

Técnico Superior
Módulo Transversal

Técnicas generales de laboratorio

Director y Coordinador
Julián Sanz Ortega

ARÁN

Autores

Director y coordinador

Julián Sanz Ortega

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo Especialista de Área del Hospital Universitario San Carlos y de la Universidad Complutense de Madrid, desde 1996.

Desde el año 2000 es Director Científico del Biobanco del Hospital Clínico San Carlos y del Biobanco de la RTICC de ISCIII. Responsable de Patología Molecular y Dianas Terapéuticas. Nombrado Presidente Territorial de Madrid de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) en el año 2012. Autor de 66 artículos científicos: publicaciones internacionales en revistas indexadas y nacionales.

Premio Extraordinario de la Universidad Complutense de Madrid y Premio de la Fundación San Nicolás de la Real Academia Nacional de Medicina en 1994.

Autores

Pilar Barbero del Palacio

Enfermera y Técnico Superior de Prevención de Riesgos Laborales. Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid

Cristina Fernández Pérez

Médico. Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid

Ricardo García Martínez

Técnico de Anatomía Patológica. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid

Rocío Mata Robledo

Administrativo. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid

Silvia Oconnor Pérez

Doctora en Medicina del Trabajo. Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid

Julián Sanz Ortega

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo especialista de Área. Hospital Clínico Universitario San Carlos y Universidad Complutense de Madrid. Madrid

Patricia Saperas López

Técnico en Anatomía Patológica. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid

Paz Uribe Llopis

Enfermera y Técnico Superior de Prevención de Riesgos Laborales. Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid

Índice

Capítulo 1

Clasificación de materiales, equipos básicos y reactivos	15
1. Tipos de materiales y utilización.....	16
2. Limpieza, desinfección y esterilización del material del laboratorio	23
3. El agua del laboratorio.....	24
4. Reactivos químicos en el laboratorio clínico y de anatomía patológica.....	25
5. Equipos básicos utilizados en el laboratorio clínico y de anatomía patológica ...	27
6. Uso eficiente de los recursos	33
7. Procedimientos normalizados de trabajo	34

Capítulo 2

Aplicación de protocolos de seguridad y prevención de riesgos en el laboratorio	41
1. Agentes químicos, radiactivos y biológicos. Almacenaje. Sustancias químicas incompatibles.....	42
2. Prevención del riesgo del trabajo con productos químicos, radiactivos y biológicos	46
3. Prevención de riesgos relativos a equipos de laboratorio	50
4. Gestión de residuos	51
5. Determinación de las medidas de prevención y protección personal.....	59

6. Protocolo de actuación en caso de emergencia química o biológica. Plan de emergencia.....	60
7. Organización del trabajo preventivo. Rutinas básicas	64
8. Documentación: recogida, elaboración y archivo.....	65

Capítulo 3

Realización de disoluciones y diluciones	73
1. Medidas de masa mediante balanza de precisión	74
2. Medidas de volumen mediante material volumétrico.....	76
3. Cálculo y preparación de disoluciones	77
4. Cálculo y preparación de diluciones: concepto y formas de expresión. Preparación de diluciones seriadas y no seriadas	80
5. Métodos electroquímicos: el pH-metro	80
6. Valoraciones ácido-base	82
7. Preparación de soluciones amortiguadoras	82

Capítulo 4

Aplicación de procedimientos de separación de sustancias	89
1. Métodos básicos de separación. Filtración, decantación y centrifugación	90
2. Métodos de separación electroforética	91
3. Interpretación de resultados de análisis instrumental.....	94

Capítulo 5

Realización de la valoración técnica de la coherencia y la fiabilidad de los resultados	101
1. Conceptos estadísticos básicos: media, desviación estándar, coeficiente de variación y regresión	102
2. Control de calidad en la fase analítica	103
3. Serie analítica: tipos de error.....	105
4. Representaciones gráficas de control de calidad.....	106
5. Criterios de aceptación o rechazo	109

