células In Vitro</b>		<b>HOJA:</b> 3 <b>DE:</b> 9

### Equipo

1. Agitador
2. Pipetor eléctrico
3. Micropipetas de 20, 200 y 1000 microlitros
4. Multicanal 20 a 200 microlitros
5. Gradillas para los diferentes tubos
6. Cabina de flujo laminar
7. Incubadora a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>
8. Microscopio invertido
9. Cámara de neubauer y portaobjetos de la cámara.
10. Centrifuga 1500 rpm por 5 min
11. Autoclave

### Reactivos

1. Resazurina
2. Agua estéril
3. PBS
4. PBS-EDTA
5. RPMI
6. RPMI COMPLETO
7. DMSO
8. Compuesto a probar
9. Agua estéril
10. Azul tripan al 1% en PBS

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS



Cuarto de cultivo del laboratorio de patología experimental.

Sistema inyección y extracción de aire operado por manejadoras y una condensadora (Sistema HVAC, del inglés Heating – Ventilation - Air Conditioning, en español: Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado) ubicados en la azotea del edificio de patología; este sistema provee la presión negativa (-30pa) al interior del cuarto de cultivo, además de proporcionar la temperatura (21+/-3 °C) y humedad relativa (45%) necesarias para mantener condiciones de bioseguridad.

Sistema HVAC filtra el aire a través de un banco de filtros con poro de diferentes calibres, comenzando con un filtro grueso hasta llegar a un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) con un porcentaje de eficiencia de 99.9997%, es durante este proceso que el sistema HVAC lo enfría/calienta y humedece según la necesidad del cuarto de cultivo.

Sistema de esclusamiento a la entrada del cuarto de cultivo, esta mantiene una presión positiva (+30pa) formando una barrera (cortina de aire) que evita que salga el aire del interior o que el aire exterior entre al cuarto. El sistema de esclusamiento cuenta con puertas de cierre hermético cuyo acceso es biométrico sin permitir que se abran las dos puertas al mismo tiempo evitando con esto la pérdida de presión positiva/negativa dentro del cuarto de cultivo.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>13. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Citotoxicidad en Células In Vitro</b>		<b>HOJA:</b> 4 <b>DE:</b> 9

Antes de ingresar se verifica que los manómetros marquen -30 pascales (manómetro superior, reporta la presión dentro del cuarto) y +30 pascales (manómetro inferior que marca la presión dentro de la esclusa). El recambio de aire filtrado se hace 18 veces por hora, el aire que se incorpora al medio ambiente también es filtrado a través de un banco de filtros de tipo Bag-in Bag-out para incorporarse al ambiente de manera estéril libre de patógenos y/o partículas.

Dentro del cuarto se cuenta con dos campanas de flujo laminar, 3 incubadoras estáticas, una incubadora en agitación, una centrifuga, dos homogeneizadores de tejidos, un equipo de enfriamiento a base de nitrógeno líquido, un fotomicroscopio invertido con lámpara de fluorescencia y monitor con CPU, un microscopio estereoscópico, dos agitadores, un espectrofotómetro, un baño maría de temperatura regulable, un equipo pipetor semiautomático, dos juegos de micro pipetas de 1ml, 0.2ml y 0.020ml, una micropipeta multicanal, gavetas para guardar material.

El cuarto de cultivo se trabaja con micobacterias patógenas para la humanidad, consideradas dentro del grupo de riesgo 3 de microorganismos patógenos cuya transmisión puede ser por vía aérea. También se trabaja con cultivos celulares de diferentes líneas (macrófagos, pneumocitos, etc.), que requieren un ambiente de trabajo con un nivel de esterilidad alto.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas



Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>13. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Citotoxicidad en Células In Vitro</b>		<b>HOJA:</b> 5  <b>DE:</b> 9

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

### NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.  
D.O.F. 09-XII-2008

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.  
D.O.F. 09-X-2015

Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.  
D.O.F. 27-I-2016



Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.  
D.O.F. 21-II-2017

### 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

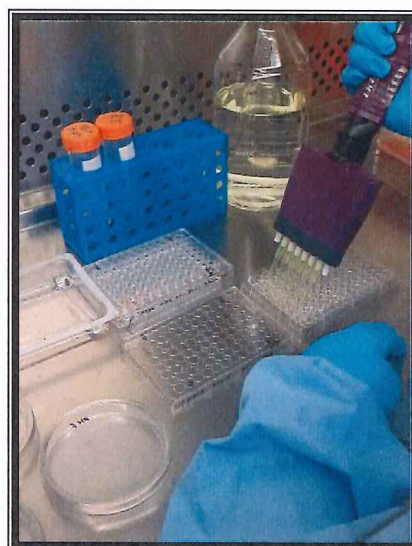
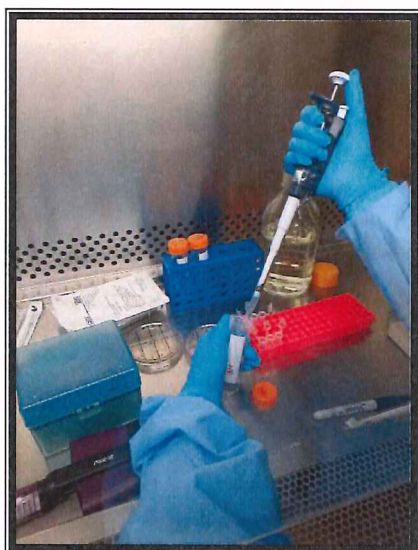
La Investigadora y/o el Investigador de Patología Experimental son responsables de realizar las siguientes actividades:

1. Despegar por media hora las células MHS con PBS-EDTA, golpear la placa contra la mano para despegar las células, recuperar en tubo de 50 ml y centrifugar por 1500 rpm por 10 min, descartar el sobrenadante y contar utilizando el azul tripan las células vivas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022



	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>13. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Citotoxicidad en Células In Vitro</b>		<b>HOJA:</b> 6 <b>DE:</b> 9

- Sembrar en forma de cruz 100,000 células MHS en placas de 12 pozos, en 500 µl de medio completo (RPMI+10% SFB) por pozo, un día antes del ensayo y dejarlas incubando con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C o 10,000 células MHS en placas de 96 pozos en un volumen de 100 ul, colocar agua estéril en los pozos del borde para evitar evaporación.
- Realizar las diluciones en microtubos por cuadruplicado en medio RPMI completo.



- Retirar el sobrenadante y colocar 100 µl del compuesto diluido, tomar en cuenta los pozos de RPMI completo (control positivo) y DMSO al 10% disuelto en RPMI (control negativo), también se colocan por cuadruplicado, dejar incubando por 48hrs.
- Observar al microscopio y si es conveniente tomar fotografías. Lavar 2 veces con PBS1x estéril y agregar 100 µl de RPMI completo, agregar 20 µl de resazurina 0.15mg/ml (disuelta en PBS 1X ph 7.4 y filtrada), incubar 24 hrs. en la incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y cámara húmeda.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>13. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Citotoxicidad en Células In Vitro</b>		<b>HOJA:</b> <b>7</b>  <b>DE:</b> <b>9</b>

6. Observar el cambio de color las tratadas con DMSO Después de 24 hrs, se mantienen en color azul (muertas) y las tratadas con RPMI completo están en color en rosa. Se lee la absorbancia de la placa a 600 nm. Se puede graficar tomando el 100% de viabilidad aquellos pozos que solo contenían el RPMI completo o bien los pozos tratados con DMSO el 100% de muertas y se hacen reglas de tres para saber qué tan tóxico es nuestro compuesto, en el eje de x se colocan los tratamientos y en el eje de y la absorbancia.



La realización de esta técnica permite que se emitan los diagnósticos anatomopatológicos y el desarrollo de protocolos y proyectos de investigación que se realizan en el Departamento de Patología.



## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 µl:** Microlitro.
- 9.2 A549:** Línea celular de epiteliales de pulmón humano, son adherentes.
- 9.3 Absorbancia:** Nos indica la cantidad de luz absorbida por la muestra biológica y se define como el logaritmo de 1/T  $A = \log 1/T$ .

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>13. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Citotoxicidad en Células In Vitro</b>		<b>HOJA:</b> 8 <b>DE:</b> 9

- 9.4 azul tripan:** Es un colorante que se utiliza en ensayos de viabilidad que permite diferenciar entre células vivas de células muertas.
- 9.5 DMSO:** El dimetilsulfóxido es un líquido orgánico incoloro, es utilizado como disolvente orgánico polar y como criopreservante.
- 9.6 EDTA anhidro:** Ácido etilendiaminotetracético libre de agua.
- 9.7 J774A.1:** Línea celular de macrófagos peritoneales murinos, son células adherentes.
- 9.8 MHS:** Línea celular de macrófagos alveolares murinos, son adherentes y también crecen en suspensión.
- 9.9 Mitocondrias:** Son organelos citoplasmáticos de las células eucariotas, de forma ovoide, formada por una doble membrana, producen energía mediante el consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono y agua.
- 9.10 oxido-reductasas:** Es una enzima que cataliza la transferencia de electrones de una molécula donadora a otra receptora, es conocida como reacción redox.
- 9.11 PBS:** Solución fosfatada pH 7.4.
- 9.12 PBS1x estéril:** Solución fosfatada pH 7.4 esterilizada a 121°C 15 lb de presión.
- 9.13 PBS-EDTA:** Para preparar un litro se pesa 0.38 gramos de EDTA anhidro y se afora con un litro de PBS.
- 9.14 Resazurina:** Es un indicador redox, permeable a las células color azul.
- 9.15 Resofurina:** Cuando la resazurina se reduce se forma la resofurina color rosa.
- 9.16 RPMI completo:** Medio de cultivo de células desarrollado por Roswell Park Memorial Institute con 10% de suero fetal bovino
- 9.17 SFB descomplementado:** Suero fetal bovino descomplementado a 56°C por 30 min.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>13. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Citotoxicidad en Células In Vitro</b>		<b>HOJA:</b> 9
		<small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>DE:</b> 9

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. Borra RC, Lotufo MA, Gagioti SM, Barros F de M, Andrade PM. Braz. Oral Res. 2009;23(3):255-62.

An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. Vega-Avila E, Pugsley MK. Proc. West Pharmacol Soc. 2011;54:10-4

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 <b>SALUD</b> SECRETARÍA DE SALUD 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV:      01
	<b>14. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Inhibición del Crecimiento Bacteriano en Líneas Celulares Eucariotas Infectadas con M.Tb</b>		HOJA:     1  DE:        8

**14. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL  
CRECIMIENTO BACTERIANO EN LÍNEAS CELULARES EUCARIOTAS INFECTADAS CON  
M.TB**

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV:      01
	<b>14. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Inhibición del Crecimiento Bacteriano en Líneas Celulares Eucariotas Infectadas con M.Tb</b>		HOJA:     2  DE:        8

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Evaluar si un compuesto (con una MIC comprobada) tiene efecto antimicobacteriano en células eucariotas infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv (cepa sensible a fármacos) y MDR (cepa Multidrogorresistente a fármacos CIBIN99) a través del tiempo.

## 2.0 OBJETIVO

Determinar la carga bacteriana en células infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* tratadas o no con el compuesto a las 0, 48 y 72 horas.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participan en el procedimiento cuentan con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.


1. Investigadora e Investigador de Patología Experimental

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

### Material

1. Pipetas de 2 ml y 10 ml
2. Cajas Petri estériles
3. Tubos de 50 ml
4. Microtubos de 1.5 ml
5. Puntas amarillas, azules estériles
6. Placas de 96 sin tapa estériles
7. Marcador de punto fino indeleble
8. Placa de 12 pozos o de 96 pozos
9. Botella de 75 cm<sup>2</sup> con células al 80% de confluencia en RPMI 10 %
10. Botellas de vidrio de boca ancha para recuperar desechos
11. Bolsas rojas especiales para autoclavar material con bacterias
12. Bolsa de plástico para basura

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licóna	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>14. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Inhibición del Crecimiento Bacteriano en Líneas Celulares Eucariotas Infectadas con M.Tb</b>		<b>HOJA:</b> <b>3</b>  <b>DE:</b> <b>8</b>

### Equipo

1. Agitador
2. Pipetor eléctrico
3. Micropipetas de 20, 200 y 1000  $\mu$ L.
4. Multicanal 20 a 200  $\mu$ L.
5. Gradillas para los diferentes tubos.
6. Cabina de flujo laminar.
7. Incubadora a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>.
8. Microscopio invertido.
9. Cámara de neubauer y portaobjetos de la cámara.
10. Centrifuga 1500 rpm por 5 min.
11. Autoclave.

### Reactivos

1. Resazurina.
2. Agua estéril.
3. PBS.
4. PBS-EDTA.
5. RPMI.
6. RPMI COMPLETO.
7. DMSO.
8. Compuesto a probar.
9. Agua estéril.
10. Azul tripan al 1 % en PBS.



## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

Cuarto de cultivo del laboratorio de patología experimental.

Sistema inyección y extracción de aire operado por manejadoras y una condensadora (Sistema HVAC, del inglés Heating – Ventilation - Air Conditioning, en español: Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado) ubicados en la azotea del edificio de patología; este sistema provee la presión negativa (-30pa) al interior del cuarto de cultivo, además de proporcionar la temperatura (21+/-3 °C) y humedad relativa (45%) necesarias para mantener condiciones de bioseguridad.

Sistema HVAC filtra el aire a través de un banco de filtros con poro de diferentes calibres, comenzando con un filtro grueso hasta llegar a un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) con un porcentaje de eficiencia de 99.9997%, es durante este proceso que el sistema HVAC lo enfría/calienta y humedece según la necesidad del cuarto de cultivo.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>14. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Inhibición del Crecimiento Bacteriano en Líneas Celulares Eucariotas Infectadas con M.Tb</b>		<b>HOJA:</b> <b>4</b> <b>DE:</b> <b>8</b>

Sistema de esclusamiento a la entrada del cuarto de cultivo, esta mantiene una presión positiva (+30pa) formando una barrera (cortina de aire) que evita que salga el aire del interior o que el aire exterior entre al cuarto. El sistema de esclusamiento cuenta con puertas de cierre hermético cuyo acceso es biométrico sin permitir que se abran las dos puertas al mismo tiempo evitando con esto la pérdida de presión positiva/negativa dentro del cuarto de cultivo.

Antes de ingresar se verifica que los manómetros marquen -30 pascales (manómetro superior, reporta la presión dentro del cuarto) y +30 pascales (manómetro inferior que marca la presión dentro de la esclusa). El recambio de aire filtrado se hace 18 veces por hora, el aire que se incorpora al medio ambiente también es filtrado a través de un banco de filtros de tipo Bag-in Bag-out para incorporarse al ambiente de manera estéril libre de patógenos y/o partículas.

Dentro del cuarto se cuenta con dos campanas de flujo laminar, 3 incubadoras estáticas, una incubadora en agitación, una centrifuga, dos homogeneizadores de tejidos, un equipo de enfriamiento a base de nitrógeno líquido, un fotomicroscopio invertido con lámpara de fluorescencia y monitor con CPU, un microscopio estereoscópico, dos agitadores, un espectrofotómetro, un baño maría de temperatura regulable, un equipo pipetor semiautomático, dos juegos de micro pipetas de 1ml, 0.2ml y 0.020ml, una micropipeta multicanal, gavetas para guardar material.

El cuarto de cultivo se trabaja con micobacterias patógenas para la humanidad, consideradas dentro del grupo de riesgo 3 de microorganismos patógenos cuya transmisión puede ser por vía aérea. También se trabaja con cultivos celulares de diferentes líneas (macrófagos, pneumocitos, etc.), que requieren un ambiente de trabajo con un nivel de esterilidad alto.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	24-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>14. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Inhibición del Crecimiento Bacteriano en Líneas Celulares Eucariotas Infectadas con M.Tb</b>		<b>HOJA:</b> <b>5</b> <b>DE:</b> <b>8</b>

**REGLAMENTOS**

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.

D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.

D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

**NORMAS OFICIALES**

Norma Oficial Mexicana NOM-053-SEMARNAT-1993, Que establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.

D.O.F. 22-X-1993

Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993, Que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo. Generalidades.

D.O.F. 27-II-1995

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.

D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.

D.O.F 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

D.O.F. 17-II-2003


Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.

D.O.F 09-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.

D.O.F. 21-II-2017

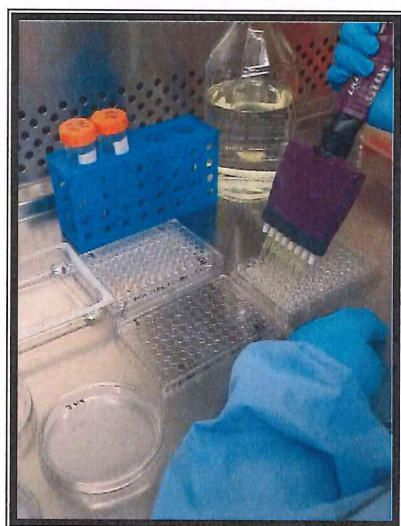
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>14. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Inhibición del Crecimiento Bacteriano en Líneas Celulares Eucariotas Infectadas con M.Tb</b>		<b>HOJA:</b> 6 <b>DE:</b> 8

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

La Investigadora y/o el Investigador de Patología Experimental son responsables de realizar las siguientes actividades:

1. Sembrar 100,000 células/pozo, en placas de 12 pozos con RPMI completo (suplementado con 10% de suero fetal bovino) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas.
2. Infectar con MOI 1:5 en RPMI, incubar por una hora, agitando cada 15 min, lavar 3 veces con RPMI-antibiótico 1%.
3. Reconstituir el medio con 500 µL de RPMI completo con el compuesto a probar, para algunos compuestos suplementar todos los días (dependerá de la vida media de cada compuesto).
4. En los tiempos en los que se desea evaluar, lisar las células con SDS al 0.1 % en 7H9, incubar a temperatura ambiente 10 min y agregar BSA al 20 % en 7H9, mezclar muy bien y hacer diluciones seriadas en medio líquido 7H9 y sembrar por duplicado en placas con medio sólido 7H10.

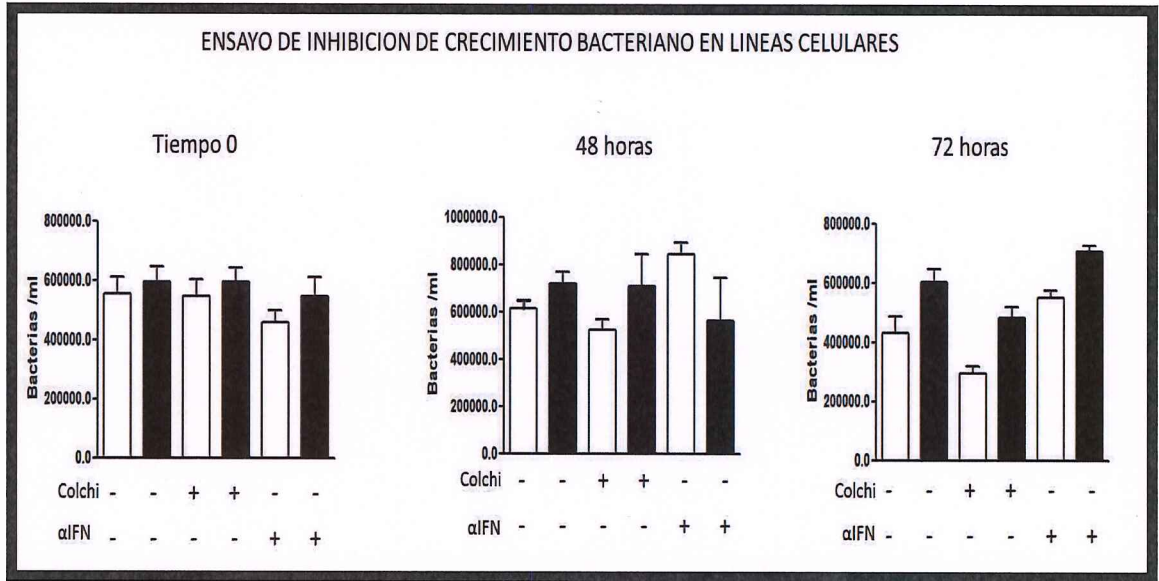


5. Puntear con marcador indeleble y contar las UFC releer 7 días después de la primera lectura, capturar los datos en una hoja de cálculo (Excel o prisma), hacer gráficas y estadística.

### CONTROL DE EMISIÓN

	<b>Elaboró:</b>	<b>Revisó:</b>	<b>Autorizó:</b>
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>14. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Inhibición del Crecimiento Bacteriano en Líneas Celulares Eucariotas Infectadas con M.Tb</b>		<b>HOJA:</b> <b>7</b>  <b>DE:</b> <b>8</b>



La realización de esta técnica permite que se emitan los diagnósticos anatomopatológicos y el desarrollo de protocolos y proyectos de investigación que se realizan en el Departamento de Patología.



### 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

### 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 7H10:** Medio sólido específico para el crecimiento de micobacteria enriquecido con OADC.
- 9.2 7H9:** Medio líquido específico para el crecimiento de micobacterias enriquecido con OADC.
- 9.3 Antimicobacteriano:** Fármacos utilizados para el tratamiento de infecciones micobacterianas incluidas la tuberculosis, lepra y micobacterias no tuberculosas.
- 9.4 BSA al 20 %:** Albúmina bovina sérica al 20% en 7H9.
- 9.5 Células eucariotas:** Son todas aquellas células que tienen un núcleo.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimato Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>14. Procedimiento Técnico para Realizar Ensayo de Inhibición del Crecimiento Bacteriano en Líneas Celulares Eucariotas Infectadas con M.Tb</b>		<b>HOJA:</b> 8 <b>DE:</b> 8

- 9.6 Diluciones seriadas:** Es la reducción progresiva de la concentración de una sustancia en solución, lo que da como resultado una progresión logarítmica es decir reducción de la muestra biológica 10 veces, 100 veces, 1000 veces, 10,000 veces, etc.
- 9.7 MOI:** Índice de multiplicidad de infección es la proporción en una infección del número de células con respecto al número de bacterias.
- 9.8 Mycobacterium tuberculosis:** Es el agente causal de la tuberculosis, es aerobia estricta y es un bacilo ácido alcohol resistente.
- 9.9 RPMI:** Medio de cultivo de células desarrollado por Roswell Park Memorial Institute.
- 9.10 UFC:** Unidades formadoras de colonias.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Nucleotide-oligomerizing domain -1 (NOD1) receptor activation induces proinflammatory responses and autophagy in human alveolar macrophages. Juárez E, Carranza C, Hernandez-Sanchez f, Loyola E, Escobedo DE, Leon-Contreras JC, Hernández-Pando R, Torres M, Sada E. BMC Pulm Med 2014. 14:152

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN




Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>15. Procedimiento Técnico para Determinar la Carga Bacilar de Mycobacterium tuberculosis</b>		<b>HOJA: 1</b> <b>DE: 8</b>

## 15. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA DETERMINAR LA CARGA BACILAR DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</b>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>15. Procedimiento Técnico para Determinar la Carga Bacilar de Mycobacterium tuberculosis</b>		<b>HOJA:</b> 2  <b>DE:</b> 8

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Es un método que cuantifica la carga bacteriana de una muestra biológica proveniente de un órgano de un ratón (pulmón, bazo, cerebro etc.) o bien de un sobrenadante lisado de células infectadas con M tuberculosis.

## 2.0 OBJETIVO

Determinar las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por ml que existen en una muestra biológica.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participan en el procedimiento cuentan con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.

