



MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



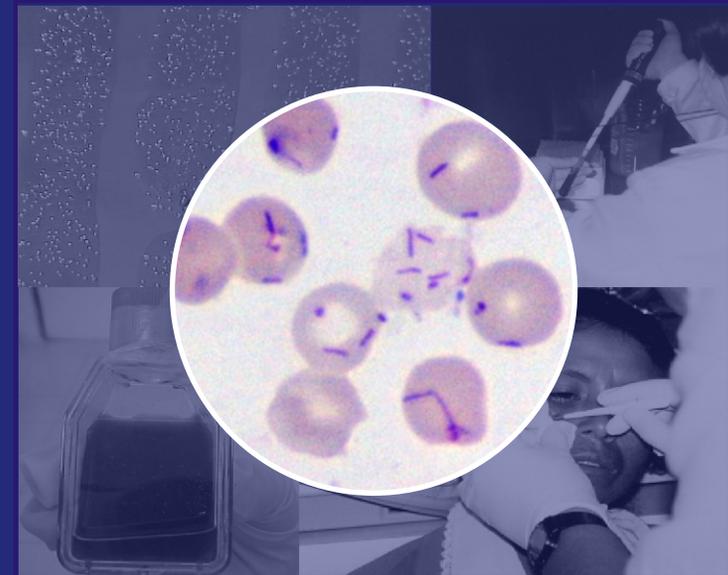
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA BARTONELOSIS HUMANA O ENFERMEDAD DE CARRIÓN

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA BARTONELOSIS HUMANA O ENFERMEDAD DE CARRIÓN



Instituto Nacional de Salud
Calle Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú
Teléfono: (0511) 471-9920 Fax: (0511) 471-0779
Correo electrónico: revmedex@ins.gob.pe
Página web: www.ins.gob.pe





**MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD**



DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA BARTONELOSIS HUMANA O ENFERMEDAD DE CARRIÓN

ELABORACIÓN:

Bióloga Gladis Ventura Egúsquiza

Biólogo Carlos P. Padilla Rojas

Centro Nacional de Salud Pública
Instituto Nacional de Salud

Lima, 2006

Catalogación hecha por el Centro de Información y Documentación
del Instituto Nacional de Salud (INS)

Ventura Egúsquiza, Gladis; Padilla Rojas, Carlos P.
Diagnóstico bacteriológico de la Bartonelosis humana o enfermedad de
Carrión / Elaborado por Gladis Ventura Egúsquiza y Carlos P. Padilla Rojas.
— Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2006.
52 p. : 14.8 x 21 cm.

1. INFECCIONES POR BARTONELLA / diagnóstico 2. PERÚ

- I. Ventura Egúsquiza, Gladis
- II. Padilla Rojas, Carlos P
- III. Instituto Nacional de Salud (Perú)
- IV. Perú. Ministerio de Salud

ISBN 9972-857-57-3

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N°: 2006-8865

© Ministerio de Salud, 2006

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

Teléfono: (511) 431-0410

© Instituto Nacional de Salud, 2006

Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima-Perú

Teléfono: (511) 471-9920 Fax: (511) 471-0979

Correo electrónico: revmedex@ins.gob.pe

Página web: www.ins.gob.pe

Publicación aprobada con R.J. N°

Portada: Frotis sanguíneo con 100% de hematíes infectados. Giemsa X 1000. INS

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

CONTENIDO

RESOLUCIÓN JEFATURAL	5
INTRODUCCIÓN	7
SECCIÓN 1: BIOSEGURIDAD	9
1.1. AGENTE INFECCIOSO	10
1.2. PELIGROS PARA LA SALUD	10
1.3. EPIDEMIOLOGÍA	10
1.4. DISEMINACIÓN	10
1.5. VIABILIDAD	10
1.6. DATOS GENERALES	11
1.7. RIESGOS EN EL LABORATORIO	11
1.8. PRECAUCIONES	11
1.9. MANEJO DE MATERIAL EN CASO DE ACCIDENTES	12
SECCIÓN 2: PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE MUESTRA	13
2.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	13
2.1.1. Objetivo	
2.1.2. Tipos de muestra	
2.2. CONDICIONES GENERALES	13
2.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE	14
2.3.1. Errores comunes al preparar los frotis sanguíneos	
2.3.2. Riesgos relacionados con la punción venosa	
2.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO (BIOPSIAS) DE ERUPCIONES O VERRUGAS	17
2.4.1. Objetivo	
2.4.2. Materiales para la obtención de biopsias	
2.4.3. Procedimientos	
SECCIÓN 3: CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS Y CULTIVOS	18
3.1. OBJETIVO	18
3.2. CONDICIONES ESPECÍFICAS	18
3.2.1. Muestras de sangre y biopsias para pruebas moleculares	
3.2.2. Remisión de cultivos	
3.2.3. Información básica que debe acompañar a las muestras	
SECCIÓN 4: DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO	22
4.1. DIAGNÓSTICO DIRECTO MEDIANTE COLORACIÓN DEL FROTIS SANGUÍNEO CON COLORANTE GIEMSA	23
4.1.1. Objetivo	
4.1.2. Materiales para coloración	
4.2. PROCEDIMIENTOS DE LA COLORACIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA	24
4.2.1. Coloración sobre varilla de vidrio	
4.2.2. Coloración mediante la inversión de la lámina	