Capítulo 6

Realización de técnicas de microscopia y digitalización de imágenes	119
1. Componentes básicos de un microscopio óptico y un equipo fotográfico	120
2. Técnicas de microscopia óptica de luz transmitida. Fundamento y aplicación de cada una de ellas.....	122
3. Técnicas de microscopia de fluorescencia. Aplicaciones y ventajas de cada técnica.....	123
4. Técnicas de microscopia electrónica	123
5. Técnicas de microscopia de barrido de sonda	124
6. Técnicas fotográficas macroscópicas, microscópicas y ultramicroscópicas ...	125
7. Sistemas de captación y archivo de imágenes digitales	127

8. Telepatología estática.....	129
9. Estándares para la transferencia de imágenes e información asociada.....	129

Capítulo 7

Aplicación de sistemas de gestión de la calidad en el laboratorio	137
1. Calidad, sistema de gestión de calidad y aseguramiento de la calidad: fases y circuitos	138
2. Normas de calidad en el laboratorio.....	139
3. Documentos de la calidad.....	141
4. Certificación y acreditación del laboratorio.....	141
5. Auditoría y evaluación de la calidad.....	142
Soluciones “Evalúate tú mismo”	147

capítulo

I

CLASIFICACIÓN DE MATERIALES, EQUIPOS BÁSICOS Y REACTIVOS

Ricardo García Martínez

Sumario

1. Tipos de materiales y utilización
2. Limpieza, desinfección y esterilización del material del laboratorio
3. El agua del laboratorio
4. Reactivos químicos en el laboratorio clínico y de anatomía patológica
5. Equipos básicos utilizados en el laboratorio clínico y de anatomía patológica
6. Uso eficiente de los recursos
7. Procedimientos normalizados de trabajo

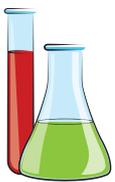
Hay distintos **métodos para separar sustancias** que son distintas, tanto física como químicamente. En este capítulo se analizan los métodos básicos más habituales. La **separación electroforética** es un método de separación que ha adquirido gran importancia para separar ácidos nucleicos de gran importancia en laboratorios de genética y moleculares. La **electroforesis** se analizará con mucho mayor detalle en el manual *Biología molecular y citogenética*. Por último, veremos cómo se deben **interpretar los resultados** de estas técnicas de una manera adecuada.

I. MÉTODOS BÁSICOS DE SEPARACIÓN. FILTRACIÓN, DECANTACIÓN Y CENTRIFUGACIÓN

Usamos los métodos de separación para transformar mezclas en productos más sencillos que por separado son totalmente distintos, tanto química como físicamente.

Los métodos básicos para separar sustancias son:

- › **Destilación:** separamos con vaporización y condensación los distintos componentes que se encuentran disueltos en un líquido usando sus diferentes puntos de ebullición.
- › **Centrifugación:** con este método separamos líquidos y sólidos que tienen distinta densidad utilizando una fuerza centrífuga que proporciona el aparato, también llamado **centrífuga**, mediante una rotación que hace que las partículas más densas se depositen en el fondo del recipiente.
- › **Cromatografía:** este método consiste en separar sustancias más complejas para poder identificar todos y cada uno de los componentes de una mezcla. La cromatografía se puede llevar a cabo tanto en líquidos como en gases.
- › **Cristalización:** la cristalización permite que cualquier sustancia de una mezcla en cualquier estado forme enlaces entre ella hasta formar un cristal y poder purificar así una sustancia sólida.
- › **Decantación:** con este método separamos una sustancia más densa de otra menos densa, ya que la menos densa ocupará la parte superior del recipiente.



Usamos los métodos de separación para transformar mezclas en productos más sencillos que por separado son totalmente distintos, tanto química como físicamente.



Figura 15. Equipos de laboratorio. A. Procesador tisular. B. Microtomo. C. Baño de flotación. D. Estación de parafina. E. Estufa.