1. Investigadora e Investigador de Patología Experimental

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

### Material

1. Para cultivo todo el material tiene que ser estéril.:
2. Pipetas de 10 ml.
3. Cajas Petri vacías estériles.
4. Tubos de 50 ml.
5. Perlas de zirconia amarillas para lisar las células.
6. Puntas amarillas, azules estériles.
7. Puntas amarillas, azules estériles cortadas.
8. Placas de 96 sin tapa estériles.
9. Marcador de punto fino indeleble.
10. Botella de vidrio de boca ancha para recuperar desechos y autoclavar.
11. Bolsas rojas especiales para autoclavar material con bacterias.
12. Bolsa de plástico para basura.
13. Pinzas estériles.
14. Gasas estériles.

### Equipo

1. Agitador.
2. Pipeteador eléctrico.
3. Micropipetas de 20, 200 y 1000  $\mu$ L.
4. Multicanal 20 a 200  $\mu$ L.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>15. Procedimiento Técnico para Determinar la Carga Bacilar de Mycobacterium tuberculosis</b>		<b>HOJA:</b> <b>3</b>  <b>DE:</b> <b>8</b>

5. Gradillas para los diferentes tubos.
6. Gradillas para hielo.
7. Cabina de flujo laminar.
8. Incubadora a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>.
9. Lupa.
10. Autoclave.
11. Homogeneizador fast prep MP 24.

#### Reactivos

1. PBS-tween 80 al 0.05 %.
2. Placas con medio 7H10 enriquecido con OADC.
3. Hielo frapo.
4. Clidox.
5. Alcohol al 70 %.

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

Cuarto de cultivo del laboratorio de patología experimental.



Sistema inyección y extracción de aire operado por manejadoras y una condensadora (Sistema HVAC, del inglés Heating – Ventilation - Air Conditioning, en español: Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado) ubicados en la azotea del edificio de patología; este sistema provee la presión negativa (-30pa) al interior del cuarto de cultivo, además de proporcionar la temperatura (21+/-3 °C) y humedad relativa (45%) necesarias para mantener condiciones de bioseguridad.

Sistema HVAC filtra el aire a través de un banco de filtros con poro de diferentes calibres, comenzando con un filtro grueso hasta llegar a un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) con un porcentaje de eficiencia de 99.9997%, es durante este proceso que el sistema HVAC lo enfría/calienta y humedece según la necesidad del cuarto de cultivo.

Sistema de esclusamiento a la entrada del cuarto de cultivo, esta mantiene una presión positiva (+30pa) formando una barrera (cortina de aire) que evita que salga el aire del interior o que el aire exterior entre al cuarto. El sistema de esclusamiento cuenta con puertas de cierre hermético cuyo acceso es biométrico sin permitir que se abran las dos puertas al mismo tiempo evitando con esto la pérdida de presión positiva/negativa dentro del cuarto de cultivo.

Antes de ingresar se verifica que los manómetros marquen -30 pascales (manómetro superior, reporta la presión dentro del cuarto) y +30 pascales (manómetro inferior que marca la presión dentro de la esclusa). El recambio de aire filtrado se hace 18 veces por hora, el aire que se incorpora al medio ambiente también es filtrado a través de un banco de filtros de tipo Bag-in Bag-out para incorporarse al ambiente de manera estéril libre de patógenos y/o partículas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>15. Procedimiento Técnico para Determinar la Carga Bacilar de Mycobacterium tuberculosis</b>		<b>HOJA:</b> <b>4</b>  <b>DE:</b> <b>8</b>

Dentro del cuarto se cuenta con dos campanas de flujo laminar, 3 incubadoras estáticas, una incubadora en agitación, una centrifuga, dos homogeneizadores de tejidos, un equipo de enfriamiento a base de nitrógeno líquido, un fotomicroscopio invertido con lámpara de fluorescencia y monitor con CPU, un microscopio estereoscópico, dos agitadores, un espectrofotómetro, un baño maría de temperatura regulable, un equipo pipetor semiautomático, dos juegos de micro pipetas de 1ml, 0.2ml y 0.020ml, una micropipeta multicanal, gavetas para guardar material.

El cuarto de cultivo se trabaja con micobacterias patógenas para la humanidad, consideradas dentro del grupo de riesgo 3 de microorganismos patógenos cuya transmisión puede ser por vía aérea. También se trabaja con cultivos celulares de diferentes líneas (macrófagos, pneumocitos, etc.), que requieren un ambiente de trabajo con un nivel de esterilidad alto.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.  
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>15. Procedimiento Técnico para Determinar la Carga Bacilar de Mycobacterium tuberculosis</b>		<b>HOJA:</b> <b>5</b> <b>DE:</b> <b>8</b>

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

## NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-053-SEMARNAT-1993, Que establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.  
D.O.F. 22-X-1993

Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993, Que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo. Generalidades.  
D.O.F. 27-II-1995

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.  
D.O.F. 17-II-2003

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.  
D.O.F. 09-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.  
D.O.F. 21-II-2017

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

La Investigadora y/o el Investigador de Patología Experimental son responsables de realizar las siguientes actividades:

1. Descongelar en hielo las muestras biológicas
2. En caso de que se trate de bazo o cerebro, pesar el órgano y anotar el peso de un tubo vacío.

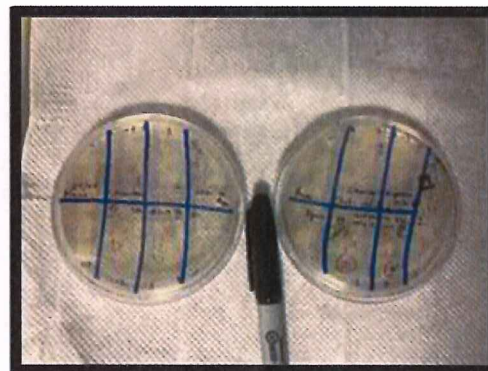
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>15. Procedimiento Técnico para Determinar la Carga Bacilar de Mycobacterium tuberculosis</b>		<b>HOJA:</b> <b>6</b>  <b>DE:</b> <b>8</b>

3. Introducir una perla de cerámica al tubo con el tejido y moler en el equipo FastPrep24 condiciones 6m/s 20 segundos (MP Biomedicals).
4. Agregar 1 mL de PBS-Tween 80 al 0.05 % y homogeneizar 3 veces más.
5. Colocar 270  $\mu$ L de PBS-Tween 80 en una placa de 96 pozos sin tapa.
6. Agitar la muestra biológica 10 segundos y sonicar por 45 segundos.





7. En una placa de 96 pozos, colocar 30  $\mu$ L del concentrado de cada muestra biológica (previamente mezclada) en un volumen de 270  $\mu$ L de PBS-Tween 0.05% haciendo las siguientes diluciones seriadas: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 y mezclando 10 veces al pasar de un pozo a otro, utilizando pipeta multicanal.
8. Sembrar 10  $\mu$ L de cada dilución por duplicado en cajas Petri con medio 7H10 (Laboratorios Difco) enriquecido con medio OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (Becton Dickinson).
9. Dejar incubando a 37 °C con 5 % de dióxido de carbono haciendo una primera lectura a los 12 días y una segunda a los 19 días.



**CONTROL DE EMISIÓN**

	<b>Elaboró:</b>	<b>Revisó:</b>	<b>Autorizó:</b>
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>15. Procedimiento Técnico para Determinar la Carga Bacilar de Mycobacterium tuberculosis</b>		<b>HOJA:</b> 7 <b>DE:</b> 8

La realización de esta técnica permite que se emitan los diagnósticos anatomopatológicos y el desarrollo de protocolos y proyectos de investigación que se realizan en el Departamento de Patología.




## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 7H10:** Medio sólido específico para el crecimiento de micobacteria enriquecido con OADC.
- 9.2 Autoclavar:** Esterilizar material y soluciones en autoclave con vapor de agua a temperatura de 121°C 15 lb de presión.
- 9.3 FastPrep24 TM:** Es un homogeneizador que alcanza velocidades de 4 m/s<sup>2</sup> para lisar muestras biológicas, con movimientos en forma horizontal, vertical y diagonal.
- 9.4 Homogeneizador Fast prep biomedical:** **MP** Homogeneizador de muestras biológicas, seguro y eficiente, hace movimientos horizontales, verticales y en diagonal junto con las perlas de cerámica rompe el tejido sin dañar a las micobacterias.
- 9.5 M tuberculosis:** Es el agente causal de la tuberculosis, es aerobia estricta y es un bacilo ácido alcohol resistente.
- 9.6 MI:** Mililitro.
- 9.7 PBS-Tween 80 0.05%:** **al** El tween 80 es un detergente hidrofílico permite la solubilización y dispersión de grasas, se prepara en solución fosfatada pH 7.4 (0.05 ml de tween 80 en 100 ml de PBS).
- 9.8 Perlas de cerámica:** Perlas de Óxido de Zirconio recubiertas de cerámica, 6.35 mm, que sirven para triturar el tejido animal y extraer las micobacterias vivas.
- 9.9 Sonicar:** Es el acto de aplicar energía de sonido (ultrasonido) para agitar las partículas de una muestra biológica.
- 9.10 UFC:** Unidades formadoras de colonias.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 <b>SALUD</b> SECRETARÍA DE SALUD 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>15. Procedimiento Técnico para Determinar la Carga Bacilar de Mycobacterium tuberculosis</b>		<b>HOJA:</b> <b>8</b>  <b>DE:</b> <b>8</b>

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Interactions between hormone-mediated and vaccine-mediated immunotherapy for pulmonary tuberculosis in BALB/c mice. hernandez Pando R, Pavon L, Orozco H, Rangel J, Rook G. Immunology, 2000, 100:391-398.

Raw starch microparticles have immunostimulant activity in mice vaccinated with BCG and challenged with Mycobacterium tuberculosis. Moreno-Mendieta, et al. Vaccine 35 (2017) 5123-5130.

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	Departamento de Patología		REV:        01
	<b>16. Procedimiento Técnico para Realizar la Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno en un Cultivo de Mycobacterium Tuberculosis en Presencia de un Compuesto Usando D2cfda (2', 7'-Diacetato de Diclorofluoresceína)</b>		HOJA:        1  DE:            9

**16. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN UN CULTIVO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN PRESENCIA DE UN COMPUESTO USANDO D2CFDA (2', 7'-DIACETATO DE DICLOROFLUORESCEÍNA)**

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>16. Procedimiento Técnico para Realizar la Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno en un Cultivo de Mycobacterium Tuberculosis en Presencia de un Compuesto Usando D2cfd (2', 7'-Diacetato de Diclorofluoresceína)</b>		<b>HOJA:</b> <b>2</b>  <b>DE:</b> <b>9</b>

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Ensayo cuantitativo donde se determina la presencia de la generación de ROS dentro de la micobacteria que correlaciona con la disminución de las UFC.

## 2.0 OBJETIVO

Determinar si el mecanismo de acción de un compuesto para eliminar a M tuberculosis es a través de la generación de especies reactivas de oxígeno.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participan en el procedimiento cuentan con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.

1. Investigadora o Investigador de Patología Experimental

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

### Material

1. Para cultivo todo el material será estéril:
2. Pipetas de 10 ml.
3. Tubos de 50 ml.
4. Microtubos de 1.5 ml.
5. Puntas amarillas, azules estériles.
6. Placas de 96 sin tapa estériles.
7. Placas de 96 oscuras.
8. Cintas adhesivas para placas de 96 pozos.
9. Marcador de punto fino indeleble.
10. Botella de vidrio de boca ancha para recuperar desechos y autoclavar.
11. Bolsas rojas especiales para autoclavar material con bacterias.
12. Bolsa de plástico para basura.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>16. Procedimiento Técnico para Realizar la Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno en un Cultivo de Mycobacterium Tuberculosis en Presencia de un Compuesto Usando D2cfdá (2', 7'-Diacetato de Diclorofluoresceína)</b>		<b>HOJA:</b> <b>3</b>  <b>DE:</b> <b>9</b>

### Equipo

1. Agitador.
2. Espectrofotómetro.
3. Lupa.
4. Pipetor eléctrico
5. Micropipetas de 20, 200 y 1000  $\mu$ L.
6. Multicanal 20 a 200  $\mu$ L.
7. Gradillas para los diferentes tubos.
8. Cabina de flujo laminar.
9. Incubadora a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> en agitación y estática.
10. Lupa.
11. Autoclave.
12. Lector de placas de fluorescencia (Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader).

### Reactivos

1. Placas con medio 7H10 enriquecido con OADC.
2. Caldo de cultivo 7h9 con OADC.
3. Clidox.
4. Alcohol al 70%.
5. D2CFDA (2', 7'-Diacetato de diclorofluoresceína).
6. PBS.
7. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM/10 mM.
8. Glutation 15 mM.
9. Compuesto a probar.

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

Cuarto de cultivo del laboratorio de patología experimental.

Sistema inyección y extracción de aire operado por manejadoras y una condensadora (Sistema HVAC, del inglés Heating – Ventilation - Air Conditioning, en español: Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado) ubicados en la azotea del edificio de patología; este sistema provee la presión negativa (-30pa) al interior del cuarto de cultivo, además de proporcionar la temperatura (21+/-3 °C) y humedad relativa (45%) necesarias para mantener condiciones de bioseguridad.

Sistema HVAC filtra el aire a través de un banco de filtros con poro de diferentes calibres, comenzando con un filtro grueso hasta llegar a un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) con un porcentaje de eficiencia de 99.9997%, es durante este proceso que el sistema HVAC lo enfría/calienta y humedece según la necesidad del cuarto de cultivo.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>16. Procedimiento Técnico para Realizar la Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno en un Cultivo de Mycobacterium Tuberculosis en Presencia de un Compuesto Usando D2cfd (2', 7'-Diacetato de Diclorofluoresceína)</b>		<b>HOJA:</b> <b>4</b>  <b>DE:</b> <b>9</b>

Sistema de esclusamiento a la entrada del cuarto de cultivo, esta mantiene una presión positiva (+30pa) formando una barrera (cortina de aire) que evita que salga el aire del interior o que el aire exterior entre al cuarto. El sistema de esclusamiento cuenta con puertas de cierre hermético cuyo acceso es biométrico sin permitir que se abran las dos puertas al mismo tiempo evitando con esto la pérdida de presión positiva/negativa dentro del cuarto de cultivo.

Antes de ingresar se verifica que los manómetros marquen -30 pascales (manómetro superior, reporta la presión dentro del cuarto) y +30 pascales (manómetro inferior que marca la presión dentro de la esclusa). El recambio de aire filtrado se hace 18 veces por hora, el aire que se incorpora al medio ambiente también es filtrado a través de un banco de filtros de tipo Bag-in Bag-out para incorporarse al ambiente de manera estéril libre de patógenos y/o partículas.

Dentro del cuarto se cuenta con dos campanas de flujo laminar, 3 incubadoras estáticas, una incubadora en agitación, una centrifuga, dos homogeneizadores de tejidos, un equipo de enfriamiento a base de nitrógeno líquido, un fotomicroscopio invertido con lámpara de fluorescencia y monitor con CPU, un microscopio estereoscópico, dos agitadores, un espectrofotómetro, un baño maría de temperatura regulable, un equipo pipetor semiautomático, dos juegos de micro pipetas de 1ml, 0.2ml y 0.020ml, una micropipeta multicanal, gavetas para guardar material.

El cuarto de cultivo se trabaja con micobacterias patógenas para la humanidad, consideradas dentro del grupo de riesgo 3 de microorganismos patógenos cuya transmisión puede ser por vía aérea. También se trabaja con cultivos celulares de diferentes líneas (macrófagos, pneumocitos, etc.), que requieren un ambiente de trabajo con un nivel de esterilidad alto.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS



Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 <b>SALUD</b> SECRETARÍA DE SALUD 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>16. Procedimiento Técnico para Realizar la Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno en un Cultivo de Mycobacterium Tuberculosis en Presencia de un Compuesto Usando D2cfd (2', 7'-Diacetato de Diclorofluoresceína)</b>		<b>HOJA:</b> <b>5</b>  <b>DE:</b> <b>9</b>

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

### NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.  
D.O.F. 09-XII-2008

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.  
D.O.F. 09-X-2015

Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.  
D.O.F. 27-I-2016

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>16. Procedimiento Técnico para Realizar la Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno en un Cultivo de Mycobacterium Tuberculosis en Presencia de un Compuesto Usando D2cfd (2', 7'-Diacetato de Diclorofluoresceína)</b>		<b>HOJA:</b> <b>6</b> <b>DE:</b> <b>9</b>

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.

D.O.F. 21-II-2017

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

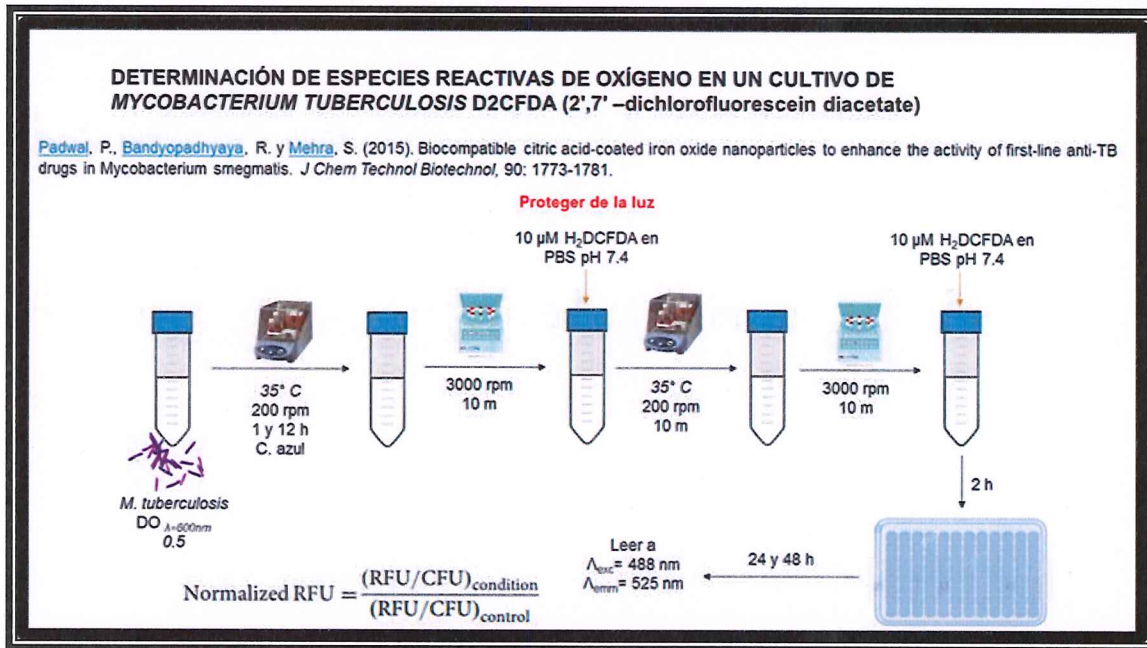
La Investigadora y/o el Investigador de Patología Experimental son responsables de realizar las siguientes actividades:

1. Iniciar cultivo de M tuberculosis H37Rv Stanford y/o MDR con 6 ml de 7H9 más un ml de bacteria en solución salina recuperada en fase logarítmica.
2. Ajustar en el espectrofotómetro a una  $DO_{600nm} = 0.5$ .
3. Colocar 1 mL de suspensión por microtubo, centrifugar 10 min a 3000 rpm T.A. y lavar una vez con PBS.
4. Incubar la bacteria con 500  $\mu$ L de medio 7H9, Peróxido de hidrógeno (10 o 100 mM), compuesto a probar (2, 4, 8 o 16  $\mu$ g/mL) y glutatión (15 mM) en agitación a 35 °C durante 1 y 12 horas.
5. Retirar el sobrenadante, lavar dos veces con PBS e incubar en agitación a 35 °C protegido de la luz con 1.5 mL de una solución de D2CFDA (10  $\mu$ M) en PBS durante 10 minutos.
6. Retirar el sobrenadante, colocar 1 mL de D2CFDA (10  $\mu$ M) e incubar en agitación y protegido de la luz a 35 °C durante 2 horas.
7. Transferir 200  $\mu$ L por pozo a una placa oscura de 96 pozos por cuadruplicado y leer en lector de placas de fluorescencia (Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader) a las 12 y 48 horas a  $\lambda_{ex} = 488$  nm y  $\lambda_{em} = 525$  nm a 37 °C.
8. Determinar la cantidad de micobacterias de cada muestra biológica haciendo diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) y sembrando por duplicado 10  $\mu$ L de la muestra biológica en placas petri con medio 7H10.
9. Leer las placas a los 12 y 19 días.

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>	<b>REV:</b> 01
	<b>16. Procedimiento Técnico para Realizar la Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno en un Cultivo de Mycobacterium Tuberculosis en Presencia de un Compuesto Usando D2cfda (2', 7'-Diacetato de Diclorofluoresceína)</b>	<b>HOJA:</b> 7 <b>DE:</b> 9



La realización de esta técnica permite que se emitan los diagnósticos anatomopatológicos y el desarrollo de protocolos y proyectos de investigación que se realizan en el Departamento de Patología.

## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 7H10:** Medio sólido específico para el crecimiento de micobacteria enriquecido con OADC.
- 9.2 7H9:** Medio líquido específico para el crecimiento de micobacterias enriquecido con OADC.
- 9.3 Espectrofotómetro:** Es un instrumento que tiene la capacidad de emitir un haz de luz monocromático a la muestra biológica y medir la cantidad de luz que absorbe. Es una manera directa de conocer la cantidad de sustancia o bacterias que tenemos en una muestra biológica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>16. Procedimiento Técnico para Realizar la Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno en un Cultivo de Mycobacterium Tuberculosis en Presencia de un Compuesto Usando D2cfda (2', 7'-Diacetato de Diclorofluoresceína)</b>		<b>HOJA:</b> 8 <b>DE:</b> 9

- 9.4 Fase logarítmica:** En esta fase de crecimiento las bacterias se multiplican exponencialmente, son metabólicamente activas, se producen tantas bacterias como se habían producido anteriormente de manera acumulada.
- 9.5 Glutación:** Es un antioxidante capaz de atrapar las ROS, es un control negativo, se espera que disminuya la cantidad detectada en la micobacteria y mayor UFC.
- 9.6 MDR:** Multidrogorresistente.
- 9.7 mM:** Milimolar.
- 9.8 Mtb:** Mycobacterium tuberculosis agente causante de la tuberculosis.
- 9.9 M tuberculosis H37Rv Stanford:** Cepa virulenta de Mycobacterium tuberculosis donada por la Universidad de Stanford, California, USA.
- 9.10 PBS:** Solución fosfatada pH 7.4.
- 9.11 placas Petri:** Son recipientes de plástico con tapa, se utiliza para cultivo de bacterias, para pesar sólidos, para colocar líquidos.
- 9.12 ROS:** Grupo de moléculas que contienen oxígeno y tienen diferente reactividad química.
- 9.13 Sobrenadante:** Es el líquido que se obtiene después de la centrifugación.
- 9.14 T.A:** Temperatura ambiente.
- 9.15 UFC:** Unidades formadoras de colonias.
- 9.16 µg/mL:** Microgramos por mililitro.
- 9.17 µL:** Microlitro.
- 9.18 H2O2:** Peróxido de hidrógeno.
- 9.19 D2CFDA:** (2', 7'-Diacetato de diclorofluoresceína).