► **Normas generales de almacenamiento productos químicos.** Los principios básicos para conseguir un almacenamiento adecuado y seguro de los reactivos en los laboratorios en general son los siguientes:

- Reducir las existencias al mínimo.
- Mantener en todo momento correctamente etiquetados los reactivos.
- Establecer separaciones debido a la naturaleza y propiedades de las sustancias.
- Aislar o confinar ciertos productos.
- Disponer de instalaciones adecuadas.



RECUERDA QUE
Debe almacenar correctamente los productos químicos incompatibles.

INFORMACIÓN IMPORTANTE

Hay que evitar almacenar juntos productos químicos incompatibles (Figura 4).



Almacenamiento de productos incompatibles						
	Explosivos	Comburentes	Inflamables	Tóxicos	Corrosivos	Nocivos
Explosivos	Sí	No	No	No	No	No
Comburentes	No	Sí	No	No	No	(2)
Inflamables	No	No	Sí	No	(1)	Sí
Tóxicos	No	No	No	Sí	Sí	Sí
Corrosivos	No	No	(1)	Sí	Sí	Sí
Nocivos	No	(2)	Sí	Sí	Sí	Sí

(1) Se podrán almacenar conjuntamente si los productos corrosivos no están envasados en recipientes frágiles.
 (2) Se podrán almacenar juntos si se adoptan ciertas medidas de prevención. Son criterios generales.

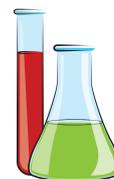
Figura 4. Productos químicos incompatibles.

2.4. Medidas preventivas de riesgo radiactivo

- Todo el personal que trabaja con este riesgo debe disponer de una completa información acerca de la correcta manipulación y sistemas de eliminación de radioisótopos.
- Se debe trabajar en cabina de seguridad con los productos que lo necesiten.

5. DETERMINACIÓN DE LAS MEDIDAS DE PREVENCIÓN Y PROTECCIÓN PERSONAL

Las medidas de protección del personal y prevención de accidentes deben ser una parte fundamental de la formación de todo el personal que debe actualizarse con la llegada de nuevos equipos y deben estar bien visibles en el laboratorio en la señalización (Figura 6) y en los **procedimientos normalizados de trabajo (PNT)**.



Los EPI son equipos individuales ya que solo son usados por la persona que realiza el trabajo.

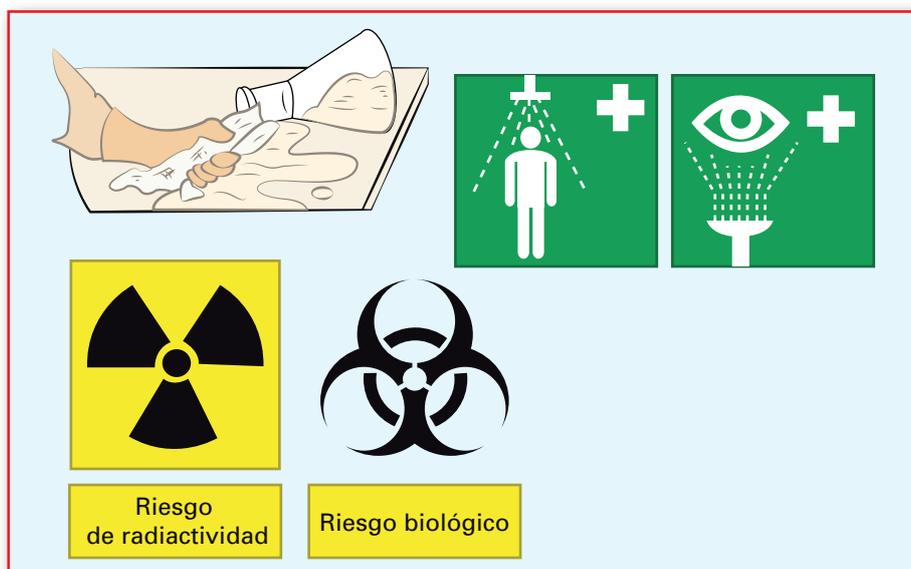


Figura 6. Señalización.