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>16. Procedimiento Técnico para Realizar la Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno en un Cultivo de Mycobacterium Tuberculosis en Presencia de un Compuesto Usando D2cfda (2', 7'-Diacetato de Diclorofluoresceína)</b>		<b>HOJA:</b> 9 <b>DE:</b> 9

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Howell Wescott, Heather A. et al (2017). Imidazoles Induce Reactive Oxygen Species in Mycobacterium tuberculosis Which Is Not Associated with Cell Death. American Chemical Society Omega 2, 41–5

Tyagi, P., Dharmaraja, A. T., Bhaskar, A., Chakrapani, H., & Singh, A. (2015). Mycobacterium tuberculosis has diminished capacity to counteract redox stress induced by elevated levels of endogenous superoxide. Free radical biology & medicine, 84, 344–354. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.008>

Burian, J., Yim, G., Hsing, M., Axerio-Cilies, P., Cherkasov, A., Spiegelman, G. B., & Thompson, C. J. (2013). The mycobacterial antibiotic resistance determinant WhiB7 acts as a transcriptional activator by binding the primary sigma factor SigA (RpoV). Nucleic acids research, 41(22), 10062–10076. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt751>

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	Departamento de Patología		REV: 01
	17. Procedimiento Técnico para Realizar Tincion de Ziehl –Neelsen		HOJA: 1 DE: 7

## 17. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR TINCION DE ZIEHL –NEELSEN

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>17. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción de Ziehl –Neelsen</b>		<b>HOJA:</b> 2 <b>DE:</b> 7

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Tinción utilizada para identificar micobacterias se basa en la resistencia que tienen estas bacterias de ser decoloradas con el alcohol ácido, debido al alto contenido de ácidos micólicos en su pared celular retienen el color de la carbolfucsina.

## 2.0 OBJETIVO

Identificar cultivos puros de micobacterias.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participa en el procedimiento cuenta con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.

1. Investigadora e Investigador de Patología Experimental.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

### Material

1. Portaobjetos.
2. Cubreobjetos.
3. Asas microbiológicas.
4. Puntas amarillas.
5. Resina.
6. Aceite de inmersión.

### Equipo

1. Cabina de flujo laminar.
2. Microscopio.
3. Micropipeta de 200  $\mu$ L.

### Reactivos

1. Solución fijadora de micobacterias.
2. Fenol al 5% en metanol.
3. cristales de fenol fundido 2,5 g.
4. metanol cbp 50ml.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>17. Procedimiento Técnico para Realizar Tincion de Ziehl –Neelsen</b>		<b>HOJA:</b> 3 <b>DE:</b> 7

Solución de tinción de Carbol fucsina

1. cristales de fenol fundido 2,5 g.
2. alcohol absoluto 5,0 ml.
3. Fucsina básica 0.5 g.
4. agua destilada hasta cbp 50 ml.
5. Guardar a T.A. y filtrar antes de usar.

Alcohol – ácido.

1. ácido clorhídrico concentrado 1 ml.
2. 70% de alcohol 99 ml.

Azul de metileno al 1% en PBS.

1. 0.5 g de azul de metileno cbp 50 ml de PBS.

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

Cuarto de cultivo del laboratorio de patología experimental.

Sistema inyección y extracción de aire operado por manejadoras y una condensadora (Sistema HVAC, del inglés Heating – Ventilation - Air Conditioning, en español: Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado) ubicados en la azotea del edificio de patología; este sistema provee la presión negativa (-30pa) al interior del cuarto de cultivo, además de proporcionar la temperatura (21+/-3 °C) y humedad relativa (45%) necesarias para mantener condiciones de bioseguridad.

Sistema HVAC filtra el aire a través de un banco de filtros con poro de diferentes calibres, comenzando con un filtro grueso hasta llegar a un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) con un porcentaje de eficiencia de 99.9997%, es durante este proceso que el sistema HVAC lo enfría/calienta y humedece según la necesidad del cuarto de cultivo.

Sistema de esclusamiento a la entrada del cuarto de cultivo, esta mantiene una presión positiva (+30pa) formando una barrera (cortina de aire) que evita que salga el aire del interior o que el aire exterior entre al cuarto. El sistema de esclusamiento cuenta con puertas de cierre hermético cuyo acceso es biométrico sin permitir que se abran las dos puertas al mismo tiempo evitando con esto la pérdida de presión positiva/negativa dentro del cuarto de cultivo.

Antes de ingresar se verifica que los manómetros marquen -30 pascales (manómetro superior, reporta la presión dentro del cuarto) y +30 pascales (manómetro inferior que marca la presión dentro de la esclusa). El recambio de aire filtrado se hace 18 veces por hora, el aire que se incorpora al medio ambiente también es filtrado a través de un banco de filtros de tipo Bag-in Bag-out para incorporarse al ambiente de manera estéril libre de patógenos y/o partículas.

Dentro del cuarto se cuenta con dos campanas de flujo laminar, 3 incubadoras estáticas, una incubadora en agitación, una centrifuga, dos homogeneizadores de tejidos, un equipo de enfriamiento a base de nitrógeno líquido, un fotomicroscopio invertido con lámpara de fluorescencia y monitor con CPU, un microscopio estereoscópico, dos agitadores, un espectrofotómetro, un baño maría de temperatura regulable, un equipo pipetor semiautomático, dos juegos de micro pipetas de 1ml, 0.2ml y 0.020ml, una micropipeta multicanal, gavetas para guardar material.

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>17. Procedimiento Técnico para Realizar Tincion de Ziehl –Neelsen</b>		<b>HOJA:</b> <b>4</b> <b>DE:</b> <b>7</b>

El cuarto de cultivo se trabaja con micobacterias patógenas para la humanidad, consideradas dentro del grupo de riesgo 3 de microorganismos patógenos cuya transmisión puede ser por vía aérea. También se trabaja con cultivos celulares de diferentes líneas (macrófagos, pneumocitos, etc.), que requieren un ambiente de trabajo con un nivel de esterilidad alto.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas


### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>17. Procedimiento Técnico para Realizar Tinción de Ziehl –Neelsen</b>		<b>HOJA:</b> <b>5</b>  <b>DE:</b> <b>7</b>

### NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.

D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.

D.O.F 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.

D.O.F 09-XII-2008

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.

D.O.F. 09-X-2015

Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.

D.O.F. 27-I-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.


D.O.F. 21-II-2017

### 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

La Investigadora y/o el Investigador de Patología Experimental son responsables de realizar las siguientes actividades:

1. Tomar el cultivo con un asa microbiológica y depositarlo en el portaobjetos, dejar secar.
2. Fijar el frotis con 50 µL de fenol al 5 % en metanol, dejar secar.
3. Exponer el frotis durante al menos 15 minutos a luz ultravioleta en la cabina de flujo laminar.
4. Pasar el frotis 3 veces por la flama azul de la lámpara de alcohol.
5. Colocar la solución de carbol fucsina (la cantidad necesaria para cubrir el frotis).
6. Dejar el colorante a T.A. durante 10 min.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>17. Procedimiento Técnico para Realizar Tincion de Ziehl –Neelsen</b>		<b>HOJA:</b> <b>6</b> <b>DE:</b> <b>7</b>

7. Decolorar con alcohol ácido, hasta que no gotee el color fucsia.
8. Contrateñir usando azul de metileno, colocar hasta cubrir por el frotis por 2 min.
9. Lavar con agua de la llave, secar y colocar un cubreobjetos con resina.
10. Revisar en el microscopio usando objetivo de 10x, 40x, y pasar a 100x con aceite de inmersión donde se observan los bacilos de color fucsia.



La realización de esta técnica permite que se emitan los diagnósticos anatomopatológicos y el desarrollo de protocolos y proyectos de investigación que se realizan en el Departamento de Patología.

### 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>17. Procedimiento Técnico para Realizar Tincion de Ziehl –Neelsen</b>		<b>HOJA:</b> 7 <b>DE:</b> 7

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 ácidos micólicos:** Son ácidos grasos presentes en la pared celular de las micobacterias.
- 9.2 azul de metileno:** Es un colorante que se utiliza para teñir las células, se observan mejor los núcleos.
- 9.3 Bacilos:** Son bacterias que tienen forma de bastón o barra.
- 9.4 cabina de flujo laminar:** Son equipos diseñados para trabajar con microorganismos que causan enfermedad a través de aerosoles. Con este tipo de cabina se protege la muestra biológica y se protege al usuario debido a que se forma una cortina de aire constante y limpio libre de partículas.
- 9.5 c.b.p:** Siglas que significan cuanto baste para.
- 9.6 Micobacteria:** Son microorganismos, la más común causa la tuberculosis, otro causa la lepra y otras causan infecciones por micobacterias atípicas.
- 9.7 T.A.:** Siglas de temperatura ambiente.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Comparison of strip and Ziehl-Neelsen methods for staining acid fast bacteria. Varughese P, Heldecque DM, Mc Rae KB, Eidus L. Bull World Health Organ.1974;51(1)83-91.

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>18. Procedimiento Técnico para Realizar el Mantenimiento de Cepas Micobacterianas</b>		<b>HOJA:</b> 1  <b>DE:</b> 14

## 18. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR EL MANTENIMIENTO DE CEPAS MICOBACTERIANAS

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>18. Procedimiento Técnico para Realizar el Mantenimiento de Cepas Micobacterianas</b>		<b>HOJA:</b> <b>2</b> <b>DE:</b> <b>14</b>

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Realizar la preparación de soluciones de cultivo líquido y sólido específicas para micobacterias que inhiben el crecimiento de otras bacterias, determinando la curva de crecimiento única constituida por fase de adaptación, fase logarítmica y fase estacionaria de cada micobacteria con diferentes virulencias, familias y orígenes, libres de nutrientes y metabólicamente activas a fin de infectar en ensayos in vivo, in vitro o de microscopía electrónica.

## 2.0 OBJETIVO

Expandir la bacteria mediante cultivo líquido, generando diluciones líquidas, mientras el cultivo sólido favorece el crecimiento sobre el agar de las unidades formadoras de colonias y determinar cuantitativamente la carga bacteriana de la solución en cuestión, calculando la fase logarítmica media de cada una de las micobacterias en condiciones óptimas de viabilidad y obtener tubos con micobacteria con concentraciones definidas para su uso in vivo o in vitro.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participa en el procedimiento cuenta con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.

1. Investigadora e Investigador de Patología Experimental.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

### Material

1. Celdas de plástico.
2. Pipetas de 2 ml y 10 ml.
3. Botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>.
4. Asas microbiológicas.
5. Pipetas de 25 ml.
6. Parafilm.
7. Jeringa de 5 ml.
8. Cajas de Petri.
9. Marcador indeleble de punto fino.
10. Cinta testigo.
11. Frascos de vidrio.
12. Criotubos de 1.5 y 5 ml.
13. Gradillas para diferentes tubos.
14. Caja para guardar criotubos en ultracongelador.
15. Bitácora cepario y de alícuotas de bacterias en uso.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licon	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>18. Procedimiento Técnico para Realizar el Mantenimiento de Cepas Micobacterianas</b>		<b>HOJA:</b> 3 <b>DE:</b> 14

### Equipo

1. Cabina de flujo laminar.
2. Espectrofotómetro.
3. Incubadora 35°C con agitación orbital.
4. Incubadora 37 °C, 5% de bióxido de carbono.
5. Pipetor.
6. Autoclaves.
7. Incubadora 37 °C, 5% de bióxido de carbono.
8. Micropipeta de 1 ml.
9. Balanza analítica.
10. Barras magnéticas.
11. Platos de plástico para la pesada.
12. Parrilla de calentamiento y agitación.
13. Ultracongeladores.

### Reactivos

1. Caldo de cultivo 7H9 complementado con OADC y glicerol.
2. Agua estéril.
3. OADC.
4. Glicerol.
5. Tyloxapol.
6. Caldo de cultivo 7H9 (DIFCO).
7. Medio sólido 7H10 (DIFCO).
8. Medio 7H10 completo.
9. Agua destilada.
10. Glicerol estéril.

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

Cuarto de cultivo del laboratorio de patología experimental.

Sistema inyección y extracción de aire operado por manejadoras y una condensadora (Sistema HVAC, del inglés Heating – Ventilation - Air Conditioning, en español: Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado) ubicados en la azotea del edificio de patología; este sistema provee la presión negativa (-30pa) al interior del cuarto de cultivo, además de proporcionar la temperatura (21+/-3 °C) y humedad relativa (45%) necesarias para mantener condiciones de bioseguridad.

Sistema HVAC filtra el aire a través de un banco de filtros con poro de diferentes calibres, comenzando con un filtro grueso hasta llegar a un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) con un porcentaje de eficiencia de 99.9997%, es durante este proceso que el sistema HVAC lo enfría/calienta y humedece según la necesidad del cuarto de cultivo.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>18. Procedimiento Técnico para Realizar el Mantenimiento de Cepas Micobacterianas</b>		<b>HOJA:</b> 4 <b>DE:</b> 14

Sistema de esclusamiento a la entrada del cuarto de cultivo, esta mantiene una presión positiva (+30pa) formando una barrera (cortina de aire) que evita que salga el aire del interior o que el aire exterior entre al cuarto. El sistema de esclusamiento cuenta con puertas de cierre hermético cuyo acceso es biométrico sin permitir que se abran las dos puertas al mismo tiempo evitando con esto la pérdida de presión positiva/negativa dentro del cuarto de cultivo.

Antes de ingresar se verifica que los manómetros marquen -30 pascales (manómetro superior, reporta la presión dentro del cuarto) y +30 pascales (manómetro inferior que marca la presión dentro de la esclusa). El recambio de aire filtrado se hace 18 veces por hora, el aire que se incorpora al medio ambiente también es filtrado a través de un banco de filtros de tipo Bag-in Bag-out para incorporarse al ambiente de manera estéril libre de patógenos y/o partículas.

Dentro del cuarto se cuenta con dos campanas de flujo laminar, 3 incubadoras estáticas, una incubadora en agitación, una centrifuga, dos homogeneizadores de tejidos, un equipo de enfriamiento a base de nitrógeno líquido, un fotomicroscopio invertido con lámpara de fluorescencia y monitor con CPU, un microscopio estereoscópico, dos agitadores, un espectrofotómetro, un baño maría de temperatura regulable, un equipo pipetor semiautomático, dos juegos de micro pipetas de 1ml, 0.2ml y 0.020ml, una micropipeta multicanal, gavetas para guardar material.

El cuarto de cultivo se trabaja con micobacterias patógenas para la humanidad, consideradas dentro del grupo de riesgo 3 de microorganismos patógenos cuya transmisión puede ser por vía aérea. También se trabaja con cultivos celulares de diferentes líneas (macrófagos, pneumocitos, etc.), que requieren un ambiente de trabajo con un nivel de esterilidad alto.

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES



Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>18. Procedimiento Técnico para Realizar el Mantenimiento de Cepas Micobacterianas</b>		<b>HOJA:</b> <b>5</b> <b>DE:</b> <b>14</b>

**REGLAMENTOS**

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.

D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.

D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

**NORMAS OFICIALES**

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.

D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.

D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.

D.O.F. 09-XII-2008

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.

D.O.F. 09-X-2015

Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.

D.O.F. 27-I-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.

D.O.F. 21-II-2017

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>18. Procedimiento Técnico para Realizar el Mantenimiento de Cepas Micobacterianas</b>		<b>HOJA:</b> <b>6</b>  <b>DE:</b> <b>14</b>

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

Preparación de medios de cultivo líquidos (7H9) y sólidos (7H10) para micobacterias:

La Investigadora y/o el Investigador de Patología Experimental son responsables de realizar las siguientes actividades:

- Colocar 900ml de agua destilada en un frasco de vidrio sobre una barra magnética, agregar 5 ml de glicerol (con pipeta o jeringa es muy viscoso) y agitar.
- Agregar 0.5ml de tyloxapol con micropipeta, cortar la punta azul y agitar.
- Agregar 4.7 g de medio 7H9, agitar hasta disolver y esterilizar por 10 min a 15lb a 121°C.
- En la cabina de flujo laminar limpia y estéril, adicionar 100 ml de medio de enriquecimiento OADC (5 tubos de 20ml), dejar en prueba de esterilidad por lo menos 24 hrs a 37° C 5% de CO<sub>2</sub>.

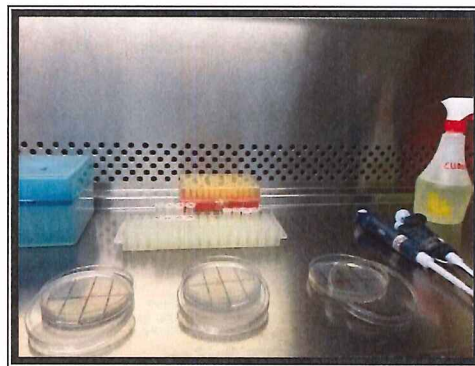


Preparación de medio sólido 7H10 con glicerol al 0.05%:

- Colocar sobre la parrilla agitador magnético 900 ml de agua destilada en un frasco de vidrio, agregar 5 ml de glicerol (se recomienda utilizar una pipeta o jeringa).
- Agregar 19 gr de medio 7H10, esperar a que hierva (hasta que cambie a una solución verde transparente) esterilizar por 10 min a 15lb a 121°C.
- En la campana de flujo laminar, limpia y estéril, cuando el medio pueda tocarse sin quemarse, adicionar 100 ml de medio de enriquecimiento OADC, (5 tubos de 20ml)
- Utilizar pipetas de 35ml para colocar 17 ml de medio en cajas de petri estériles y marcadas para hacer diluciones seriadas, dejar secar abiertas por una hora, finalmente someter a prueba de esterilidad por lo menos 24 hrs a 37° C.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>18. Procedimiento Técnico para Realizar el Mantenimiento de Cepas Micobacterianas</b>		<b>HOJA:</b> <b>7</b>  <b>DE:</b> <b>14</b>

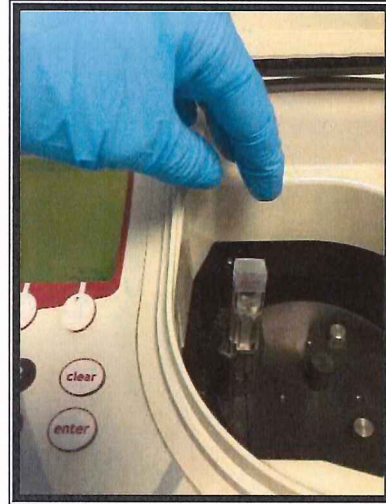
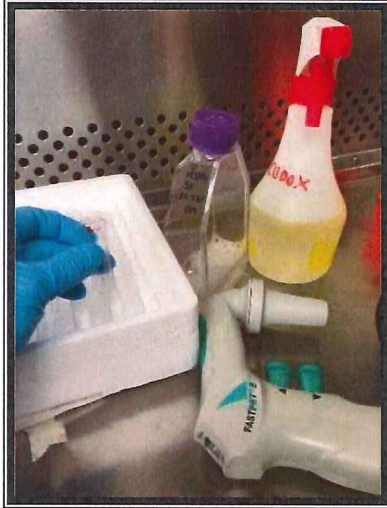


Calcular la fase logarítmica media de cada una de las micobacterias (curvas de crecimiento de micobacterias):

1. Agregar a una botella de 75cm<sup>2</sup> 60 mL de 7H9 y colocar una colonia de la micobacteria con asa microbiológica proveniente de un cultivo puro crecido en medio 7H10.
2. A los 7 días o cuando se observe ligeramente turbio, determinar la densidad óptica del cultivo a 600 nm utilizando celdas de plástico desechables, colocar 0.9 ml del cultivo agitado suavemente en una celda y taponarlo con parafilm.
3. Utilizar como blanco medio de cultivo líquido 7H9.
4. Registrar las densidades ópticas por lo menos por 30 días de preferencia seguidos, o bien hasta que alcance la fase estacionaria, 4 lecturas casi iguales.
5. Capturar los datos en una hoja de cálculo y obtener el promedio de las últimas 4 lecturas donde el cultivo ya está en fase estacionaria, ese punto se llama K, para obtener la fase logarítmica media del cultivo se divide entre 2, es decir la fase log media =k/2, es decir la densidad óptica a la que hay que obtener el cultivo para determinar que las bacterias están en su fase metabólicamente activa.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>18. Procedimiento Técnico para Realizar el Mantenimiento de Cepas Micobacterianas</b>		<b>HOJA:</b> 8  <b>DE:</b> 14



**CONGELACIÓN DE CEPAS MICOBACTERIANAS A -70C:**

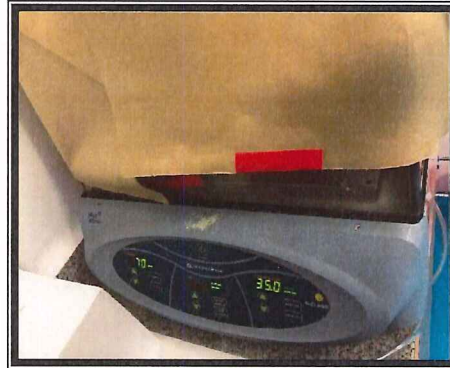
1. Conocer la curva de crecimiento de la micobacteria y el día que tenga la densidad óptica correspondiente a la fase log media entonces recuperar, brevemente:
2. Agregar a una botella de 75 cm<sup>2</sup> 60 mL de 7H9 y colocar una colonia de la micobacteria con asa microbiológica proveniente de un cultivo puro crecido en medio 7H10.



3. Crecer durante 14 días en incubadora de agitación orbital a 35°C

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>18. Procedimiento Técnico para Realizar el Mantenimiento de Cepas Micobacterianas</b>		<b>HOJA:</b> 9 <b>DE:</b> 14





4. Determinar la densidad óptica, introducir blanco, después celda cubierta con parafilm con 0.9 ml de cultivo micobacteriano y obtener la lectura en el espectrofotómetro.



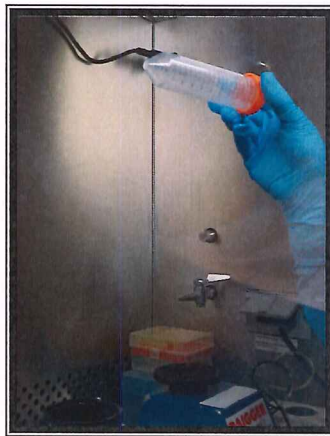
5. En la cabina de flujo laminar, colocar el cultivo líquido en tubos de 50 ml y centrifugar a 3000 rpm por 10 min a T.A.
6. Retirar el sobrenadante y agitar el pellet suavemente.
7. Agregar 8 ml de medio 7H9 y 2 ml de glicerol, mezclar con la pipeta y dividir en dos criotubos etiquetados con nombre de la cepa, fecha, densidad óptica, nombre de quien
8. Guardar a  $-7^{\circ}\text{C}$ , de preferencia en dos ultracongeladores distintos, por si alguno fallara.
9. Anotar en bitácora "cepario" y de forma electrónica datos del tubo, posición, caja y ultracongelador utilizado.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>18. Procedimiento Técnico para Realizar el Mantenimiento de Cepas Micobacterianas</b>		<b>HOJA:</b> <b>10</b> <b>DE:</b> <b>14</b>

**OBTENER LOTE DE MICOBACTERIAS Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN (UFC/ML):**

1. Para realizar este procedimiento se tiene que conocer la curva de crecimiento de la micobacteria y haber calculado la fase log media, previamente.
2. Tomar con un asa microbiológica (aprox. 10 microlitros) del cultivo de bacterias glicerol, y dispersar en una placa 7H10 para aislar las colonias, esperar entre 14 y 21 días en una incubadora al 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C.
3. Agregar a una botella de 75 cm<sup>2</sup> 60 ml de 7H9 y colocar una colonia de la micobacteria con asa microbiológica proveniente de un cultivo puro crecido en medio 7H10.
4. Con la curva de crecimiento calcular día y densidad óptima para recuperar las bacterias, Determinar la densidad óptica: introducir una celda con 0.9ml de medio 7H9 (blanco), después introducir la celda cubierta con parafilm con 0.9 ml de cultivo micobacteriano y obtener la lectura en el espectrofotómetro.
5. En la cabina de flujo laminar, colocar el cultivo líquido en tubos de 50 ml y centrifugar a 3000 rpm por 10 min a T.A.



6. Quitar sobrenadante y desechar en frasco de vidrio de desechos
7. Agitar el pellet suavemente y agregar 45 ml de solución salina estéril.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>18. Procedimiento Técnico para Realizar el Mantenimiento de Cepas Micobacterianas</b>		<b>HOJA:</b> <b>11</b> <b>DE:</b> <b>14</b>



8. Repetir 2 veces paso 4 y 5
9. Agregar 30 ml solución salina estéril, agitar y repartir un ml del cultivo en los criotubos previamente etiquetados, además incluir un tubo inicial, otro medio y un tubo final que nos sirva para monitorear el lote (agitar frecuentemente).
10. Congelar a -70 °C y anotar en la bitácora correspondiente y llevar el registro en una hoja de cálculo.
11. Al siguiente día, determinar la concentración del lote brevemente:
12. Colocar en microtubos estériles 900 microlitros de 7H9 y 100 microlitros del cultivo descongelado a 37 °C por 10min, agitar, sonicar 45 segundos y hacer diluciones seriadas hasta -5, sembrar 10 microlitros en medio 7h10, contar las bacterias a los 14 y 21 días.



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>18. Procedimiento Técnico para Realizar el Mantenimiento de Cepas Micobacterianas</b>		<b>HOJA:</b> 12 <b>DE:</b> 14

13. Hacer cálculos para determinar la concentración de la micobacteria por ml, se obtiene promediando los tubos inicial, medio y final.

La realización de esta técnica permite que se emitan los diagnósticos anatomopatológicos y el desarrollo de protocolos y proyectos de investigación que se realizan en el Departamento de Patología.




## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 7H9:** Medio líquido específico para el crecimiento de micobacterias enriquecido con OADC.
- 9.2 7H10:** Medio sólido específico para el crecimiento de micobacteria enriquecido con OADC.
- 9.3 Agitación orbital:** Agitación en forma de círculo.
- 9.4 Asa microbiológica:** Instrumento de metal o de plástico que consiste en una base tipo pinza que termina en aro, sirve para tomar muestras biológicas de bacterias.
- 9.5 Asas microbiológicas:** Es un instrumento de plástico tipo pinza que termina en forma de aro.
- 9.6 Cepario:** Es una colección de microorganismos cuyo objetivo es la preservación de un cultivo bacteriano puro y estable. Se conservan por congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ , utilizando glicerol como agente crioprotector, destinado solo para actividades de investigación.
- 9.7 Criotubos:** Tubos de polipropileno para almacenar muestras biológicas a temperaturas muy bajas  $-196^{\circ}\text{C}$  (nitrógeno líquido).
- 9.8 Densidades ópticas:** Se registra en el espectrofotómetro como absorbancia y es el cambio entre la intensidad de la luz que incide en el cultivo y la transmitida por éste, es detectada por la computadora del equipo.
- 9.9 Diluciones seriadas:** Es la reducción progresiva de la concentración de una sustancia en solución, lo que da como resultado una progresión logarítmica es decir reducción de la muestra biológica 10 veces, 100 veces, 1000 veces, 10,000 veces, etc.
- 9.10 Espectrofotómetro:** Instrumento que tiene la capacidad de emitir un haz de luz monocromático a la muestra biológica y medir la cantidad de luz que absorbe. Es una manera directa de conocer la cantidad de sustancia o bacterias que tenemos en una muestra biológica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>18. Procedimiento Técnico para Realizar el Mantenimiento de Cepas Micobacterianas</b>		<b>HOJA:</b> <b>13</b>  <b>DE:</b> <b>14</b>

- 9.11 Fase estacionaria:** En esta fase disminuye el crecimiento de las bacterias debido al agotamiento de nutrientes y acumulación de productos bacterianos.
- 9.12 Fase log media:** En esta fase de crecimiento las bacterias se multiplican exponencialmente, son metabólicamente activas, se producen tantas bacterias como se habían producido anteriormente de manera acumulada.
- 9.13 Fase logarítmica:** En esta fase de crecimiento las bacterias se multiplican exponencialmente, son metabólicamente activas, se producen tantas bacterias como se habían producido anteriormente de manera acumulada.
- 9.14 Glicerol:** Compuesto líquido, viscoso incoloro, inodoro, fácilmente soluble en agua, es un precursor para la síntesis de triglicéridos fosfolípidos, lo utilizan las micobacterias como fuente de carbono.
- 9.15 Incubadora:** Equipo que mantiene la temperatura, porcentajes de CO2 en grado adecuado para el crecimiento de bacterias y líneas celulares
- 9.16 introducir blanco:** introducir una celda con 0.9ml de medio 7H9 sin bacteria (blanco).
- 9.17 in vivo:** Es un experimento realizado en un organismo vivo por ejemplo en ratones de laboratorio.
- 9.18 in vitro:** Es un ensayo que se realiza fuera de un organismo vivo, por ejemplo, en líneas celulares.
- 9.19 Micobacteria:** Son microorganismos, la más común causa la tuberculosis, otro causa la lepra y otras causan infecciones por micobacterias atípicas.
- 9.20 Microscopía electrónica:** Técnica que utiliza un haz de electrones acelerados para iluminar y producir imágenes, se pueden observar estructuras celulares pequeñas como mitocondrias, bacterias y virus.
- 9.21 OADC:** Ácido oleico, dextrosa y catalasa.
- 9.22 Parafilm:** Es un papel de materiales tipo parafina semi transparente, flexible y resistente al agua, sirve para sellar tubos, botellas, etc.
- 9.23 Pellet:** Se refiere a una porción de material comprimido puede ser de RNA, DNA, bacterias o virus.
- 9.24 Pipetas:** Es un instrumento de vidrio o de plástico que sirve para medir volúmenes, tiene una graduación y son transparentes.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</b>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>18. Procedimiento Técnico para Realizar el Mantenimiento de Cepas Micobacterianas</b>		<b>HOJA:</b> <b>14</b>  <b>DE:</b> <b>14</b>

**9.25 Tyloxapol:** Detergente no iónico, que no funciona como fuente de carbono para la micobacteria.

**9.26 Virulencia:** Grado de la capacidad de un microorganismo para causar una enfermedad en su hospedero.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Culturing Mycobacteria. Wallace E, Hendrickson D, Tolli N, Mehaffy C, Peña M, Nick JA, Knabenbaur P, Watkins J, Simpson A, Amin AG, Chatterjee D, Dobos KM, Lahiri R, Adams L, Strong M, Salfinger M, Bradford R, Stedman TT, Riojas MA, Hazbón MH. Methods Mol Biol. 2021;2314:1-58. doi: 10.1007/978-1-0716-1460-0\_1. PMID: 3423564.

Culturing Mycobacteria .Wallace E, Hendrickson D, Tolli N, Mehaffy C, Peña M, Nick JA, Knabenbaur P, Watkins J, Simpson A, Amin AG, Chatterjee D, Dobos KM, Lahiri R, Adams L, Strong M, Salfinger M, Bradford R, Stedman TT, Riojas MA, Hazbón MH. Methods Mol Biol. 2021;2314:1-58. doi: 10.1007/978-1-0716-1460-0\_1. PMID: 34235647.

El modelo logístico: una alternativa para el estudio del crecimiento poblacional de organismos. Ulloa Ibarra JT, Rodríguez Carrillo J. REDVET. Rev.electron.vet11.3.2010.

Cryopreservation of Mycobacterium tuberculosis complex cells. Shu Z, Weigel KM, Soelberg SD, Lakey A, Cangelosi GA, Lee KH, Chung JH, Gao D. J Clin Microbiol. 2012 Nov;50(11):3575-80. doi: 10.1128/JCM.00896-12. Epub 2012 Aug 29. PMID: 22933596.


Preservation of mycobacteria: 100 percent viability of suspensions stored at -70 C. Kim TH, Kubica GP. Appl Microbiol. 1973 Jun;25(6):956-60. doi: 10.1128/am.25.6.956-960.1973. PMID: 4197770 Free PMC article.

El modelo logístico: una alternativa para el estudio del crecimiento poblacional de organismos. Ulloa Ibarra JT, Rodríguez Carrillo J. REDVET. Rev.electron.vet11.3.2010.

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA: 1</b> <b>DE: 15</b>

## 19. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR ADMINISTRACIÓN DE UN AGENTE BIOLÓGICO EN RATÓN

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA:</b> <b>2</b>  <b>DE:</b> <b>15</b>

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Consiste en la administración de algún agente biológico, fármaco, péptido, etc., por vía parenteral, intraperitoneal subcutánea, intratraqueal e intramuscular (las vías parenterales utilizan procedimientos invasivos para introducir un fármaco, agente biológico, péptido, etc., en el organismo) e intragástrica.

## 2.0 OBJETIVO

Administrar en la zona de la piel, tráquea, intragástrica del ratón, una cantidad conocida de algún agente biológico, fármaco, péptido, etc., con la finalidad de evaluar el desempeño biológico en el mismo.

## 3.0 SERVIDORA Y/O SERVIDOR PÚBLICO DE LA SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participa en el procedimiento cuentan con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite realizar las actividades correspondientes.

1. Investigadora o Investigador de Patología Experimental

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

### MATERIAL

1. Cánula (22g x 1", punta roma de 1.25mm recta) para alimentación de animales.
2. Liga de caucho del número 18
3. Jeringa para insulina de 1ml 27Gx13mm.
4. Agente biológico, fármaco, péptido, etc.
5. Tabla de unicel de 12x20x2-3cm
6. 1 pliego de Aluminio
7. Cámara de acrílico de 20x20x10cm
8. Sanitas de papel
9. Contenedor de punzocortantes
10. EPP
11. Tubo falcón de 50cc
12. Gasas plisadas estériles
13. Contenedor de punzocortantes
14. Rejilla de metal
15. Tubo falcón de 50cc con una abertura de 1.5x1.5cm en un costado a 2cm del borde de la tapa del tubo.

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA:</b> <b>3</b>  <b>DE:</b> <b>15</b>

## REACTIVOS

1. Sevoflurano
2. Alcohol de 96°

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

- I. Temporizador para controlar el ciclo circadiano (Tork, modelo 1101p)
- II. Autoclave de dos compuertas (Steris, modelo AMSCO LAB 250)
- III. Gabinete de Seguridad Biológica Clase III (The Backer Company, modelo SG403)
- IV. Gabinete de Seguridad Biológica Clase III (Labconco)
- V. Sistema de microaisladores con ventilacion individual y presion (-) (Allentown Caging Equipment, modelo MD75JU14OMVP)
- VI. Sistema de microaisladores con ventilacion individual y presion (-/+) (Lab Products, modelo Super Mouse 1800™ AllerZone™ Micro-Isolator®)
- VII. Unidad de difusion y filtracion de aire (HEPA) (Biobubble, modelo AFH-DHS)
- VIII. Unidad manejadora de aire (McQuay International)

Este cuarto cuenta con un Sistema HVAC equipado unidad manejadora de aire con ventilador con ducteria para inyección y un sistema de 2 etapas de filtración 65% y 95% de eficiencia, con este equipo se mantiene la esterilidad del aire dentro del ABSL3 por sus filtros HEPA, la manejadora inyecta los volúmenes necesarios para tener los cambios de aire por hora adecuados. Se cuenta con una condensadora HEAT PUMP lo que nos ayuda a mantener las condiciones de temperatura, presión diferencial y humedad relativa para cumplir con las medidas de bioseguridad nacionales e internacionales.

Unidad de extracción de aire y banco de filtración *bag-in/bag-out* con 2 etapas de filtración de 65% y 99.97% de eficiencia, favorece la eliminación de partículas contaminantes a través de filtros HEPA acordes a las medidas de bioseguridad nacionales e internacionales, permitiendo que los operadores tengan una manipulación más segura y eficaz de animales infectados con cepas de *Mycobacterium tuberculosis* tanto patógenas como cepas vacunales y adenovirus, cruciales para el desarrollo de nuestras líneas de investigación.

Se cuenta con un sensor indicador de temperatura y humedad (termohigrómetro) relativa. Este sensor controla la unidad condensadora para mantener las condiciones de temperatura y humedad adecuadas para mantener la presión negativa de manera constante.

El acceso a la instalación es controlado por tarjeta electrónica, se ingresa a través de un sistema de esclusamiento que evita que el aire de adentro del ABSL3 salga al exterior y que el aire del exterior entre al ABSL3 y lo contamine.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA:</b> 4  <b>DE:</b> 15

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.  
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

### NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-053-SEMARNAT-1993, Que establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.  
D.O.F. 22-X-1993

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA:</b> <b>5</b>  <b>DE:</b> <b>15</b>

Norma Oficial Mexicana NOM-064-SSA1-1993, Que establece las especificaciones sanitarias de los equipos de reactivos utilizados para el diagnóstico.

D.O.F. 24-II-1995

Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993, Que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo. Generalidades.

D.O.F. 27-II-1995

Norma Oficial Mexicana NOM-054-SEMARNAT-1993, Que establece el procedimiento para determinar la incompatibilidad entre dos o más residuos considerados como peligrosos.

D.O.F. 22-X-1993

Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de cáncer del cuello uterino.

D.O.F. 16-I-1995

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.

D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.

D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-004-STPS-1999, De protección y dispositivos de seguridad en la maquinaria y equipo que se utilice en los centros de trabajo.

D.O.F. 31-V-1999

Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.

D.O.F. 02-II-1999

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

D.O.F. 22-VIII-2001

Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

D.O.F. 17-II-2003

Norma Oficial Mexicana NOM-076-SSA1-2002, Salud ambiental - que establece los requisitos sanitarios del proceso del etanol (alcohol etílico).

D.O.F. 09-II-2004

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA:</b> <b>6</b>  <b>DE:</b> <b>15</b>

Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

D.O.F. 23-VI-2006

Norma Oficial Mexicana NOM-001-STPS-2008, Edificios, locales, instalaciones y áreas en los centros de trabajo Condiciones de seguridad.

D.O.F. 24-XI-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.

D.O.F 09-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-025-STPS-2008, Condiciones de iluminación en los centros de trabajo.

D.O.F. 30-XI-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-003-SCT/2008, Características de las etiquetas de envases y embalajes, destinadas al transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.

D.O.F. 15-VIII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-116-STPS-2009, Seguridad-equipo de protección servidora o servidor público - respiradores purificadores de aire de presión negativa contra partículas nocivas-especificaciones y métodos de prueba.

D.O.F. 22-XII-2009 y sus reformas

Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-2010, Para la prevención y el control de la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

D.O.F. 10-XI-2010

Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

D.O.F. 27-III-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.

D.O.F. 19-II-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.

D.O.F. 15-X-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos.

D.O.F. 04-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis.

D.O.F. 13-XI-2013

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA:</b> <b>7</b>  <b>DE:</b> <b>15</b>

Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA3-2012, Que establece las características mínimas en relación a infraestructura y equipamientos de laboratorios de Anatomía Patológica, hospitales y consultorios de atención médica especializada.

D.O.F. 08-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-2014, Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral-Reconocimiento, evaluación y control.

D.O.F. 28-IV-2014

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.

D.O.F. 09-X-2015

Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.

D.O.F. 27-I-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-133-SEMARNAT-2015, Protección ambiental-Bifenilos Policlorados (BPCs)-Especificaciones de manejo.

D.O.F. 23-II-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-138-SSA1-2016, Que establece las especificaciones sanitarias del alcohol etílico desnaturalizado, utilizado como material de curación, así como para el alcohol etílico de 96 grados G.L. sin desnaturalizar, utilizado como materia prima para la elaboración y o envasado de alcohol etílico desnaturalizado como material de curación.

D.O.F. 25-IV-2017

Norma Oficial Mexicana NOM-039-SSA2-2014, Para la prevención y control de las infecciones de transmisión sexual.

D.O.F. 01-VI-2017


Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.

D.O.F. 21-II-2017

Norma Oficial Mexicana NOM-003-NUCL-2021, Clasificación de instalaciones que utilizan fuentes abiertas.

D.O.F. 12-X-202

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA:</b> 8  <b>DE:</b> 15



## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

La Investigadora y/o el Investigador de Patología Experimental son responsables de realizar las siguientes actividades:

### ADMINISTRACIÓN INTRATRAQUEAL EN RATÓN:

- Colocar 3 sanitas de papel dentro de la cámara de acrílico a modo de que funcionen como lecho para los ratones permitiendo la absorción de la orina y facilitar la limpieza de las heces que liberan los ratones a causa del estrés (estas sanitas también absorberán el anestésico y favorecerá su liberación gradual mientras se evapora).
- Forrar la tabla de unicel con el pliego de aluminio a modo de que funcione como una plancha de procedimientos.
- Colocar la liga de caucho en uno de los extremos de la tabla.
- Preparar una jeringa de insulina con la cánula y llenar con el agente biológico, fármaco, péptido, etc., que se administra.
- La segunda jeringa de insulina se utilizará para manejar el sevoflurano, por lo tanto se le retira la aguja y se coloca en el contenedor de punzocortantes.
- Una vez que se retira la aguja, la jeringa se llena con 500 microlitros de sevoflurano.
- Sostener al ratón (una vez preparado el material) por el extremo de la cola o por el lomo del animal (jamás sujetarlo por las orejas) y colocarlo dentro de la cámara de anestesia.
- Depositar 100 microlitros de sevoflurano (por ratón) y esperar a que haga efecto, el ratón-pasará por las tres etapas de la anestesia (inducción, mantenimiento y reanimación).
- Colocar al ratón, una vez dormido, en posición decúbito supino (decúbito dorsal o boca arriba) sobre la placa de unicel revestida con aluminio.
- Sujetar los incisivos con la liga de caucho, se introducirá la cánula de calibre 22g x 1", punta roma de 1.25mm recta, apoyándose con el tacto del dedo índice de la mano izquierda (o derecha según sea el caso) para localizar la tráquea.
- Introducir la cánula de calibre 22g x 1", punta roma de 1.25mm recta, hasta la bifurcación de la tráquea inyectando los microlitros que contienen el agente biológico, fármaco, péptido, etc.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA:</b> 9 <b>DE:</b> 15



#### ADMINISTRACIÓN PARENTERAL SUBCUTÁNEA EN LA BASE DE LA COLA EN RATÓN:

1. Cargar la jeringa de insulina con el agente biológico, fármaco, péptido, etc., que se administrará, se coloca en un costado de la zona de trabajo y en una distancia a la mano con la aguja apuntando siempre al frente.
2. Sostener al ratón (una vez preparado el material) por el extremo de la cola (jamás sujetarlo por las orejas) y colocarlo dentro del tubo falcón de 50cc dejando la base de la cola fuera del tubo.
3. Sujetar el tubo con la mano izquierda (o derecha según sea el caso), con la mano derecha se moja una gasa con alcohol y esta se frota sobre el pelaje que rodea la base de la cola del ratón (región sacra del ratón) para hacer la asepsia a la zona.
4. Sujetar con la mano derecha la jeringa y con el bisel de la aguja hacia arriba, se inserta por debajo de la piel a un costado (0.5 cm a la derecha o la izquierda) de la columna vertebral del ratón (se evitará que la aguja se inserte en el músculo porque el efecto biológico es diferente).
5. Una vez que la aguja penetró por debajo de la piel, es necesario levantarla para verificar que se encuentra en la hipodermis (tejido subcutáneo) y no se alcanzó el músculo (de ser así corregir).
6. Depositar el volumen de la jeringa establecido en el proyecto (se recomienda evitar inyectar más de 50 microlitros en este tipo de administración).
7. Girar un cuarto de vuelta la jeringa para que el bisel genere un microdesgarro y evitar que el líquido salga por capilaridad.
8. Retirar la jeringa y colocarla a un costado con la punta de la aguja apuntando hacia el frente.
9. Sacar al ratón del tubo falcón tirando suavemente de la cola y depositarlo en la caja de alojamiento para ratones.
10. Depositar la aguja en el contenedor de punzocortantes y el cuerpo de la jeringa en la basura RPBI al finalizar.

#### ADMINISTRACIÓN PARENTERAL SUBCUTÁNEA EN EL LOMO DEL RATÓN:

1. Cargar la jeringa de insulina con el agente biológico, fármaco, péptido, etc., que se administrará, se coloca a un costado de la zona de trabajo y en una distancia a la mano con la aguja apuntando siempre al frente.
2. Sostener al ratón (una vez preparado el material) por el extremo de la cola (jamás sujetarlo por las orejas) y colocarlo sobre la rejilla de metal para que, por acto reflejo, trate de sujetarse a las barras de la rejilla
3. Tirar del ratón un poco para que no se suelte, con la otra mano se moja una gasa con alcohol y esta se frota sobre el pelaje del lomo del ratón a la altura de los omoplatos para hacer la asepsia a la zona,

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022



	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA:</b> 10 <b>DE:</b> 15

4. Una vez realizada la asepsia se suelta la cola del ratón y se gira 180° la rejilla para tener al ratón de frente
5. Sujetar con la mano izquierda la piel del lomo a la altura de los omoplatos, se formará un triángulo en la piel, insertando la aguja en el centro de ese triángulo.
6. Inocular el volumen de la jeringa establecido en el proyecto (se recomienda evitar inyectar más de 50 microlitros en este tipo de administración).
7. Girar un cuarto de vuelta la jeringa para que el bisel genere un microdesgarro y evite que el líquido salga por capilaridad.
8. Retirar la jeringa y colocarla a un costado con la punta de la aguja apuntando hacia el frente.
9. Devolver al ratón a la caja tirando suavemente de la cola para que suelte la rejilla.
10. Depositar la aguja en el contenedor de punzocortantes y el cuerpo de la jeringa en la basura RPBI cuando ya no se utilice.

#### ADMINISTRACIÓN PARENTERAL SUBCUTÁNEA EN LA INGLE DEL RATÓN:

1. Cargar la jeringa de insulina con el agente biológico, fármaco, péptido, etc., que se administrará, se coloca en un costado de la zona de trabajo y en una distancia a la mano con la aguja apuntando siempre al frente.
2. Sostener al ratón (una vez preparado el material) por el extremo de la cola (jamás sujetarlo por las orejas) y colocarlo sobre la rejilla de metal para que, por acto reflejo, trate de sujetarse a las barras de la rejilla.
3. Tirar del ratón un poco para que no se suelte, con la otra mano se sujeta por el cuello tratando que el área de sujeción sea detrás de las orejas utilizando los dedos índice y pulgar.
4. Recostar al ratón sobre la palma de la mano en posición de cúbito dorsal y con los dedos meñique y anular se ejerce presión sobre la base de la cola del ratón para inmovilizarlo.
5. La inoculación se realiza en la zona de la ingle (izquierda o derecha) previamente se moja una gasa con alcohol y ésta se frota sobre el pelaje de la zona inguinal para hacer la asepsia.
6. Introducir la aguja aproximadamente 1/3 con el bisel hacia arriba en el pliegue de la ingle, una vez dentro es importante levantar la aguja y cerciorarse de verla a través de la piel del ratón en la hipodermis (tejido subcutáneo) (evitar alcanzar el músculo, de ser así corregir).
7. Una vez que la aguja penetró la piel, inocular el volumen de la jeringa establecido en el proyecto (se recomienda evitar inyectar más de 50 microlitros en este tipo de administración).
8. Al retirar la aguja girar un cuarto de vuelta la jeringa para que el bisel genere un microdesgarro y evite que el líquido salga por capilaridad.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA:</b> 11 <b>DE:</b> 15

9. Retirar la jeringa y colocarla a un costado con la punta de la aguja apuntando hacia el frente.
10. Devolver al ratón a la caja tirando suavemente de la cola para que suelte la rejilla.
11. Depositar la aguja en el contenedor de punzocortantes y el cuerpo de la jeringa en la basura RPBI al terminar el procedimiento.