5.1. Equipos de protección individual (EPI)

Deberán utilizarse cuando existan riesgos para la seguridad o salud de los trabajadores, que no hayan podido evitarse o limitarse por medios técnicos de protección colectiva (Figura 7).

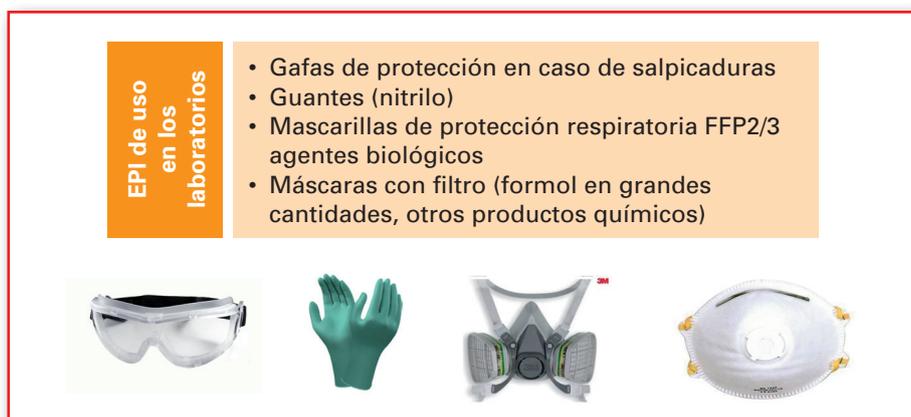


Figura 7. EPI de uso en los laboratorios.



Figura 1. Balanza analítica o de precisión.



RECUERDA QUE

La balanza debe estar situada en un sitio sin vibraciones, y estar nivelada y calibrada.

La balanza se debe colocar en un **lugar sin vibraciones** y perfectamente **nivelada** y **calibrada**; se deben evitar las corrientes de aire y la humedad.

Existen varios **métodos de pesada**: la **directa**, en la que se tara el recipiente o el pesasustancias, y **por diferencia**, en el que se pesa el pesasustancias con la sustancia, se saca esta y se vuelve a pesar el pesasustancias con lo que pudiera quedar de sustancia: la diferencia es el peso de la sustancia sacada.



AMPLÍA TUS CONOCIMIENTOS

En las balanzas de dos platillos existen tres métodos de pesada: la **simple** (en un platillo la sustancia y en el otro las pesas), **doble pesada de Gauss** (primero se pesa en un platillo y luego en el otro, al final se calcula la media aritmética de las dos pesadas) y **doble pesada de Borda o de sustitución** (se sustituye el cuerpo a pesar con pesas).

Existe una relación entre normalidad y molaridad, la cual se expresa por la fórmula siguiente:

$$N = M \times \text{Valencia}$$

- **Molalidad:** indica el número de moles de soluto disuelto en cada kilogramo de disolvente, se expresa con la letra *m*.

$$m = n.^{\circ} \text{ moles/kg de disolvente}$$

Preparación de una disolución a partir de un sólido

Se pone en la balanza un vaso de precipitados de tamaño y volumen adecuados, se tara y se añade la sustancia hasta alcanzar el peso deseado.

Se disuelve el sólido en el vaso utilizando la mínima cantidad de disolvente para evitar salpicaduras durante el proceso de agitación.

Finalmente se diluye con el disolvente empleado hasta el volumen requerido y se agita la disolución.



<https://www.youtube.com/watch?v=ev3wTXmL-I8>

Preparación de una disolución a partir de un líquido

Se echa en una probeta limpia el volumen deseado.

Se trasvasa de la probeta a un vaso de precipitados limpio y seco de volumen adecuado.

Finalmente se diluye con el disolvente hasta el volumen requerido y se agita la disolución.



<http://politube.upv.es/play.php?vid=2945>

INFORMACIÓN IMPORTANTE

Nunca se debe devolver el exceso de reactivo al bote original para evitar contaminarlo y tampoco se debe sacar el recipiente de pesada de la balanza, porque se desestabiliza y se puede cometer un error en la cantidad medida.



4. CÁLCULO Y PREPARACIÓN DE DILUCIONES: CONCEPTO Y FORMAS DE EXPRESIÓN. PREPARACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS Y NO SERIADAS

La **dilución** es la reducción de la concentración de una sustancia química en una disolución. Consiste en rebajar la cantidad de soluto por unidad de volumen de disolución. Se logra adicionando más diluyente a la misma cantidad de soluto.

La dilución realizada se suele señalar indicando la cantidad de sustancia que diluimos y la cantidad final obtenida. Por ejemplo, si diluimos una muestra a 1/5, entonces tomaremos una parte de muestra y la diluiremos con cuatro partes de diluyente.

Conociendo la concentración y el volumen inicial, así como el volumen final tras la dilución, sabremos la concentración final con la fórmula:

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

En los laboratorios es muy común realizar **diluciones seriadas**, a partir de la disolución más concentrada.

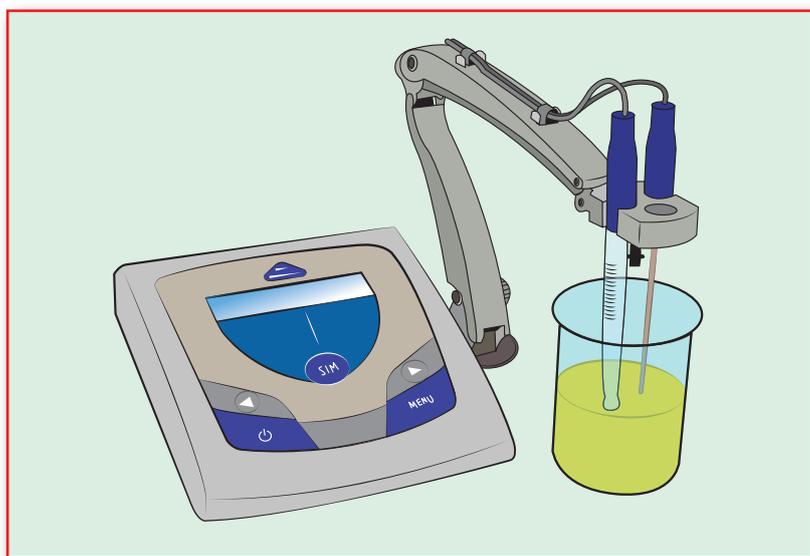


Figura 3. pH-metro.

5. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS: EL pH-METRO

El pH-metro (Figura 3) es un sensor utilizado en el **método electroquímico** para medir el pH de una disolución.

El pH es una medida utilizada para evaluar la **acidez o alcalinidad** de una sustancia por lo general en su estado líquido (también se puede utilizar para gases).

- › El número de controles a utilizar en cada serie y si estos controles serán múltiples materiales (diferentes niveles, etc.) o el mismo material.
- › El número de datos que se va a considerar y su procedencia.
- › Un solo material o múltiples materiales.
- › Datos de una serie o múltiples series.
- › La forma de aplicar la regla, por ejemplo la regla podría ser interpretada con resultados totalmente distintos utilizando enunciados como:
 - › Rechazar si “2” valores consecutivos de los controles se encuentran fuera del rango establecido por su valor medio $\pm 2,5$ desviaciones típicas por la parte superior o inferior del rango indistintamente.