#### ADMINISTRACIÓN PARENTERAL INTRAPERITONEAL EN LA CAVIDAD ABDOMINAL DEL RATÓN:

1. Cargar la jeringa de insulina con el agente biológico, fármaco, péptido, etc., que se administrará, se coloca en un costado de la zona de trabajo y en una distancia a la mano con la aguja apuntando siempre al frente.
2. Sostener al ratón (una vez preparado el material) por el extremo de la cola (jamás sujetarlo por las orejas) y colocarlo sobre la rejilla de metal para que, por acto reflejo, trate de sujetarse a las barras de la rejilla.
3. Tirar del ratón un poco para que no se suelte, con la otra mano se sujeta por el cuello tratando que el área de sujeción sea detrás de las orejas utilizando los dedos índice y pulgar.
4. Recostar al ratón sobre la palma de la mano en posición de cubito dorsal y con los dedos meñique y anular se ejerce presión sobre la base de la cola del ratón para inmovilizarlo (durante el proceso de inoculación, la cabeza del ratón tiene que estar más inclinada hacia abajo que el resto del cuerpo (en plano horizontal) a fin de evitar una inoculación accidental en órganos viscerales).
5. Dividir el abdomen en 4 cuadrantes de manera imaginaria. La inoculación se realizará en los cuadrantes inferiores (izquierdo o derecho),
6. Previo a la inoculación, mojar una gasa con alcohol (previo a la inoculación) y frotar sobre el pelaje de la zona abdominal para hacer la asepsia,
7. Introducir la aguja aproximadamente 2/3 con el bisel hacia arriba, es importante revisar que la aguja esté dentro de la cavidad abdominal antes de inocular, de lo contrario el efecto biológico será diferente.
8. Al introducir la aguja es importante mantenerla paralela a la columna vertebral del animal, para evitar la inoculación incorrecta.
9. Inocular el volumen de la jeringa establecido en el protocolo (se recomienda evitar inyectar más de 2 ml en este tipo de administración),
10. Al retirar la aguja girar un cuarto de vuelta la jeringa para que el bisel genere un microdesgarro y evite que el líquido salga por capilaridad.
11. Retirar la jeringa y coloque a un costado con la punta de la aguja apuntando hacia el frente.
12. Devolver al ratón a la caja tomándolo suavemente de la cola.
13. Depositar la aguja en el contenedor de punzocortantes y el cuerpo de la jeringa en la basura RPBI cuando ya no se utilice.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA:</b> <b>12</b> <b>DE:</b> <b>15</b>

**ADMINISTRACIÓN INTRAGÁSTRICA EN EL RATÓN:**

1. Preparar la jeringa para insulina con la cánula y cargar con el agente biológico, fármaco, péptido, etc., que se administrará.
2. Colocar la jeringa preparada a un costado de la zona de trabajo y en una distancia a la mano con la cánula apuntando hacia nosotros.
3. Sujetar al ratón por el extremo de la cola (jamás sujetarlo por las orejas) y colocarlo sobre la rejilla de metal para que, por acto reflejo, trate de sujetarse a las barras de la rejilla y se tira de él un poco para que no se suelte.
4. Sujetar con la otra mano al ratón por el cuello tratando que el área de sujeción sea detrás de las orejas utilizando los dedos índice y pulgar (esto facilitará que la cavidad oral, garganta y esófago se encuentren perfectamente alineados y verticales).
5. Recostar al ratón sobre la palma de la mano en posición de cubito dorsal y con los dedos meñique y anular se ejerce presión sobre la base de la cola para inmovilizarlo, una vez sujetado se pone en posición vertical.
6. Tomar la jeringa que tiene la cánula e introducir en la cavidad oral guiándose por el paladar, conforme se desliza la cánula por la garganta es importante mantener la verticalidad tanto de la cánula como el ratón para evitar lesionar el esófago del mismo.
7. Inyectar el volumen establecido en el proyecto (se recomienda evitar inyectar más de 200 microlitros en este tipo de administración) una vez que se introduce la cánula en su totalidad.
8. Retirar la cánula suavemente y colocarla a un costado con la punta de la aguja apuntando hacia nosotros.
9. Devolver al ratón a la caja tomándolo suavemente de la cola.
10. Depositar la cánula en solución desinfectante y el cuerpo de la jeringa en la basura RPBI cuando ya no se utilice.

**ADMINISTRACIÓN PARENTERAL EN EL MUSLO DEL RATÓN:**

1. Preparar la jeringa de insulina con el agente biológico, fármaco, péptido, etc., que se administrará, se coloca en un costado de la zona de trabajo y en una distancia a la mano con la aguja apuntando siempre al frente.
2. Sostener al ratón (una vez preparado el material) por el extremo de la cola (jamás sujetarlo por las orejas) y colocarlo dentro del tubo falcon de 50cc.
3. Sacar una de las patas traseras del ratón por la abertura de 1.5x1.5cm.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA:</b> 13 <b>DE:</b> 15

4. Sujetar el tubo con la mano izquierda (o derecha según sea el caso), con la mano derecha se moja una gasa con alcohol y esta se frota sobre el pelaje del muslo del ratón para hacer la asepsia a la zona.
5. Sujetar la jeringa y con el bisel de la aguja hacia arriba, se inserta por debajo de la piel hasta alcanzar el músculo de la cara externa del muslo.
6. Depositar el volumen de la jeringa establecido en el proyecto (se recomienda evitar inyectar más de 10 microlitros en este tipo de administración).
7. Retirar la jeringa y colocarla a un costado con la punta de la aguja apuntando hacia el frente.
8. Sacar al ratón del tubo falcon tirando suavemente de la cola y depositarlo en la caja de alojamiento para ratones.
9. Depositar la aguja en el contenedor de punzocortantes y el cuerpo de la jeringa en la basura RPBI cuando ya no se utilice.

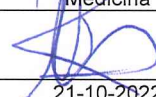
La realización de esta técnica permite el desarrollo de protocolos y proyectos de investigación que se realizan en el Departamento de Patología, además de contribuir en nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento para las personas beneficiarias.

## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 Agente biológico:** Es un organismo (bacteria, virus, parásito, un hongo, etc.), también puede ser una toxina con la capacidad de afectar de manera adversa la salud de un organismo en diversos modos.
- 9.2 Asepsia:** Métodos o procedimientos que impiden o evitan el acceso de gérmenes patógenos o infecciosos.
- 9.3 Bisel:** Un bisel es un borde que está cortado oblicuamente, no en ángulo recto. La cara inclinada del borde de un instrumento afilado.
- 9.4 Cánula de calibre:** 22g x 1", punta roma de 1.25mm recta.
- 9.5 Cúbito dorsal:** Posición corporal acostado boca arriba, generalmente en un plano paralelo al suelo. Cuello en posición neutra, con mirada dirigida al céntit

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA:</b> 14 <b>DE:</b> 15

- 9.6 Fármaco:** Sustancia que sirve para curar o prevenir una enfermedad, para reducir sus efectos sobre el organismo o para aliviar un dolor físico.
- 9.7 EPP:** Equipo de Protección Servidora o servidor público.
- 9.8 Hipodermis:** Tejido celular subcutáneo.
- 9.9 Inoculación:** Proceso por el cual se introduce una muestra biológica de un producto por investigar en el organismo del animal.
- 9.10 Microdesgarro:** Es una herida provocada por cizalla (objeto que corta), fricción o contusión que da lugar a la separación de capas de la piel y que puede ser de espesor parcial (separación de la epidermis de la dermis) o de espesor completo (separación de la epidermis y dermis de las estructuras subyacentes).
- 9.11 Parenteral:** Por otra vía distinta a la alimentaria (inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa).
- 9.12 Péptido:** Los péptidos son moléculas formadas por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos. Al igual que las proteínas, están presentes en la naturaleza y son responsables de un gran número de funciones, muchas de las cuales todavía no se conocen.
- 9.13 RPBI:** Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Gómez, M. et al; (2001) "Manual para el uso y manejo de animales de laboratorio rata y ratón"; Facultad de Química.

POODLE, T., 1986, The UFAW HANDBOOK on the Care & Management of Laboratory Animals, 6a Edition, Ed. Longman Scientific & Technical.

D.C. Blood, et al, (1994); "Diccionario de veterinaria"; Editorial Mc Graw-Hill Interamericana



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>19. Procedimiento Técnico para Realizar Administración de un Agente Biológico En Ratón</b>		<b>HOJA:</b> 15 <b>DE:</b> 15

### 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tajimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>20. Procedimiento Técnico para Realizar Eutanasia y Toma de Tejidos en Ratón</b>		<b>HOJA:</b> <b>1</b>  <b>DE:</b> <b>10</b>

## 20. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR EUTANASIA Y TOMA DE TEJIDOS EN RATÓN

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

 	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</b>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>20. Procedimiento Técnico para Realizar Eutanasia y Toma de Tejidos en Ratón</b>		<b>HOJA:</b> <b>2</b>  <b>DE:</b> <b>10</b>

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Procedimiento empleado para inducir la muerte de los ratones tratando de eliminar o disminuir el dolor y el estrés ocasionado antes y durante el procedimiento; causando: rápida inconsciencia, paro cardiaco y/o respiratorio y pérdida de la función cerebral. además de tomar las muestras biológicas de tejido necesarias, descritas en el proyecto y/o protocolo.

## 2.0 OBJETIVO

Describir los procedimientos empleados para inducir de manera humanitaria la muerte de los ratones y la toma de muestras biológicas de tejidos en los mismos, empleados en pruebas de laboratorio e investigación.

## 3.0 SERVIDORA O SERVIDOR PÚBLICO DE SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participa en el procedimiento cuentan con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite realizar las siguientes actividades.

1. Investigadora o Investigador de Patología Experimental.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1. Jeringa para insulina de 1ml 27Gx13mm, dos.
2. Tabla de unicel de 12x20x2-3cm.
3. 2 pliegos de Aluminio.
4. Tabla de unicel de 12x20x2-3cm.
5. Tijeras iris rectas de 12 cm, 2 piezas.
6. Pinzas de hemostasia curvas de 12 cm.
7. Pinzas de disección rectas de 12 cm, 2 piezas.
8. Jeringa de 10ml 21G x 32 mm.
9. Crioviales de 2 ml estériles.
10. Tubos eppendorf de 1.5 ml.
11. Tubos falcon de 50 cc con 20 ml de Etanol absoluto.
12. 3 tubos falcon de 50 cc estériles.
13. Placa de cera rosa.
14. Navaja de afeitar.
15. 5 agujas 21G x 32 mm.
16. Bolsa Roja para RPBI resistente a un ciclo de esterilización.
17. Bolsa Amarilla para RPBI.
18. Contenedor de punzocortantes.

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>20. Procedimiento Técnico para Realizar Eutanasia y Toma de Tejidos en Ratón</b>		<b>HOJA:</b> <b>3</b>  <b>DE:</b> <b>10</b>

## REACTIVOS

1. Pentobarbital sódico.
2. Nitrógeno líquido.
3. Clidox.
4. Alcohol de 96°.
5. Agua Inyectable.
6. Alcohol Absoluto.

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS

- I. Temporizador para controlar el ciclo circadiano (Tork, modelo 1101p)
- II. Autoclave de dos compuertas (Steris, modelo AMSCO LAB 250)
- III. Gabinete de Seguridad Biológica Clase III (The Backer Company, modelo SG403)
- IV. Gabinete de Seguridad Biológica Clase III (Labconco)
- V. Sistema de microaisladores con ventilacion individual y presion (-) (Allentown Caging Equipment, modelo MD75JU14OMVP)
- VI. Sistema de microaisladores con ventilacion individual y presion (-/+) (Lab Products, modelo Super Mouse 1800™ AllerZone™ Micro-Isolator®)
- VII. Unidad de difusion y filtracion de aire (HEPA) (Biobubble, modelo AFH-DHS)
- VIII. Unidad manejadora de aire (McQuay International)


Este cuarto cuenta con un Sistema HVAC equipado unidad manejadora de aire con ventilador con ducteria para inyección y un sistema de 2 etapas de filtración 65% y 95% de eficiencia, con este equipo se mantiene la esterilidad del aire dentro del ABSL3 por sus filtros HEPA, la manejadora inyecta los volúmenes necesarios para tener los cambios de aire por hora adecuados. Se cuenta con una condensadora HEAT PUMP lo que nos ayuda a mantener las condiciones de temperatura, presión diferencial y humedad relativa para cumplir con las medidas de bioseguridad nacionales e internacionales.

Unidad de extracción de aire y banco de filtración *bag-in/bag-out* con 2 etapas de filtración de 65% y 99.97% de eficiencia, favorece la eliminación de partículas contaminantes a través de filtros HEPA acordes a las medidas de bioseguridad nacionales e internacionales, permitiendo que los operadores tengan una manipulación más segura y eficaz de animales infectados con cepas de *Mycobacterium tuberculosis* tanto patógenas como cepas vacunales y adenovirus, cruciales para el desarrollo de nuestras líneas de investigación.

Se cuenta con un sensor indicador de temperatura y humedad (termohigrómetro) relativa. Este sensor controla la unidad condensadora para mantener las condiciones de temperatura y humedad adecuadas para mantener la presión negativa de manera constante.

El acceso a la instalación es controlado por tarjeta electrónica, se ingresa a través de un sistema de esclusamiento que evita que el aire de adentro del ABSL3 salga al exterior y que el aire del exterior entre al ABSL3 y lo contamine.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>20. Procedimiento Técnico para Realizar Eutanasia y Toma de Tejidos en Ratón</b>		<b>HOJA:</b> <b>4</b>  <b>DE:</b> <b>10</b>

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.  
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014



Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

### NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.  
D.O.F 22-VIII-2001

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>20. Procedimiento Técnico para Realizar Eutanasia y Toma de Tejidos en Ratón</b>		<b>HOJA:</b> 5 <b>DE:</b> 10

Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

D.O.F. 17-II-2003

Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

D.O.F. 23-VI-2006

Norma Oficial Mexicana NOM-001-STPS-2008, Edificios, locales, instalaciones y áreas en los centros de trabajo Condiciones de seguridad.

D.O.F. 24-XI-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.

D.O.F. 09-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-025-STPS-2008, Condiciones de iluminación en los centros de trabajo.

D.O.F. 30-XI-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-003-SCT/2008, Características de las etiquetas de envases y embalajes, destinadas al transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.

D.O.F. 15-VIII-2008

NOM-010-SSA2-2010, Para la prevención y el control de la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

D.O.F. 10-XI-2010

Norma Oficial Mexicana NOM-116-STPS-2009, Seguridad-equipos de protección servidora o servidor público - respiradores purificadores de aire de presión negativa contra partículas nocivas-especificaciones y métodos de prueba.

D.O.F. 22-XII-2009 y sus reformas

Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

D.O.F. 27-III-2012

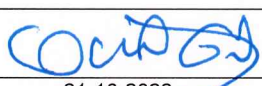
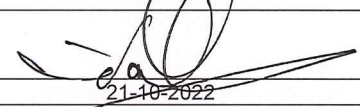

Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-2014, Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral-Reconocimiento, evaluación y control.



D.O.F. 28-IV-2014

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.

D.O.F. 09-X-2015

**CONTROL DE EMISIÓN**

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>20. Procedimiento Técnico para Realizar Eutanasia y Toma de Tejidos en Ratón</b>		<b>HOJA:</b> 6 <b>DE:</b> 10

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

La y/o el Investigador de Patología Experimental son responsables de realizar las siguientes actividades:

Se carga la jeringa para insulina con el pentobarbital sódico y se prepara para administrar 210 mg/Kg por vía intraperitoneal. \*Para administrar la anestesia (pentobarbital sódico) seguir los pasos descritos en “**ADMINISTRACIÓN PARENTERAL INTRAPERITONEAL EN LA CAVIDAD ABDOMINAL DEL RATÓN**”, en lugar de cargar la jeringa con un agente biológico, fármaco, péptido, etc., cargarla con el anestésico.

### EUTANASIA POR EXANGUINACIÓN.

- Una vez que el ratón está completamente bajo los efectos de la anestesia y no presenta reflejo al pellizcar las patas o la cola con las pinzas de disección es momento de.,
- Sujetar al ratón por la cola y colocarlo en posición de cubito dorsal a la tabla de unigel envuelta con aluminio.
- Fijar el ratón a la tabla con las 5 agujas, una por extremidad y usar una para fijar la cabeza a través de la mejilla.
- Colocar la tabla en posición horizontal con la cabeza del ratón hacia la izquierda (o derecha según sea el caso).
- Mojar la zona axilar con alcohol de 96° y con las tijeras rectas se hace una incisión en la piel y se disecciona el área axilar para poder identificar el músculo pectoral.
- Realizar un corte por debajo del músculo justo debajo de la axila y paralelo a la parrilla costal buscando seccionar la arteria subclavia.
- Sujetar el tubo eppendorf de 1.5 ml y se recoge la sangre que brota del corte, el ratón entra en shock hipovolémico y de esta manera se induce la eutanasia por exanguinación, una vez colectada toda la sangre (limpiar la sangre del borde del tubo con una gasa y cerrarlo)
- Realizar una dislocación cervical (tomar la cabeza del ratón por la base del cuello y la cola, tirar en direcciones opuestas para provocar la dislocación), terminando así el proceso de eutanasia del ratón.

### TOMA DE MUESTRA BIOLÓGICAS DE TEJIDOS

#### Bazo:

- Realizar una incisión longitudinal en la piel del vientre que va desde la pelvis del ratón hasta la garganta, con las tijeras rectas y las pinzas de disección.
- Diseccionar el área de las ingles y el tórax.

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>20. Procedimiento Técnico para Realizar Eutanasia y Toma de Tejidos en Ratón</b>		<b>HOJA:</b> <b>7</b>  <b>DE:</b> <b>10</b>

3. Cortar la capa muscular de la cavidad abdominal con un corte longitudinal pélvico-torácico y un par de cortes de la pelvis a la ingle y de la apófisis xifoides hacia las costillas y la espina dorsal.
4. Buscar el bazo en el cuadrante superior izquierdo detrás del estómago, con pinzas desinfectadas y estériles se toma y se coloca dentro de un criovial.
5. Depositar el criovial en el nitrógeno líquido para su posterior almacenaje a -70°C y procesamiento.

**Riñón:**

1. Hacer a un lado el bloque intestinal (apoyándose de las pinzas rectas y las tijeras) y detrás de éste se encuentran los riñones.
2. Tomar un riñón utilizando unas tijeras y pinzas rectas estériles.
3. Colocar en un criovial.
4. Depositar el criovial en el nitrógeno líquido para su posterior almacenaje a -70°C y procesamiento.
5. Tomar el otro riñón y depositar en el tubo falcón de 50cc con 20 ml de etanol absoluto para comenzar la fijación.

**Hígado:**



1. Tomar un fragmento de hígado (utilizando unas tijeras y pinzas rectas estériles) y depositar dentro de un criovial.
2. Depositar el criovial en el nitrógeno líquido para su posterior almacenaje a -70°C y procesamiento.
3. Colocar otro fragmento de hígado sobre un pequeño fragmento de aluminio (este servirá para que la pieza no se deforme mientras se fija en el alcohol absoluto).
4. Realizar unas pequeñas incisiones (con la navaja de afeitar) a lo largo del fragmento de hígado (de 1 mm de profundidad y cada 1-1.5 mm entre ellas) esto para permitir la penetración del fijador.
5. Depositar en un tubo falcón de 50cc con 20 ml de etanol absoluto para comenzar la fijación.

**Pulmón:**

1. Cortar el diafragma, con ayuda de unas tijeras y pinzas de disección rectas para acceder a la cavidad torácica.
2. Mover con unas tijeras estériles los pulmones de un costado al otro para permitir el corte de la parrilla costal desde el are abdominal en línea recta hacia la zona debajo de la axila, se hace esto en ambos lados de la parrilla costal.

**CONTROL DE EMISIÓN**

	<b>Elaboró:</b>	<b>Revisó:</b>	<b>Autorizó:</b>
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>20. Procedimiento Técnico para Realizar Eutanasia y Toma de Tejidos en Ratón</b>		<b>HOJA:</b> 8 <b>DE:</b> 10

3. Sujetar por el esternón con unas pinzas rectas y se tira de ella hacia la zona de la garganta de manera segura y firme, este movimiento retirara la parrilla costal y descubrirá la tráquea.
4. Pinzar, con la pinza de hemostasia estéril, el bronquio derecho del ratón.
5. Cortar y guardar en un criovial.
6. Después se deposita el criovial en el nitrógeno líquido para su posterior almacenaje a -70°C y procesamiento (ver manual Técnico de procedimientos en el BSL3 de Pato Exp).
7. Preparar una jeringa de 10 ml con etanol absoluto y canalizar la tráquea que ya está expuesta.
8. Inyectar de manera suave pero firme entre 500 y 700 µL de etanol absoluto para perfundir el pulmón.
9. Liberar la pinza de hemostasia; con las tijeras y pinzas rectas se retira el pulmón y se deposita en un tubo falcón de 50cc con 20 ml de etanol absoluto para comenzar la fijación.

#### Cerebro

1. Cortar, con ayuda de unas pinzas y tijeras rectas, la cabeza del ratón al que se le dio eutanasia.
2. Retirar la piel del cráneo con las tijeras y sujetar la cabeza con una gasa tomándola por el hocico.
3. Retirar poco a poco, con las pinzas rectas, la capa de hueso que forma el cráneo, evitando maltratar el encéfalo.
4. Sujetar el encéfalo con las pinzas y depositar sobre la placa de cera rosa.
5. Dividir el encéfalo en dos hemisferios con la navaja de afeitar.
6. Guardar en un criovial.
7. Depositar el criovial en el nitrógeno líquido para su posterior almacenaje a -70°C y procesamiento.
8. Colocar el otro hemisferio sobre un pequeño fragmento de aluminio (este servirá para evitar que la pieza se deforme mientras se fija en el alcohol absoluto).
9. Depositar en un tubo falcon de 50cc con 20 ml de etanol absoluto para la fijación.

La realización de esta técnica permite el desarrollo de protocolos y proyectos de investigación de acuerdo con la normatividad aplicable, además de contribuir en la implementación de nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento de las personas beneficiarias.

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>20. Procedimiento Técnico para Realizar Eutanasia y Toma de Tejidos en Ratón</b>		<b>HOJA:</b> 9 <b>DE:</b> 10

## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

No Aplica.

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 Apófisis xifoides:** Es el elemento más pequeño y variable del esternón, que se encuentra en su extremo inferior. La apófisis xifoides constituye una referencia fundamental del plano medio porque: Su unión con el cuerpo indica el límite inferior de la cavidad torácica por delante. Presenta un punto de localización de la cara diafragmática del hígado, diafragma y borde inferior del corazón y línea media.
- 9.2 Cavidad:** Espacio hueco en el interior de un cuerpo o en una superficie, especialmente en el organismo de los seres vivos.
- 9.3 Criovial:** Tubo fabricado en polipropileno autoclavable. Diseñado para almacenar material biológico a temperaturas hasta  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (nitrógeno líquido). El tubo y el tapón mantienen el mismo coeficiente de dilatación, lo que garantiza su hermeticidad ante cambios de temperatura.
- 9.4 Cubito dorsal:** Posición corporal acostado boca arriba, generalmente en un plano paralelo al suelo. Cuello en posición neutra, con mirada dirigida al cénit.
- 9.5 Esternón:** Hueso largo y plano que forma la parte delantera y central de la pared torácica. El esternón está unido a la clavícula y a las siete primeras costillas. También se llama hueso esternal.
- 9.6 Eutanasia exanguinación:** **por** Eutanasia deriva de los vocablos griegos "eu" cuyo significado es bueno y de "thanatos" que significa muerte, por consiguiente, su significado etimológico es "buena muerte" o muerte sin dolores, molestias, ni sufrimientos físicos.  
Exanguinación: Fenómeno biológico de pérdida de gran parte o todo el volumen sanguíneo, sin lograr reponerlo.
- 9.7 Parrilla costal:** Es una cavidad semi-rígida, que protege los órganos del sistema circulatorio (corazón y grandes vasos) y respiratorio (pulmones, tráquea y bronquios). Está formada por 12 vértebras torácicas, 12 pares de costillas, los cartílagos costales y el esternón.
- 9.8 Perfundir:** Hacer fluir un líquido, de modo lento y continuo hacia el interior de órganos, conductos, cavidades, venas, etc.
- 9.9 Shock hipovolémico:** Afección crítica provocada por la baja repentina del flujo sanguíneo en todo el cuerpo.
- 9.10  $\mu\text{L}$ :** Microlitro.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>20. Procedimiento Técnico para Realizar Eutanasia y Toma de Tejidos en Ratón</b>		<b>HOJA:</b> <b>10</b>  <b>DE:</b> <b>10</b>

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Gómez, M. et al; (2001) "Manual para el uso y manejo de animales de laboratorio rata y ratón"; Facultad de Química.

POODLE, T., 1986, The UFAW HANDBOOK on the Care & Management of Laboratory Animals, 6a Edition, Ed. Longman Scientific & Technical.



D.C. Blood, et al, (1994); "Diccionario de veterinaria"; Editorial Mc Graw-Hill Interamericana.

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.



### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV:      01
	<b>21. Procedimiento Técnico para Realizar Examen Externo del Cadáver (Examen Macroscópico)</b>		HOJA:     1  DE:        9

## 21. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA REALIZAR EXAMEN EXTERNO DEL CADÁVER (EXAMEN MACROSCÓPICO)

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>21. Procedimiento Técnico para Realizar Examen Externo del Cadáver (Examen Macroscópico)</b>		<b>HOJA:</b> <b>2</b>  <b>DE:</b> <b>9</b>

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

La autopsia o estudio pos-mortem está enfocado a la enseñanza Médica al definir las causas que provocaron el deceso de la persona beneficiaria, mediante el análisis macroscópico, la disección de aparatos y sistemas, la interpretación histológica y diagnósticos. Una vertiente adicional es alertar a la familia directa sobre enfermedades infecciosas o hereditarias, así como auditar procedimientos médicos en el Instituto.

## 2.0 OBJETIVO

Confirmar o determinar el padecimiento fundamental, las alteraciones secundarias al mismo y aquellas otras derivadas del tratamiento, describe los hallazgos accesorios asintomáticos, silentes clínicamente, e investiga la causa de muerte.

## 3.0 SERVIDORA Y/O SEVIDOR PÚBLICO DE LA SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y/o servidores públicos de salud que participa en el procedimiento cuenta con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.

1. Médica o Médico Especialista en Patología.
2. Médica o Médico Residente de Patología.
3. Técnico de Autopsias.

## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1. Pijama quirúrgica.
2. Bata quirúrgica.
3. Guantes de látex quirúrgicos.
4. Gorro desechable.
5. Botas desechables.
6. Zapato antiderrapante, cómodo y ligero
7. Cuchillo de autopsia: 254 mm. y 354mm.
8. Mangos de bisturí: número 22.
9. Navajas de bisturí: número 22.
10. Fórceps: Adson con dientes y puntas aserradas, Rochester-Pean curvos y rectos, Halstead mosquito curvos y rectos con medidas que varían de 254 mm, 152 mm. 121 mm. 203 mm. 127 mm.
11. Tijeras: Mayo, Doyen, Metzembbaum rectas y curvas con puntas redondas de 137 mm. a 229 mm.
12. Sondas acanaladas y para exploración de vías biliares
13. Enterótomo: 203 mm.
14. Costótomo.
15. Martillo para autopsia.
16. Espátula de Virchow para cráneo.

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	24-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</b>	<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>21. Procedimiento Técnico para Realizar Examen Externo del Cadáver (Examen Macroscópico)</b>		<b>HOJA: 3</b>  <b>DE: 9</b>

- 17. Retractores.
- 18. Sierra de Stryker.
- 19. Reglas de acero inoxidable.
- 20. Cinta métrica.
- 21. Balanzas para pesar órganos.
- 22. Aguja e hilo.
- 23. Tablas de disección.
- 24. Lebrillo.
- 25. Cámara fotográfica digital o réflex.
- 26. Mesa de autopsia.
- 27. Medios cultivo para pulmón.
- 28. Balanza 20kg.
- 29. Balanza 100g a 1000g.

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS



Sala de autopsias

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>21. Procedimiento Técnico para Realizar Examen Externo del Cadáver (Examen Macroscópico)</b>		<b>HOJA:</b> 4  <b>DE:</b> 9



Cámara frigorífica

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000



Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>21. Procedimiento Técnico para Realizar Examen Externo del Cadáver (Examen Macroscópico)</b>		<b>HOJA:</b> <b>5</b>  <b>DE:</b> <b>9</b>

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.

D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.

D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.

D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

### NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-003-SSA-1994, Para la disposición de órganos y tejidos de seres humanos con fines terapéuticos, excepto sangre y sus componentes.

D.O.F. 30-IX-1994

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica.

D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.

D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

D.O.F. 17-II-2003

Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

D.O.F. 23-VI-2006

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo.

D.O.F. 09-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-025-STPS-2008, Condiciones de iluminación en los centros de trabajo.

D.O.F. 30-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-003-SCT/2008, Características de las etiquetas de envases y embalajes, destinadas al transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.

D.O.F. 15-VIII-2008

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tapimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>21. Procedimiento Técnico para Realizar Examen Externo del Cadáver (Examen Macroscópico)</b>		<b>HOJA:</b> 6 <b>DE:</b> 9

Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.  
D.O.F. 27-III-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.  
D.O.F. 19-II-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.  
D.O.F. 15-X-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos.  
D.O.F. 04-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA3-2012, Que establece las características mínimas en relación a infraestructura y equipamientos de laboratorios de Anatomía Patológica, hospitales y consultorios de atención médica especializada.  
D.O.F. 08-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-2014, Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral- Reconocimiento, evaluación y control.  
D.O.F. 28-IV-2014

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.  
D.O.F. 09-X-2015

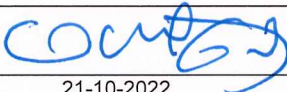
Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.  
D.O.F. 27-I-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.  
D.O.F. 21-II-2017

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

La Médica, Médico Especialista en Patología, la o la Médica o el Médico Residente de Patología y el Técnico de Autopsias son responsables de realizar las siguientes actividades:

1. La Técnica o Técnico de Autopsias realiza la colocación en la mesa de autopsias el cadáver y retira la sábana, vendajes y catéteres superficiales que pudiera tener el mismo (de ser posible, medir y pesar el cadáver).

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>21. Procedimiento Técnico para Realizar Examen Externo del Cadáver (Examen Macroscópico)</b>		<b>HOJA: 7</b> <b>DE: 9</b>

2. La Médica o Médico Especialista en Patología o la Médica o Médico Residente de Patología anota en el pizarrón de la sala de autopsias los siguientes datos:

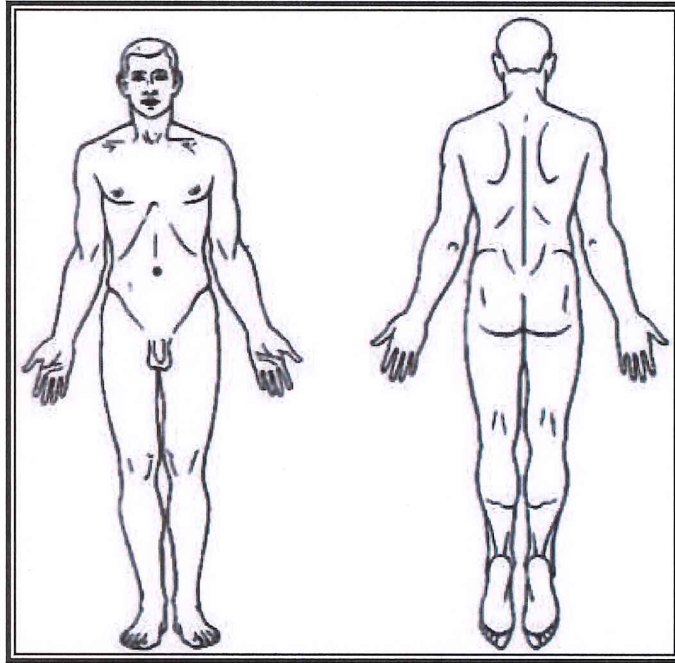
- i. Número de autopsia
- ii. Género
- iii. Edad
- iv. Biotipo

3. Realizar la exploración médica de todo el cadáver, verificando con la información clínica las siguientes probables variables: ausencia quirúrgica de extremidades, deformidades, heridas quirúrgicas, huellas de punción en vasos o cavidades serosas, petequias, equimosis, hematomas, red venosa colateral, telangiectasias, huellas de sangrado por nariz o boca, edema o anasarca.
4. Inspeccionar la piel por la parte anterior y posterior del cadáver para documentar cualquier tipo de lesión tal como cicatrices quirúrgicas, lesiones primarias o por complicaciones.
5. Examinar visualmente las características y coloración de las uñas y si se requiere, usar una lupa para magnificar la exploración.
6. Evaluar el color, longitud y características del pelo mediante inspección visual y regla.
7. Palpar la piel cabelluda y la calota craneal para descartar la presencia de irregularidades, tumores. Pérdidas de continuidad.
8. Inspeccionar los ojos notando las características de las escleras y conjuntiva.
9. Explorar la nariz y observar la integridad de la mucosa nasal y septum así como presencia o ausencia de secreciones.
10. Identificar, al abrir la boca, las condiciones de la mucosa, lengua y dentadura.
11. Palpar la el cuello determinado las características de la tráquea y glándula tiroides, verificando si existe adenomegalia cervical, (esto también se aplica para identificar ganglios en axila y regiones inguinales).
12. Examinar las glándulas mamarias, sobre todo en mujeres, mediante palpación para detectar la presencia de noclaciones o cambios de consistencia.
13. La exploración externa del abdomen se realiza de manera similar a la practicada en la clínica, se inspecciona los genitales y región anal en hombres y mujeres. La palpación del escroto permite identificar el descenso normal o anormal de testículos. En las mujeres se abren las piernas y se inspecciona la vulva.

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>21. Procedimiento Técnico para Realizar Examen Externo del Cadáver (Examen Macroscópico)</b>		<b>HOJA:</b> 8  <b>DE:</b> 9



Esquema utilizado para anotar los hallazgos a la exploración externa del cadáver

## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

Durante la autopsia, la Médica o Médico Especialista de Patología, Médica o Médico Residente de Patología, el Técnico de Autopsias y colaboradores aplican las medidas apropiadas de bioseguridad.

La adherencia estricta a los procedimientos de bioseguridad tales como:



- a. aplicar las técnicas apropiadas y
- b. utilizar los instrumentos adecuados, limitan el riesgo de accidentes en la mesa de autopsia.

Las servidoras y servidores públicos de la salud tienen riesgo de adquirir infecciones ocupacionales que han aceptado la responsabilidad moral de tratar con personas beneficiarias que sufren de procesos infecciosos.

Los agentes infecciosos tales como virus, bacterias, hongos, parásitos y priones son capaces de infectar a una servidora o servidor público de la salud si se expone a un número suficiente de microorganismos especialmente cuando sus barreras corporales de protección no están intactas.

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>21. Procedimiento Técnico para Realizar Examen Externo del Cadáver (Examen Macroscópico)</b>		<b>HOJA:</b> 9  <b>DE:</b> 9

En general, los organismos infecciosos se introducen por lesiones inadvertidas durante cualquier procedimiento de la autopsia. Esto se lleva a cabo por trauma con objetos punzocortantes, lesiones con bisturí, salpicaduras con material contaminado y el paso del agente infeccioso en lesiones cutáneas preexistentes.

La política del Departamento de Patología es realizar autopsias completas que conllevan la extracción del encéfalo, así como cultivos. De tal forma, no es posible determinar que sujeto sometido al estudio pos mortem es potencialmente infectante. Esto nos lleva a plantear la primera regla de medidas de bioseguridad, que consiste en: considerar a cualquier sujeto sometido a autopsia como fuente de agentes infecciosos.

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 Amortajar:** Ocluir los orificios naturales de un cadáver y envolverlo con un lienzo.
- 9.2 Autopsia:** A la serie de procedimientos basados en observaciones e intervenciones sistematizadas en el cadáver para establecer los diagnósticos anatomopatológicos finales. La autopsia podrá ser parcial o total.
- 9.3 Estudio pos mortem:** Examen de un cuerpo después de la muerte. Interés clínico de la causa de la muerte.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Gall EA. The necropsy as a tool in medical progress. Bull NY Acad Med 1968; 44:808-29

Finkbeiner EW, Urcel CP, Davis LR. Autopsy Pathology. A manual and atlas. Philadelphia. Churchill Livingstone. 2004

Ludwig J. Current methods of autopsy practice. Philadelphia. WB Saunders. 1979

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	Departamento de Patología		REV: 01
	22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver		HOJA: 1  DE: 29

## 22. PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA EVISCERAR Y OBTENER EL BLOQUE DE ÓRGANOS DEL CADÁVER

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tapimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA: 2</b> <b>DE: 29</b>

## 1.0 DEFINICIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

La disección en bloque de los órganos cervicales, torácicos, abdominales y pélvicos es la técnica para preservar la vascularización de los mismos.

## 2.0 OBJETIVO

Preservar la vascularización de los órganos, permitiendo la evisceración rápida conservando la relación entre los órganos.

## 3.0 SERVIDORA Y/O SERVIDOR PÚBLICO DE LA SALUD QUE PARTICIPA

Las servidoras y servidores públicos de salud que participa en el procedimiento cuentan con las competencias cognitivas, el conocimiento de los procesos, la actitud y las habilidades que les permite otorgar una atención de calidad y calidez a las personas beneficiarias.

1. Médica o Médico Especialista en Patología.
2. Médica o Médico Residente de Patología.
3. Técnico de Autopsias

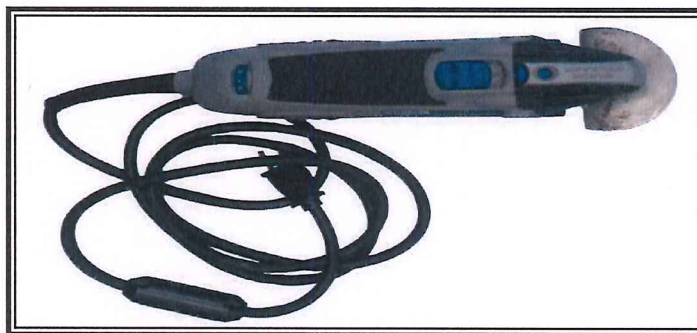
## 4.0 MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1. Cuchillo de autopsia: 254 mm. y 354mm.
2. Mangos de bisturí: número 22.
3. Navajas de bisturí: número 22.
4. Fórceps: Adson con dientes y puntas aserradas, Rochester-Pean curvos y rectos, Halstead mosquito curvos y rectos con medidas que varían de 254 mm, 152 mm. 121 mm. 203 mm. 127 mm.
5. Tijeras: Mayo, Doyen, Metzembbaum rectas y curvas con puntas redondas de 137 mm. a 229 mm.
6. Sondas acanaladas y para exploración de vías biliares.
7. Enterótomo: 203 mm.
8. Costótomo.
9. Martillo para autopsia.
10. Espátula de Virchow para cráneo.
11. Retractores.
12. Sierra de Stryker.
13. Reglas de acero inoxidable.
14. Cinta métrica.
15. Balanzas para pesar órganos.
16. Aguja e hilo.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> <b>3</b>  <b>DE:</b> <b>29</b>

- 17. Tablas de disección.
- 18. Lebrillo.
- 19. Cámara fotográfica digital o réflex.
- 20. Mesa de autopsia.



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</b>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> 4  <b>DE:</b> 29

## 5.0 INSTALACIONES FÍSICAS





Sala de autopsias. En la parte central se encuentra la mesa de autopsia de acero inoxidable y drenaje.



Cámara frigorífica. Repositorio de cadáveres

### CONTROL DE EMISIÓN

	<b>Elaboró:</b>	<b>Revisó:</b>	<b>Autorizó:</b>
<b>Nombre:</b>	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
<b>Cargo-puesto:</b>	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
<b>Firma:</b>			
<b>Fecha:</b>	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> 5  <b>DE:</b> 29

## 6.0 NORMATIVIDAD ESPECÍFICA Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.  
D.O.F. 05-II-1017 y sus reformas

### LEYES

Ley General de Salud.  
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.  
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.  
D.O.F. 04-I-2000

Ley General de Archivos.  
D.O.F. 15-VI-2018 y sus reformas

### REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.  
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.  
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.  
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de Insumos para la Salud.  
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

Reglamento Interno de la Comisión Nacional de Arbitraje Médico.  
D.O.F. 03-II-2004

Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.  
D.O.F. 19-IV-2004 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licóna	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> <b>6</b>  <b>DE:</b> <b>29</b>

## ACUERDOS

Acuerdo SNBP/001/2019 por el que se aprueba la creación del Mecanismo Extraordinario de Identificación Forense.  
D.O.F. 19-III-2020

Acuerdo por el que la Secretaría de Salud da a conocer los formatos de certificados de defunción y de muerte fetal.  
D.O.F. 28-XII-2021

## NORMAS OFICIALES

Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-003-SSA-1994, Para la disposición de órganos y tejidos de seres humanos con fines terapéuticos, excepto sangre y sus componentes.  
D.O.F. 30-IX-1994

Norma Oficial Mexicana NOM-078-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los estándares de calibración utilizados en las mediciones realizadas en los laboratorios de patología clínica  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-077-SSA1-1994, Que establece las especificaciones sanitarias de los materiales de control (en general) para laboratorios de patología.  
D.O.F. 01-07-1996

Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo  
D.O.F. 17-II-2003

Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.  
D.O.F. 23-VI-2006

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal, selección uso y manejo en los Centros de Trabajo  
D.O.F. 09-XII-2008



Norma Oficial Mexicana NOM-025-STPS-2008, Condiciones de iluminación en los centros de trabajo  
D.O.F. 30-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-003-SCT/2008, Características de las etiquetas de envases y embalajes, destinadas al transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos  
D.O.F. 15-VIII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos  
D.O.F. 27-III-2012

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		REV: <b>01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		HOJA: <b>7</b>  DE: <b>29</b>

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.  
D.O.F. 19-II-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.  
D.O.F. 15-X-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos.  
D.O.F. 04-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA3-2012, Que establece las características mínimas en relación a infraestructura y equipamientos de laboratorios de Anatomía Patológica, hospitales y consultorios de atención médica especializada.  
D.O.F. 08-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-2014, Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral- Reconocimiento, evaluación y control.  
D.O.F. 28-IV-2014

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.  
D.O.F. 09-X-2015

Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015, Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos.  
D.O.F. 27-I-2016

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de Anatomía Patológica.  
D.O.F. 21-II-2017

**CONTROL DE EMISIÓN**

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA: 8</b> <b>DE: 29</b>

## 7.0 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

La Médica o Médico Especialista de Patología (revisor de autopsias) es encargado directo de las autopsias que se soliciten y se practiquen durante el tiempo especificado para esta rotación:

Las obligaciones del revisor de autopsias, incluyen:

- a. El conocimiento de la autorización de la autopsia.
- b. Revisión macroscópica.
- c. Revisión microscópica.
- d. Establecer los diagnósticos finales.



La Médica o el Médico Residente de Patología durante la rotación en patología pos mortem, tiene las siguientes responsabilidades:

1. Es responsable de realizar la autopsia o autopsias que se autoricen durante el período de la rotación.
2. Es responsable de que el cadáver no se retenga por tiempo prolongado e innecesario.
3. Es responsable del procedimiento de evisceración.
4. Es responsable del manejo adecuado de los especímenes.
5. Es responsable de realizar el protocolo de autopsia.
6. Es responsable de la revisión macroscópica de autopsia.
7. Es responsable de analizar e interpretar los cortes histológicos.
8. Es responsable de realizar los diagnósticos finales conjuntamente con la Médica o Médico Especialista en Patología.
9. Es responsable de todas las actividades académicas que se deriven de la autopsia.

El Técnico de Autopsias es responsable de colaborar en las actividades que se le designen durante la realización de la autopsia.

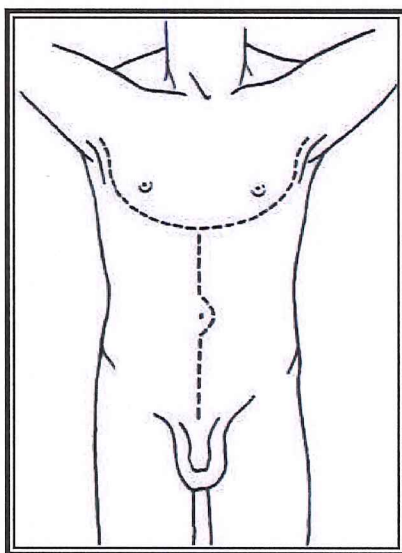
La Médica y/o Médico Especialista en Patología, en colaboración con la Médica y/o Médico Residente de Patología y el Técnico de Autopsias realizan las siguientes actividades:

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> 9  <b>DE:</b> 29

### EXPOSICIÓN DE LOS ÓRGANOS:



1. Realizar la exposición de los órganos con la incisión primaria en "Y". Esta consiste en el corte de la piel y tejidos blandos hasta el hueso, que se realiza de las articulaciones acromio claviculares a la parte media del esternón incisión que forma los brazos de la "Y".
2. Extender el corte hasta el pubis por la parte media del cadáver.