Medida (ejemplo)	Características generales
Media $n = 5$ 3 2 6 3 5 Media = $3+2+6+3+5 / 5 = 3,8$	– Centro de gravedad de la distribución – Se afecta por valores extremos – No debe usarse cuando la variable no sigue una distribución normal
Mediana $n = 5$ 2 3 3 5 6 Mediana es el valor en 3ª posición = 3	– El valor que reparte los valores de la distribución, ordenados de menor a mayor, en dos mitades exactas – No se afecta por valores extremos – Indicada para variables de distribución “no normal”
Moda $n = 5$ 3 2 6 3 5 El valor más frecuente es el 3	– El valor más frecuente de la distribución – No se afecta por valores extremos – Indicada cuando la muestra es grande y la variable tiene poca amplitud – Puede haber una, ninguna o varias modas
Cuartiles $n = 5$ 2 3 3 5 6	– Tres valores que dividen la distribución en cuatro partes iguales – $Q_i = (i (n + 1)) / 4$ Ej: $Q_1 = (1(5+1)) / 4 =$ valor que ocupa la posición 1,5 = 2,5
Variancia $n = 5$ 3 2 6 3 5 $s^2 = ((3-3)^2 + (2-3)^2 \dots) / 4 = 2,7$	– Media de los cuadrados de las desviaciones a la media – Difícil interpretación por dar unidades al cuadrado $s^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}$
Desviación estándar o típica $\sqrt{s^2} = s = \sqrt{2,7} = 1,64$	– Raíz cuadrada positiva de la varianza – Medida de dispersión indicada cuando la variable es normal: ξ (DE)
Rango $n = 5$ 2 3 3 5 6 Rango = $6 - 2 = 4$	– Diferencia entre el valor máximo y el mínimo – Desventaja: no tiene en cuenta cómo se distribuyen los datos y aumenta si se incrementa la muestra
Rango intercuartílico $Q_1 = 2,5$ $Q_3 = 5,5$ $Q_3 - Q_1 = 5,5 - 2,5 = 3$ “En un rango de 3 unidades se encuentra el 50 % de la muestra”	– Diferencia entre el tercer y el primer cuartil – Define el rango de unidades en que se encuentra el 50 % central de las observaciones (datos ordenados de menor a mayor) – Medida de dispersión indicada cuando la variable no sigue una distribución normal: <i>mediana (RIQ)</i>
Coficiente de variación $CV = (1,64 / 3,8)100 = 43 \%$	– Medida de dispersión relativa que permite comparar dos o más grupos – Se expresa como porcentaje $CV = (s / \xi) \times 100$ – Permite comparar diferentes unidades de medida (p. ej., altura vs. peso)



Figura 2. Tarjeta con banda magnética.

o controlado (Figura 2). Indicadores visibles de los riesgos en cada zona.

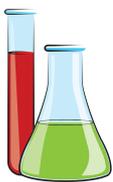
- 】 El **personal está capacitado** para llevar a cabo los procedimientos.
- 】 Las normas y procedimientos están documentados en los **procedimientos normalizados de trabajo (PNT)**, que son aprobados por el personal apropiado y modificados o actualizados solo bajo estrictas normas de control de documentos.
- 】 Se mantienen **registros** sobre la compra de nuevo equipamiento, actividades de mantenimiento y reparación de los equipos. Estos registros incluyen: nombre del equipo, modelo, fabricante, información de contacto, número de serie, fecha de adquisición, de mantenimientos y de reparaciones, etc.

- 】 Se registran los materiales críticos y reactivos que se utilizan: nombre del producto, casa comercial, fecha de compra y de caducidad, y hoja de seguridad.

- 】 Informes de toda actividad no regulada en PNT.

Además de esas normas de calidad generales, la calidad debe contemplar y evaluar normas específicas para:

- 】 Normas de seguridad en el transporte de muestras.
- 】 Normas de tratamiento de residuos.
- 】 Listado de medidas preventivas.
- 】 Trazabilidad de las muestras y de los datos.



La norma más empleada es la norma ISO 9001 que establece los requisitos que ha de cumplir un sistema de gestión de la calidad.