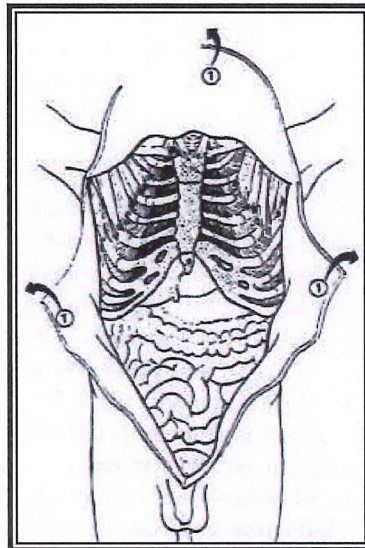


3. Diseccionar la piel del abdomen, la extensión de esta maniobra dependerá del tamaño del sujeto y si permite extraer los órganos con facilidad (Es usual que se diseque suficiente para exponer los órganos abdominales. Esta maniobra permite identificar el estado de las serosas y si existen colecciones que puedan drenarse. Todo el contenido debe cuantificarse).
4. Incidir el peritoneo y explorar in situ los órganos que contiene esta cavidad.

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> 10 <b>DE:</b> 29



Exposición de los órganos del abdomen.

5. Disecar la piel y el tejido celular subcutáneo de la porción alta del tórax y del cuello hasta el borde inferior del maxilar inferior.
6. A partir del ángulo del maxilar se seccionan los músculos del piso de la boca con el bisturí, realizando un corte continuo que sigue todo el contorno del maxilar. Al realizar esta maniobra se extraen las glándulas submaxilares.
7. Al alcanzar la cavidad oral se jala la lengua hacia abajo y se corta el paladar blando en la unión con el paladar duro, la úvula y los tejidos de la orofaringe incluyendo amígdalas palatinas.

#### EXPOSICIÓN DE LOS ÓRGANOS DEL TÓRAX:

1. Disecar la piel y el tejido celular subcutáneo de manera bilateral hasta la línea axilar anterior y apéndice xifoides.
2. Al identificarse la porción ósea del tórax, se procede a seccionar las costillas en la unión costo-cartilaginosa y a separar el esternón de las uniones con clavículas. Esto permitirá tener una ventana para explorar in situ las cavidades pleurales, pericardio y pleura visceral de los pulmones.
3. Los órganos torácicos y mediastinales se explorarán in situ. El pericardio parietal se abrirá en forma de "Y" invertida.

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



# MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS

Departamento de Patología

22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y  
Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver



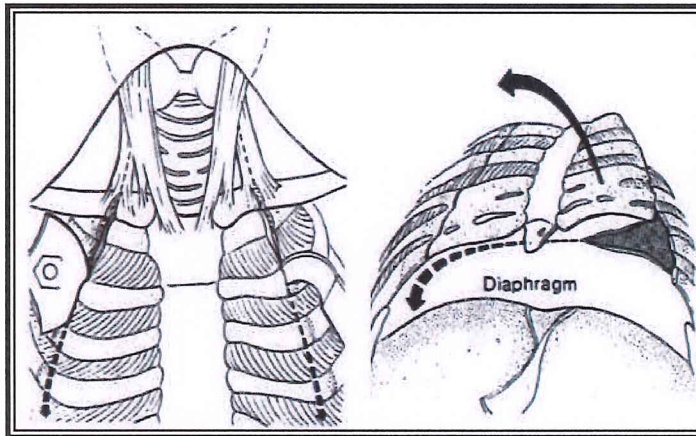
INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

CÓDIGO:  
M.T./ 0.2.4.2

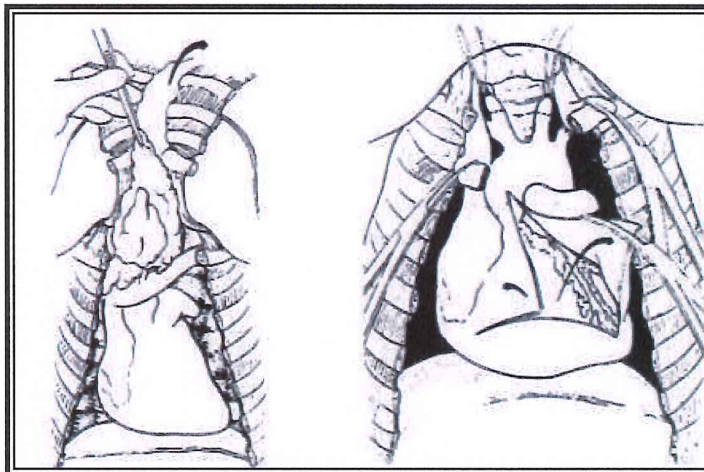
REV: 01

HOJA: 11

DE: 29





Apertura de la porción ósea de la caja torácica.



Exposición del corazón con pericardio. Apertura del pericardio que expone el epicardio

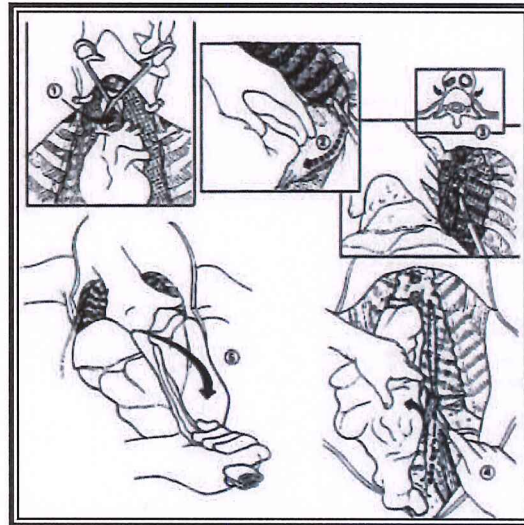
## CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA: 12</b> <b>DE: 29</b>

### EXTRACCIÓN DE LOS ÓRGANOS EN BLOQUE:

1. Se cortan los diafragmas hasta los cuerpos vertebrales, así como el peritoneo parietal. Recordando que los órganos se encuentran sostenidos por láminas de tejido conectivo que están insertadas en la columna vertebral, por lo que hay que seccionarlas.
2. Los órganos del tórax se levantan hasta exponer estas láminas de tejido conectivo y se cortan con bisturí de manera bilateral apoyándose en los cuerpos vertebrales (la médica o el médico especialista en Patología o la o el residente médico de Patología tendrá cuidado de no seccionar la aorta torácica).
3. En la región del cuello este procedimiento es más sencillo, ya que sólo implica disección roma sobre todo en vecindad con la porción ósea de la columna cervical.
4. Los órganos del retro peritoneo están cubiertos por la porción muscular del diafragma que también se inserta en la columna vertebral. El tejido adiposo de esta región anatómica no ofrece resistencia al extraer el bloque (practicar previamente la sección de la porción muscular del diafragma).
5. Al cerciorarse que todos los tejidos que sostienen a los órganos se han seccionado, se procede a retirar el bloque de los órganos. La extracción del bloque se realiza tomando la laringe y el recto, a continuación, se hará tracción de los órganos hacia arriba y hacia delante.
6. Evitar cualquier maniobra que produzca mutilación o deformación del cadáver, así como daño a los órganos.



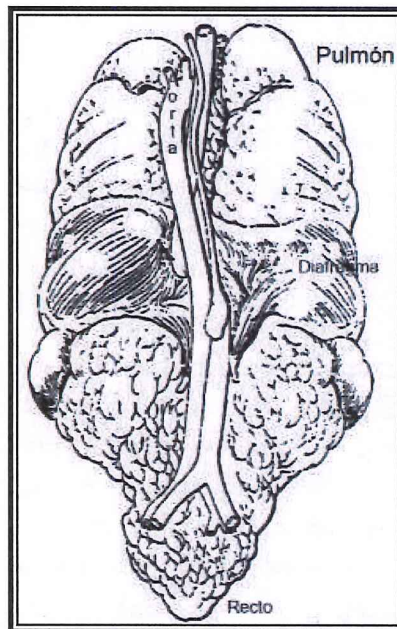
### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licón	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA: 13</b> <b>DE: 29</b>

**DIAGRAMA DEL BLOQUE DE ÓRGANOS VISTOS POR LA PORCIÓN VENTRAL:**

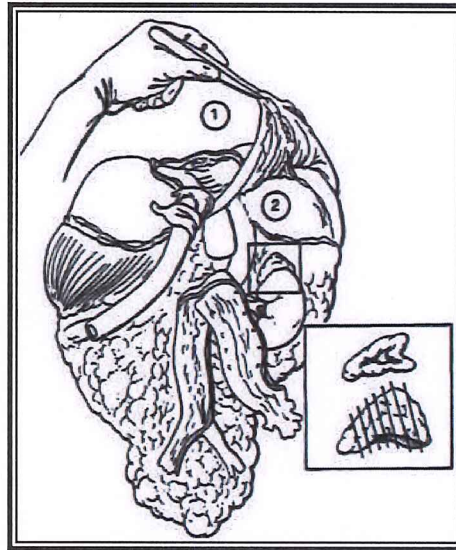
1. Del bloque principal, se disecan los órganos conservando las relaciones anatómicas entre órgano-órgano y sistemas.
2. Así del bloque principal, se separa en órganos del cuello, torácicos o cardio - pulmonar, hígado con vías biliares y aparato urinario.
3. Los órganos del tubo digestivo, se disecciona en secciones que incluyen: esófago-estómago, intestino delgado y colon.
4. El aparato reproductor femenino, se disecciona de manera individual y se conserva la relación de útero con anexos.



5. Diseccionar la vena cava inferior, aorta, arterias ilíacas y femorales y explorar en toda su longitud por la superficie adventicia y abrir con tijera para evaluar la luz y porción endotelial.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> <b>14</b>  <b>DE:</b> <b>29</b>



#### DISECCIÓN DEL BLOQUE CARDIO-PULMONAR

1. Disecar el esófago y aorta.
2. La porción torácica del esófago se diseca a partir de su unión con la faringe y se continúa en sentido caudal hasta el borde del agujero esofágico del diafragma, el cual se incide y permite liberar completamente al esófago.
3. La aorta torácica puede quedar unida al cayado o puede seccionarse a este nivel.
4. La maniobra que permite disecar la aorta torácica se realiza de manera similar a la utilizada para el esófago torácico. En personas beneficiarias con sospecha de fistula traqueo-esofágica se abre el esófago in situ.
5. liberar del diafragma la porción basal de los pulmones, así como el saco pericárdico, sin ocasionar daño al mismo.
6. Identificar la vena cava inferior y proceder a seccionarla lo más cercano al diafragma. Esto permite liberar a pulmones, corazón y órganos del cuello del bloque principal de órganos.
7. Seccionar la laringe a la altura del tercer anillo traqueal para separar los órganos del cuello.

#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> 15 <b>DE:</b> 29

### DISECCIÓN DEL BLOQUE RENAL

1. Explorar la vena cava inferior incluyendo las venas hepáticas.
2. Identificar los uréteres, que se encuentran inmersos en tejido conectivo laxo. Incidir este tejido y utilizando una gasa separar el tejido conectivo desde los hilios renales hasta la desembocadura de los uréteres en la vejiga.
3. Retirar el tejido adiposo de los riñones. Incidir el tejido adiposo hasta que identificar la cápsula del riñón y proceda a realizar un ojal (incide o corta la capsula renal y se realiza disección roma), el cual le permitirá introducir un dedo para disecar la cápsula junto con el tejido adiposo.
4. Disecar con tijera las estructuras del hilio renal, esto es vena y arteria renal, así como uréter, cortar el tejido adiposo y cápsula renal.
5. Separar la aorta abdominal cortando con tijera las ramas principales de esta arteria. Al disecarla, tener cuidado de no dañar el hilio renal.
6. Posterior a la liberación de los riñones y uréteres, disecar la vejiga. Este órgano tiene relaciones intrínsecas con el recto en los hombres y en las mujeres además con el útero y vagina. Esto conlleva la disección de los tabiques recto-vesical y vésico-vaginal.

### DISECCIÓN DE INTESTINO DELGADO Y COLON:

1. La Médica o el Médico Especialista en Patología y la Médica o el Médico Residente de Patología voltea el bloque de órganos remanente, lo que permite identificar el borde anterior del hígado y epiplón.
2. La Médica o el Médico Especialista en Patología y la Médica o el Médico Residente de Patología identifica el ángulo de Treitz y se secciona el intestino delgado a este nivel, previamente amarrando el intestino con el fin de evitar el derrame de su contenido (practicar esta maniobra de manera similar en el ileon terminal a 15 cm. antes de su continuación con el ciego).
3. La Médica o el Médico Especialista en Patología y la Médica o el Médico Residente de Patología corta la raíz del mesenterio, evitando lesionar al páncreas ni al bazo.
4. La Médica o el Médico Especialista en Patología y la Médica o el Médico Residente de Patología separa el colon disecando con tijera de los ligamentos que lo unen con el hígado, estómago y bazo.
5. La Médica o el Médico Especialista en Patología y la Médica o el Médico Residente de Patología libera al estómago realizando un corte en la primera porción del duodeno y disecando el tejido conectivo de los ligamentos remanentes.

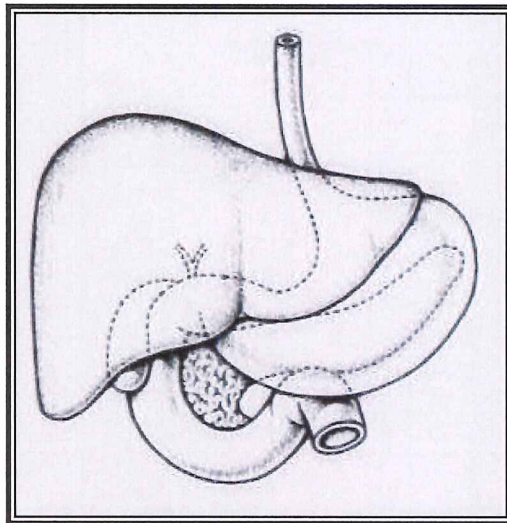
#### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> <b>16</b>  <b>DE:</b> <b>29</b>

**DISECCIÓN DEL BLOQUE DEL HÍGADO Y VÍAS BILIARES:**

La aplicación de algún método en especial dependerá de los hallazgos y de la enfermedad hepato-biliar de base. Además, están sujetos a la decisión de la Médica o Médico Especialista en Patología, de conservar las relaciones anatómicas del hígado con vesícula, vías biliares, duodeno y páncreas



Esquema que ilustra las relaciones anatómicas normales del hígado, vías biliares y páncreas.

**Separación completa del hígado.**

1. Disecar la vesícula biliar del lecho hepático incluyendo los conductos hepáticos mayores derecho e izquierdo, así como el colédoco.
2. Al seccionar los conductos biliares mayores del hilio hepático se tendrá que identificar si existe o no salida de bilis. Además, detrás de estos conductos se encuentra la vena porta, la cual se explora y se evalúan sus características.
- 3.

**Abrir el duodeno e identificar la ampolla de Vater:**

1. Se explora con cánula, lo que también permite evaluar el conducto pancreático y se secciona de manera retrógrada al flujo de bilis (este paso también se practica para exponer el colédoco, cístico, vesícula biliar así como conductos hepáticos mayores).
2. Disecar la vesícula del lecho hepático y seccionar los conductos hepáticos, lo cual deja un conjunto de órganos formado por vesícula biliar, duodeno, páncreas y bazo.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> <b>17</b>  <b>DE:</b> <b>29</b>

### DISECCIÓN POR ÓRGANOS:

Órganos del cuello:

La lengua se explora mediante cortes transversales a su eje mayor. Se analizan las características macroscópicas de las amígdalas palatinas y glándulas submaxilares. En general, los cortes para exponer las superficies internas se practican en todos los órganos de manera anatómica para que la sección exponga la superficie interna.

La disección de las glándulas paratiroides, implica el conocer la anatomía normal de estas glándulas. El abordaje consiste en identificarlas sin separar al tiroides de la laringe y por la parte posterior del tiroides. La glándula tiroides se separa de la laringe, se pesa y se explora por medio de cortes sagitales en cada lóbulo, que vayan del borde externo hacia el istmo.

Órganos del tórax:

El corazón se separa de los pulmones para lo cual tiene que disecarse y examinar en toda su extensión las arterias pulmonares, sus ramas y las venas pulmonares. Estos vasos se seccionan a nivel del hilio pulmonar. El pericardio se separa completamente del corazón y grandes vasos.

El corazón se explora con el método de Virchow, esto es siguiendo el flujo normal de la sangre. Mediante un corte se unen los orificios de las venas cava superior e inferior en la cara posterior de la aurícula derecha. Este corte se continúa sobre el borde superior de la orejuela derecha, lo que permite exponer la cavidad de la aurícula y visualizar la válvula tricúspide. Se corta la parte posterior de la válvula tricúspide, así como la pared posterior del ventrículo derecho de manera paralela al tabique interventricular. Este corte se continúa por la pared anterior, también paralelo al tabique interventricular hasta exponer la arteria pulmonar.

En la cara posterior de la aurícula izquierda mediante cortes se unen los orificios de las venas pulmonares y se abre la orejuela. La válvula mitral se secciona al igual que el ventrículo derecho y se continúa seccionando el miocardio hasta la punta del corazón. Finalmente se corta la pared anterior del ventrículo izquierdo paralelo al septum y se prolonga el corte hasta la aorta incluyendo la válvula aórtica. El septum interventricular tiene que explorarse con un corte anteroposterior y medio.

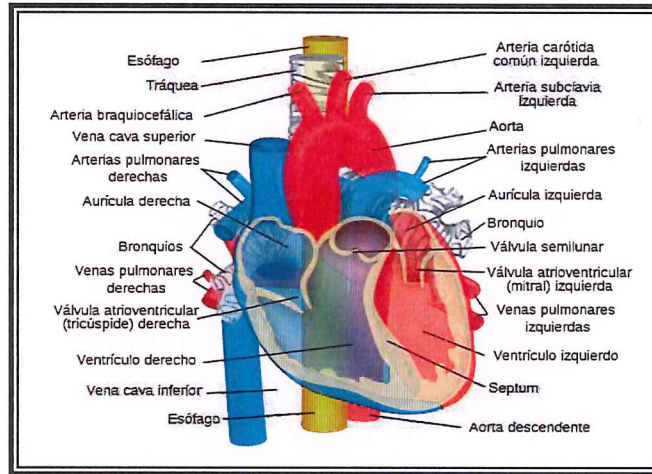
Se exploran las coronarias y sus dos ramas principales, la descendente anterior y la descendente posterior. La exploración se lleva a cabo mediante cortes transversales cada 0.5cm. En algunos casos las coronarias se pueden abrir con tijeras para exponer la luz, sobre todo en sujetos con corazón normal.

En algunos sujetos con hipertrofia concéntrica del ventrículo izquierdo o en infarto del miocardio (se recomienda practicar cortes transversales de los ventrículos). Esto permite apreciar la magnitud de la hipertrofia miocárdica o determinar la extensión y distribución del infarto. El corazón se secciona a intervalos de 1 cm. siguiendo el eje menor o plano horizontal del órgano. Se inicia en el ápice del corazón continuando hasta la vecindad del miocardio con el anillo valvular aurícula ventricular. Las aurículas, válvulas y orejuelas se exponen siguiendo el flujo normal de la sangre.

El examen macroscópico del corazón tiene que seguir el siguiente orden: pericardio, coronarias, válvulas cardíacas (mitral y tricúspide), ventrículo izquierdo, ventrículo derecho, endocardio, aurículas y orejuelas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO: M.T./ 0.2.4.2</b>
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV: 01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA: 18</b> <b>DE: 29</b>



Los pulmones se pueden explorar en fresco y fijados en formol, esto se realiza de manera rutinaria, se examinan posterior a la perfusión con formol al 10%. Posterior a este paso, se liga la parte alta de la tráquea y se sumergen en formol durante 12 a 24 horas. Se seccionan utilizando el plano horizontal procurando que los cortes sigan el trayecto de los bronquios.

Los intestinos delgado y grueso se exploran macroscópicamente, evaluando el aspecto de la serosa y el mesenterio correspondiente. El intestino delgado tiene que abrirse a nivel del borde de inserción del mesenterio y el intestino grueso se explora siguiendo las tenías. El apéndice cecal puede cortarse transversalmente o a lo largo.

El esófago se abre por cualquiera de sus caras. El estómago siempre tiene que explorarse seccionándolo por la curvatura mayor. En páncreas se secciona en sentido sagital y medio, procurando que el corte pase a nivel del conducto de Wirsung; de no conseguirse esto, es necesario identificarlo y abrirlo con tijeras.



El bazo se explora con cortes transversales de arriba hacia abajo, de un espesor promedio de 1cm. El hígado con cortes sagitales de adelante hacia atrás, con un grosor máximo de 1.5 cm.

En el sistema genitourinario, se abren los uréteres en toda su longitud. En caso de que hay lesiones obstructivas de uretra, vejiga o uréteres que hayan producido hidronefrosis, pielonefritis o pionefritis, estos órganos pueden disecarse unidos con objeto de demostrar en las fotografías la lesión primaria y sus complicaciones.

Los riñones se exploran con un corte sagital y medio que inicia del borde externo hacia el hilio, el cual tiene que pasar a nivel de los cálices y pelvicillas. En caso de no identificar el sistema pielocalicial, se abre o explora con tijera.

La vejiga se expone con una incisión en "Y" invertida y se explora el orificio de desembocadura de los uréteres y el orificio uretral.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> <b>19</b>  <b>DE:</b> <b>29</b>

Las vesículas seminales y la próstata se separan de la vejiga. La próstata se secciona en forma seriada con cortes que sigan el plano horizontal del órgano lo que permite evaluar el aspecto macroscópico del lóbulo derecho e izquierdo.

Los testículos y el epidídimo se exploran por medio de cortes sagitales y se fijan en formol. Los órganos genitales femeninos se disecan unidos; el útero se abre con una incisión que vaya por uno de los bordes y se continúe hacia el fondo.

### EXTRACCIÓN DEL LOS ÓRGANOS DE LA PELVIS:

1. Separar los órganos de la pelvis, previo a la extracción del bloque comprende conocer la anatomía de esta región, ya que esta maniobra también se realiza en forma ciega cuya guía es la palpación del recto, vejiga y del útero en las mujeres.
2. Al identificar estos órganos se retratan en sentido cefálico y se procede a seccionar de manera ciega el recto con bisturí o cuchillo.
3. La extracción de los testículos se realiza por vía de la cavidad pélvica, se tiene que obtener con todo y el cordón. Nunca realizar incisiones en el escroto.

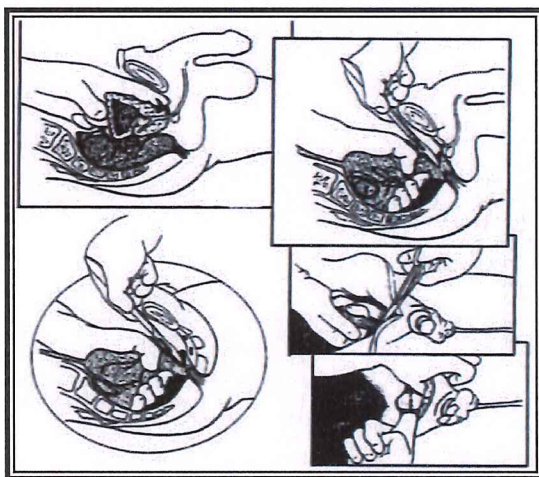




Diagrama de extracción de los órganos de la pelvis y testículo.