Existen documentos, ya establecidos a nivel internacional, que establecen y detallan de manera precisa estos aspectos. La norma más empleada es la **norma ISO 9001** que establece los requisitos que ha de cumplir un sistema de gestión de la calidad, y su control se realiza mediante auditorías de certificación realizadas por empresas privadas y en libre competencia. Esta certificación indica que el laboratorio tiene implantado un **sistema de gestión de la calidad (SGC)** que cumple con los requisitos de la norma UNE-EN ISO 9001, pero siempre se debe tener presente que esta garantía no incluye a la competencia técnica

RESUMEN

- ✓ En este capítulo hemos visto que hay **distintas balanzas** para pesar sustancias, los **sistemas de pipeteado** y las técnicas para realizar **medidas volumétricas**.
- ✓ Es importante conocer las distintas **fórmulas** para realizar disoluciones y diluciones, o soluciones amortiguadoras, así como las medidas para **ajustar el pH**.
- ✓ También se ha explicado que es muy importante el **calibrado** de los instrumentos y las tareas de mantenimiento.

G L O S A R I O

Dilución: reducción de la concentración de una sustancia química en una disolución.

Disolución: mezcla homogénea de sustancias en iguales o distintos estados de agregación.

Masa: cantidad de materia de un objeto, la cual es invariable.

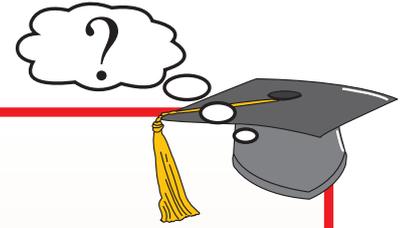
Molalidad: número de moles de soluto disuelto en cada kilogramo de disolvente.

Molaridad: número de moles de soluto disueltos por cada litro de disolución.

Normalidad: número de equivalentes-gramo de soluto existentes en un litro de disolución.

Peso: valor de la fuerza con la que un objeto es atraído hacia el centro de la Tierra; según la altitud y la latitud geográfica el peso variará.

Soluciones reguladoras o amortiguadoras: soluciones capaces de mantener la acidez o basicidad de un sistema dentro de un intervalo reducido de pH.



EJERCICIOS

- › E1. ¿Qué es el material fungible?, ¿y el material inventariable? Indica ejemplos de cada uno de ellos.
- › E2. ¿Qué es el error de paralelaje?
- › E3. ¿Qué es la limpieza?
- › E4. ¿Y la esterilización?
- › E5. ¿Qué mide la pureza de un reactivo?
- › E6. ¿Qué es la destilación?
- › E7. ¿Qué son los procedimientos normalizados de trabajo?
- › E8. Haz un listado de 20 reactivos químicos de laboratorio.
- › E9. Haz un listado de 15 equipos de laboratorio.
- › E10. Identifica los equipos en la siguiente figura:



EVALÚATE TÚ MISMO



1. Una hoja de reclamaciones es un documento de calidad de tipo:

- a) General.
- b) Específico.
- c) Plan de calidad.
- d) Control de calidad.

2. La norma de calidad para la acreditación de laboratorios de uso clínico más habitual es:

- a) ISO 15189.
- b) ISO 9001.
- c) ISO 14613.
- d) ISO 2014.

3. Las normas de calidad deben incluir:

- a) Normas de transporte de residuos.
- b) Medidas preventivas.
- c) Registro de actividades de formación del personal.
- d) Todas las respuestas anteriores son correctas.

4. La Agencia Nacional de Acreditación se llama:

- a) CNIO.
- b) ISCIII.
- c) FIS.
- d) ENAC.

5. La "validación" de un método analítico consiste en:

- a) Analizar un grupo de muestras con características conocidas con el nuevo método.
- b) Analizar una muestra con un método conocido.
- c) Seguir todos los pasos del procedimiento normalizado de trabajo.
- d) Que a una segunda persona le salga el mismo resultado.

6. Las normas de calidad incluyen:

- a) Los procedimientos normalizados de trabajo (PNT).
- b) Registros sobre la compra de nuevo equipamiento, actividades de mantenimiento y reparación de los equipos.
- c) Registro de materiales críticos y reactivos que se utilizan: casa comercial, fecha de compra y de caducidad, y hoja de seguridad.
- d) Todas las respuestas anteriores son correctas.



SOLUCIONES

EVALÚATE TÚ MISMO



http://www.aranformacion.es/images/Archivos/IMG_L_71_C_1.PDF