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

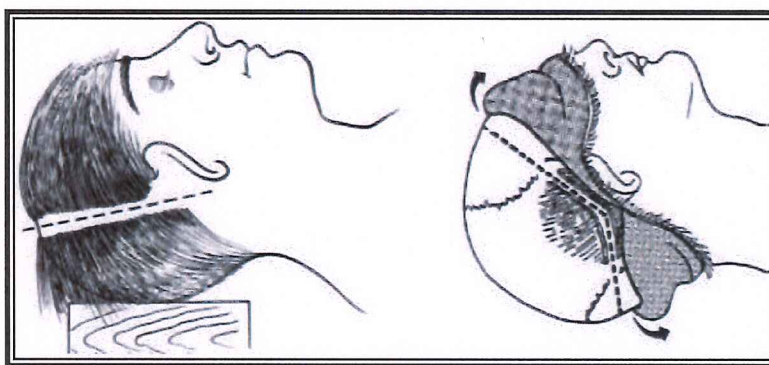
	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> <b>20</b>  <b>DE:</b> <b>29</b>

### EXTRACCIÓN DEL ENCÉFALO:

En los adultos la extracción del encéfalo conlleva tres pasos: disección de la piel cabelluda, separación de la calota craneal y remoción del encéfalo.

Disección de la piel cabelluda:



1. Utilizar un soporte para elevar la cabeza del cadáver.
2. Separar el pelo, antes de realizar la incisión primaria, que se practica de manera coronal a partir de una de las apófisis mastoides hasta la mastoides contraria.
3. Si la incisión se realiza muy anterior desfigurará al cadáver y si se efectúa muy posterior la maniobra de reflexión de la piel cabelluda se tornará difícil.
4. Las mitades anterior y posterior de la piel cabelluda se retraen hacia delante y atrás respectivamente. Al utilizar una gasa como apoyo, evitar el uso de instrumentos cortantes.
5. Si la reflexión de la piel cabelluda es problemática, utilizar bisturí para separar el tejido conectivo de la calota con el filo dirigido al hueso de la bóveda craneal.
6. El colgajo anterior de piel cabelluda se refleja a 1-2 cm. del borde supra orbitario y el posterior hasta la protuberancia del occipital.



Diagramas que ilustran la maniobra de disección y retracción de la piel cabelluda.

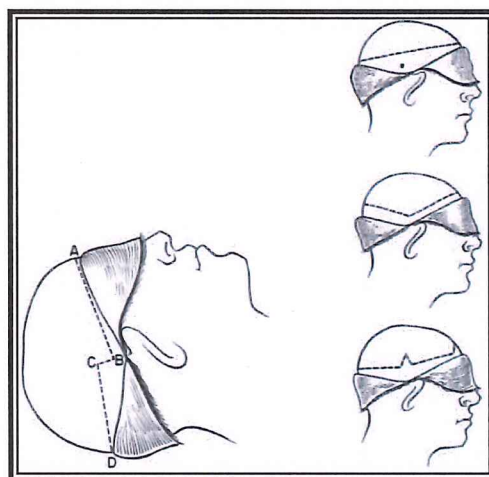
### CONTROL DE EMISIÓN

	<b>Elaboró:</b>	<b>Revisó:</b>	<b>Autorizó:</b>
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> 21  <b>DE:</b> 29

Separación de la calota craneal:

1. Aperturar la bóveda craneal utilizando la sierra Striker.
2. Dejar una muesca en el hueso donde se fije la calota, para evitar su desplazamiento al momento de amortajarlo.
3. Iniciar el corte 3 cm. arriba del borde orbital superior iniciando del hueso frontal, hasta el temporal aproximadamente a 1cm de la parte apical del lóbulo de la oreja.
4. Realizar en forma vertical el corte 2 cm más de la porción apical del lóbulo de la oreja, esto es un corte en "L" para sostener la calota.
5. Terminar la sección hasta la protuberancia del occipital (D).
6. Se recomienda que el corte profundo se detenga en la tabla interna de la calota. Esta es frágil y se puede separar fácilmente con la espátula de Virchow para encéfalo con o sin ayuda de martillo.
7. Al terminar el corte del hueso, se procede a retirar la calota. Al dejar la duramadre intacta, la separación completa de la calota es una maniobra sencilla, que consiste exclusivamente en utilizar ambas manos. Una detiene o protege a la duramadre (periostio) y la otrajala la calota.
8. En caso de que se imposibilite esta maniobra, debido a adherencias firmes, se procede a cortar la dura siguiendo la línea de corte del hueso



El diagrama A se explica en el texto, en el segundo, otros tipos de cortes sobre la calota.

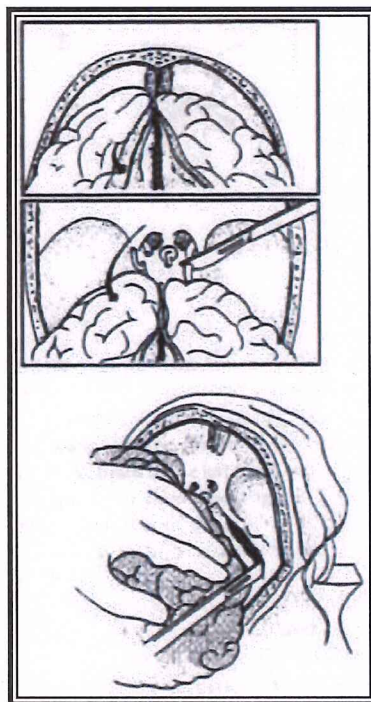
**CONTROL DE EMISIÓN**

	<b>Elaboró:</b>	<b>Revisó:</b>	<b>Autorizó:</b>
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> 22 <b>DE:</b> 29

Remoción del encéfalo:

1. Levantar con la mano los lóbulos frontales y los bulbos olfatorios con sus trayectos de la placa cribiforme.
2. Seccionar los nervios ópticos a nivel del foramen óptico.
3. Utilizando el propio peso del encéfalo sostenerlo con la mano derecha o izquierda hasta que se exponga la glándula pineal, arterias carótidas, pares craneales III, IV, V, y VI que se disecan o seccionan con tijera lo más cercano al hueso del piso craneal.




En la parte superior del diagrama se ilustran los pasos 1, 2. El dibujo inferior señala la sección de la tienda del cerebelo, paso 4.

4. Disecar la tienda del cerebelo con tijeras curvas o bisturí de la unión con el hueso petroso.
5. Cuidar que el peso del encéfalo por gravedad ocasione tracción del cerebelo y porción superior de la médula espinal causando separación y daño a los pedúnculos cerebrales.
6. Cortar los nervios craneales VII, VIII, IX, X, XI y XII. Se tiene que seguir la secuencia numérica ordenada de los pares, para forzarse a identificarlos en forma exacta.
7. Seccionar con tijeras las arterias vertebrales a nivel de su emergencia hacia la cavidad craneal.

**CONTROL DE EMISIÓN**

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> <b>23</b>  <b>DE:</b> <b>29</b>

8. Cortar la porción cervical de la médula espinal lo más caudal posible, evitando realizar un corte oblicuo.
9. Retraer el encéfalo lo más posible, para liberar al tallo cerebral y cerebelo de la fosa posterior, evitar la elongación excesiva de la porción rostral del tallo.
10. Al extraer el encéfalo y retirarlo de la base del cráneo, cortar cualquier unión de la tienda del cerebelo con el hueso. La duramadre tiene que quedar en su sitio anatómico hasta que se realicen los cortes propios del encéfalo.

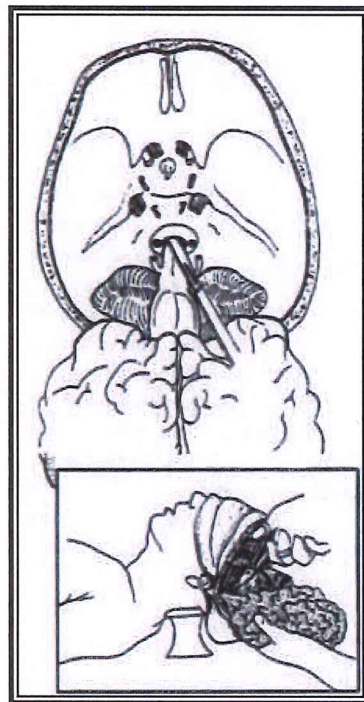


Diagrama que ilustran los pasos 8 y 10. Observe que la maniobra implica usar ambas manos

La evisceración de “la autopsia de rutina” se practica aplicando la técnica de M. Letulle, que consiste en la remoción de los órganos cervicales, torácicos, abdominales y pélvicos en bloque. La ventaja de la técnica de Letulle, corresponde a que el cuerpo está disponible para ser entregado a los familiares o persona responsable, en un tiempo máximo de 1 hora.

#### MANEJO DE LAS MUESTRAS:

La Médica y/o Médico Especialista en Patología, la Médica o el Médico Residente de Patología y el Técnico de Autopsias son encargados de realizar las siguientes actividades:

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> 24 <b>DE:</b> 29

Durante la disección de los órganos es obligatorio pesarlos y medirlos. Los resultados serán registrados en la hoja de pesos y medidas del protocolo de autopsias. Además, se registra presencia o ausencia de líquido en cavidades serosas.

Durante la disección de los órganos de la autopsia se tomarán fotografías en fresco y fijadas de las lesiones. Inmediatamente después de la disección, los órganos deberán ser revisados en fresco. Cuando esto no sea posible, se colocarán en recipientes para su fijación con formol al 10%.

El prosector tomará cortes de todos los órganos y se colocarán en un frasco con capacidad del 1000 ml, con formol al 10%, identificándolo por medio de una tela adhesiva con el número de la autopsia anotado con grafito o lápiz graso. No debe marcarse con tinta porque el número se borra con el agua.

La fijación en formol al 10% de los cortes de los órganos debe hacerse lo más pronto posible para evitar autolisis. Se recomienda que la dimensión de los cortes corresponda a 1 cm<sup>2</sup> y con espesor máximo de 4 milímetros. Cortes de tejido mayores a esta dimensión no permiten que la fijación con formol sea adecuada.

Deberá evitarse que las muestras de los órganos se almacenen a presión en el frasco, sin espacio entre ellas ya que tampoco se fijarán. En los casos que se requiera guardar numerosos fragmentos, es conveniente utilizar otro frasco.

Los cortes se incluyen en cápsulas, identificados con etiquetas en las que aparezca el número de la autopsia y el número progresivo de cada corte ejemplo: (A-3392-80 "1").

El número de cortes de cada autopsia es variable y en relación con tipo del caso. La decisión del número de cortes es responsabilidad exclusiva de la médica o médico especialista en Patología encargado del caso.

Las cápsulas con los cortes se entregarán en el laboratorio de histotecnología, en un frasco con formol al 10% y con una copia de la relación de los mismos, en la que se mencione el número de la autopsia, el tejido y el número progresivo correspondiente a cada cápsula, la tinción o tinciones necesarias para cada corte, el nombre del prosector y la fecha de entrega.


#### ENTREGA DE CADÁVER:

1. El Técnico de Autopsias amortaja el cadáver.
2. El Técnico de Autopsias entrega el cadáver a los familiares, persona responsable y/o servicios funerarios.
3. El Técnico de Autopsias registra los datos de quién recibe el cuerpo.

#### REGLAS GENERALES:

Se tiene que considerar potencialmente infectantes todas las autopsias, así como las muestras de tejidos y líquidos que se obtienen durante el procedimiento.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licóna	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> 25  <b>DE:</b> 29

En caso de realizar dos o más autopsias, se procederá a practicar aquellas con mayor riesgo de infección ya que se evita la posibilidad de accidentes por cansancio.

Todos los procedimientos que conlleva la autopsia se tienen que practicar minimizando el dispersar líquidos, sangre y tejidos fuera de la mesa de autopsia.

Todos los instrumentos utilizados durante la autopsia se tienen que confinar a la mesa de autopsias o tabla de disección.

En todas las autopsias se tiene que utilizar uniforme quirúrgico, guantes y máscara o lentes protectores.

El riesgo de infectarse durante la autopsia se basa en el uso inadecuado de los instrumentos tales como bisturís, agujas, pinzas con dientes, etc.

Las reglas para reducir el riesgo de trauma con instrumentos punzocortantes son las siguientes:

- I) Disminuya lo más posible el uso de bisturí durante la disección,
- II) Nunca utilice bisturí para realizar cortes a ciegas,
- III) Remueva la hoja de bisturí con sumo cuidado y sin distracciones,
- IV) Deberá estar muy conciente dónde deja los instrumentos punzocortantes,
- V) Durante la disección solamente un prosector deberá utilizar bisturí en una región,
- VI) De ser posible avise a los colaboradores que va a realizar maniobras con instrumentos cortantes.

El uso del costótomo deja pequeñas espículas óseas que pueden ser cortantes, por lo tanto cubra con gasa estas superficies para evitar lesiones cutáneas.

Si observa ruptura de alguno de los guantes, proceda de inmediato a realizar el cambio.

Si ya comenzó la autopsia, queda prohibido estrictamente salir de esta área.

Mantenga lo más limpio posible el área de trabajo, sobre todo de sangre.

Si la autopsia corresponde a un caso de infección, limite lo más posible la cantidad de personas en el área.

En caso de sospecha de enfermedad por priones, no realice la autopsia.

Los radioisótopos utilizados para estudios diagnósticos no representan un problema de contaminación para la médica o médico especialista en Patología y sus colaboradores.

**CONTROL DE EMISIÓN**

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> 26 <b>DE:</b> 29

En sujetos con implantes radioactivos o que recibieron radiación con fines terapéuticos deben ser manejados con medidas especiales dependiendo del nivel de radiación remanente.

Al terminar la autopsia, lávese las manos.

En caso de accidente punzocortante avisar a la subdirección de Epidemiología Hospitalaria y Control de la Calidad de la Atención Médica (cuarto de trabajo 1) extensión 7904.

## 8.0 MEDIDAS DE CONTROL PARA ELEVAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LAS PERSONAS BENEFICIARIAS

Durante la autopsia, la Médica o Médico Especialista de Patología, Médica o Médico Residente de Patología, Técnico de Autopsias y colaboradores guardan las medidas apropiadas de bioseguridad.

La adherencia estricta a los procedimientos de bioseguridad tales como:

- a. aplicar las técnicas apropiadas y
- b. utilizar los instrumentos adecuados, limitan el riesgo de accidentes en la mesa de autopsia.


Recordar que las servidoras y servidores públicos de la salud tienen riesgo de adquirir infecciones ocupacionales. Históricamente los las servidoras y servidores públicos de la salud han aceptado la responsabilidad moral de tratar con personas beneficiarias que sufren de procesos infecciosos.



Los agentes infecciosos tales como virus, bacterias, hongos, parásitos y priones son capaces de infectar a una servidora o servidor público de la salud si se expone a un número suficiente de microorganismos especialmente cuando sus barreras corporales de protección no están intactas.

En general, los organismos infecciosos se introducen por lesiones inadvertidas durante cualquier procedimiento de la autopsia. Esto se lleva a cabo por trauma con objetos punzocortantes, lesiones con bisturí, salpicaduras con material contaminado y el paso del agente infeccioso en lesiones cutáneas preexistentes.

La política del departamento de Patología es realizar autopsias completas que conllevan la extracción del encéfalo así como cultivos. De tal forma, no es posible determinar que sujeto sometido al estudio posmortem es potencialmente infectante. Esto nos lleva a plantear la primera regla de medidas de bioseguridad, que consiste en: considerar a cualquier sujeto sometido a autopsia como fuente de agentes infecciosos.

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> 27 <b>DE:</b> 29

## 9.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 9.1 Adventicia:** Capa más externa de los vasos, conformada por tejido conectivo laxo y contiene fibras colágenas, elásticas y musculatura lisa en disposición longitudinal.
- 9.2 Amortajar:** Ocluir los orificios naturales de un cadáver y envolverlo con un lienzo.
- 9.3 Angulo de Treitz:** División entre la cuarta sección del duodeno y el yeyuno.
- 9.4 Apendice xifoides:** Elemento más pequeño y variable del esternón, se encuentra en su extremo inferior. Tiene una estructura cartilaginosa en el nacimiento y posteriormente se osifica.
- 9.5 Articulación acromio clavicular:** Unión del hueso en donde el punto alto del omóplato se une con la clavícula.
- 9.6 Autólisis:** Proceso de desintegración que comienza luego de producida la muerte y en el cual no existe participación de bacterias, dependiendo sólo de la acción de las enzimas celulares.
- 9.7 Autopsia:** A la serie de procedimientos basados en observaciones e intervenciones sistematizadas en el cadáver para establecer los diagnósticos anatomopatológicos finales. La autopsia podrá ser parcial o total. La autopsia o estudio pos-mortem está enfocado a la enseñanza médica al definir las causas que provocaron el deceso de la persona beneficiaria, mediante el manejo de especímenes, interpretación histológica y diagnósticos.
- 9.8 Calota:** Parte superior del cráneo o bóveda craneal.
- 9.9 Calota craneal:** Huesos del cráneo que se forman mediante osificación membranosa en forma.
- 9.10 Conducto de Wirsung:** Es un conducto que surge en la cola del páncreas y atraviesa su cuerpo, cuello y cabeza hasta desembocar en el duodeno a través de la ampolla de Vater. Permite la salida del jugo pancreático.
- 9.11 Costotomo:** Es un instrumento que se utiliza para dividir los cartílagos costales y abrir la cavidad torácica.
- 9.12 Disecar:** Cortar, separar y exponer las estructuras corporales de un organismo vivo o un cadáver para su estudio anatómico o para obtener tejidos corporales.
- 9.13 Disección roma:** Disección realizada mediante la separación de los tejidos a lo largo de las líneas naturales de despegamiento, sin necesidad de cortar.

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> 28 <b>DE:</b> 29

- 9.14 Epiplón:** Omento o epiplón mayor es un repliegue peritoneal formado por cuatro capas de tejido adiposo, cuya función es limitar la diseminación de procesos infecciosos e inflamatorios.
- 9.15 Estudio macroscópico:** Al análisis con fines diagnósticos de un órgano, tejido u otro material procedente de un organismo, lo suficientemente grande como para que pueda ser observado a simple vista.
- 9.16 Estudio pos mortem:** Examen de un cuerpo después de la muerte. Interés clínico de la causa de la muerte.
- 9.17 Evisceración:** Extracción de las vísceras del cuerpo a través de una incisión quirúrgica.
- 9.18 Formaldehido:** Compuesto químico, un aldehído inflamable volátil. Al 40% se le denomina Formol, es incoloro y con un olor penetrante. Permite la fijación de las proteínas de los tejidos.
- 9.19 Formol al 10%:** Sustancia química que preserva los tejidos y evita la auto desintegración en forma espontánea. Formol diluido con soluciones buffer (alcalinas).
- 9.20 Incidir:** Cortar sobre un tejido o sobre un órgano.
- 9.21 In situ:** En su lugar original.
- 9.22 Mediastino:** Parte del tórax que está entre el esternón y la columna vertebral, y entre los pulmones. Esta zona contiene el corazón, los grandes vasos sanguíneos, la tráquea, el timo, el esófago y tejidos conectivos.
- 9.23 Método de Virchow:** Procedimiento que consiste en apertura conjunta del cuello, tórax y abdomen mediante la realización de una incisión única medial toracoabdominal.
- 9.24 Mesenterio:** Pliegue de membranas que une el intestino con la pared abdominal y lo mantiene en su lugar.
- 9.25 Perfusión:** Introducción lenta y continuada de una sustancia, usualmente formol en un órgano.
- 9.26 Porción endotelial:** Conjunto de células que recubren por dentro todas y cada una de nuestras venas, arterias y capilares.
- 9.27 Prosector:** Persona preparada en anatomía y capaz de hacer las demostraciones de los órganos y lesiones.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> <b>01</b>
	<b>22. Procedimiento Técnico para Eviscerar y Obtener el Bloque De Órganos del Cadáver</b>		<b>HOJA:</b> <b>29</b>  <b>DE:</b> <b>29</b>

- 9.28 Tejido adiposo:** Pliegue de membranas que une el intestino con la pared abdominal y lo mantiene en su lugar. Tejido compuesto de adipocitos donde se almacena la energía en forma de grasa. Además de servir como almacén de energía, también sirve para aislar el cuerpo y proteger los órganos, así como para producir hormonas importantes en la regulación del apetito.
- 9.29 Septum:** Simultánea a los huesos de la cara. Cubren el encéfalo.
- 9.30 Septum nasal:** Hueso que divide en dos la cavidad nasal. Es una estructura impar.
- 9.31 Sujetos:** Se refiere a personas fallecidas.
- 9.32 Tenia:** Tres bandas longitudinales de músculo liso ubicadas debajo del peritoneo que se extienden a lo largo de ciertas secciones del intestino grueso o colon.

## 10.0 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA



- Gall EA. The necropsy as a tool in medical progress. Bull NY Acad Med 1968; 44:808-29.
- Finkbeiner EW, Urcel CP, Davis LR. Autopsy Pathology. A manual and atlas. Philadelphia. Churchill Livingstone. 2004.
- Ludwig J. Current methods of autopsy practice. Philadelphia. WB Saunders. 1979.

## 11.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Número de revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
01	21-10-2022	Actualización del procedimiento de acuerdo con la Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos vigente y al Prontuario para el uso de lenguaje incluyente y no sexista en la Función Pública.

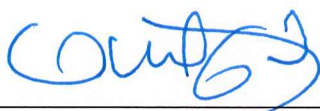
El presente documento fue autorizado por el Comité de Mejora Regulatoria Interna en la tercera sesión extraordinaria de fecha 31/10/2022.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>Autorización</b>		<b>HOJA:</b> 1 <b>DE:</b> 2

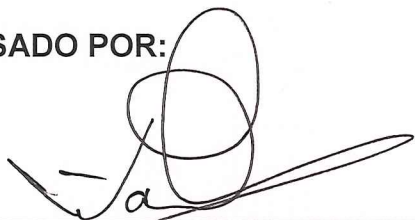
## AUTORIZACIÓN

### ELABORADO POR:



Dr. Armando Gamboa Domínguez.  
Jefe del Departamento de Patología.

### REVISADO POR:



Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona.  
Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico.



### REVISIÓN METODOLÓGICA:



Mtro. Miguel Angel Lima Alarcón.  
Jefe del Departamento de Organización y Modernización Administrativa.

### CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022

	<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS</b>		<b>CÓDIGO:</b> M.T./ 0.2.4.2
	<b>Departamento de Patología</b>		<b>REV:</b> 01
	<b>Autorización</b>		<b>HOJA:</b> 2 <b>DE:</b> 2

**REVISIÓN METODOLÓGICA:**




\_\_\_\_\_  
C. Verónica Elena Cervantes Navarro.  
Analista Especializado de Organización y Modernización.

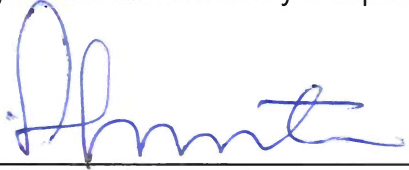


\_\_\_\_\_  
L. A. Eduardo Hernández Avila.  
Asesor Externo.

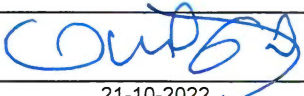
**AUTORIZADO POR:**



\_\_\_\_\_  
Dr. Raúl Rivera Moscoso.  
Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina.



\_\_\_\_\_  
Dr. José Sifuentes Osorio.  
Director General.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Armando Gamboa Domínguez	Dr. Miguel Ángel Tanimoto Licona	Dr. Raúl Rivera Moscoso
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Patología	Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico	Encargado de la Atención y Despacho de los Asuntos de la Dirección de Medicina
Firma:			
Fecha:	21-10-2022	21-10-2022	21-10-2022