4.3 OBSERVACIÓN Y LECTURA MICROSCÓPICA DE LOS FROTIS SANGUÍNEOS	28
4.4. ERRORES DURANTE LA LECTURA DE LÁMINAS	32
4.5. DIAGNÓSTICO MEDIANTE CULTIVOS	33
4.5.1. Condición específica de la muestra	
4.5.2. Materiales para el cultivo	
4.5.3. Preparación de la muestra sanguínea	
4.5.4. Procedimiento para el cultivo en placas	
4.5.5. Procedimiento para el cultivo en medio bifásico	
4.5.6. Lectura de cultivos	
4.5.7. Subcultivos	
4.5.8. Identificación de <i>Bartonella bacilliformis</i>	
4.6. CRIO CONSERVACION DE LAS CEPAS	42
SECCIÓN 5: BIBLIOGRAFÍA	43
 ANEXOS	
ANEXO 1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y COLORANTE GIEMSA	45
ANEXO 2 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO MONOFÁSICO	47
ANEXO 3 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO BIFÁSICO	48
ANEXO 4 PREPARACIÓN DEL MEDIO GEL DE FASES	50
ANEXO 5 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CRIOCONSERVACIÓN DE CEPAS	51

SECTOR SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



Nº. 580-2006-J-OPD/HWS

RESOLUCION JEFATURAL

Lima, 22 de Setiembre del 2006

Visto el Informe Nº 102-2006-DG-OGIS/INS del 21 de setiembre de 2006, del Director General de la Oficina General de Información y Sistemas del Instituto Nacional de Salud;

CONSIDERANDO:

Que, mediante Decreto Supremo Nº 050-2006-PCM publicado con fecha 10 de agosto del 2006 se estableció la prohibición para todas las entidades del Sector Público comprendidas en los anexos de la Ley Nº 28652, Ley de Presupuesto del Sector Público para el Año Fiscal 2006, para la impresión, fotocopiado y publicaciones a color a fin de efectuar comunicaciones y/o documentos de todo tipo, debiendo éstos realizarse en blanco y negro e indicando que el Titular de la Entidad o quien éste delegue, podrá autorizar, excepcionalmente, impresos a color para casos debidamente justificados

Que, del documento de Visto se desprende la necesidad de exoneración de la norma señalada en el párrafo precedente para autorizar la publicación del documento titulado: **"Diagnóstico Bacteriológico de la Bartonelosis Humana o Enfermedad de Carrion"**, acordada por el Comité Editor del Instituto Nacional de Salud en su Sesión 31-2005, de fecha 14 de setiembre de 2005, el mismo que no se encuentra comprendido en los alcances de la Resolución Jefatural Nº 571-2006-J-OPD/INS de fecha 21 de setiembre del 2006, que autoriza excepcionalmente al Instituto Nacional de Salud la impresión a color de una serie de documentos, informando que **"la presencia de imágenes clínicas, microbiológicas y otras donde el color permite diferenciar claramente las características inherentes a las mismas"**;

Que, el artículo 5º del D.S. Nº 001-2003-SA, Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Salud señala que la institución tiene como misión promover, desarrollar y difundir la investigación científica y la transferencia de tecnología en el campo de la salud pública;

Que, en este sentido se hace necesario proteger la difusión de la investigación científica realizada por el Instituto Nacional de Salud de acuerdo a sus fines institucionales, garantizando el resultado de los diagnósticos elaborados, por lo que es importante brindar las facilidades del caso, como es, autorizar la publicación de páginas a color en



el documento solicitado, siguiendo las formalidades señaladas en el Decreto Supremo N° 050-2006-PCM;

Estando a lo propuesto por la Oficina General de Información y Sistemas; y

En uso de las atribuciones establecidas en el inciso h) del artículo 12° del Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Salud, aprobado por Decreto Supremo N° 001-2003-SA;



SE RESUELVE:

Artículo 1°- AUTORIZAR EXCEPCIONALMENTE, en el Instituto Nacional de Salud, por las razones expuestas en la parte considerativa de la presente Resolución, la impresión de páginas a color en la siguiente publicación:

Título de la publicación	Elaborado por:
<i>"Diagnóstico Bacteriológico de la Bartonelosis Humana o Enfermedad de Carrion"</i>	<ul style="list-style-type: none">• Blga. Gladys Ventura Gusquiza• Blgo. Carlos P. Padilla Rojas



Artículo 2°- DISTRIBUIR, copia de la presente Resolución a las instancias de la Institución que correspondan.

Regístrese y comuníquese,



.....
Dra. Patricia Jannet García Funegra
Jefa
Instituto Nacional de Salud

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Carrión o Bartonelosis humana es una enfermedad infecciosa cuyo agente etiológico es la *Bartonella bacilliformis*, que es transmitida por la picadura de mosquitos del género *Lutzomyia*.

La enfermedad presenta una primera fase hemática, anémica o febril, con una letalidad alta cuando el tratamiento no es administrado oportunamente; la segunda fase es la histioide o verrucosa que aparece varios meses después. Entre ambas fases, se presenta una fase intercalar asintomática que puede durar de una a tres semanas o varios meses. Esta enfermedad es endémica en algunas regiones del Perú, Ecuador y Colombia.

Existen indicios de que la Bartonelosis era conocida por culturas precolombinas de Perú y Ecuador, por la presencia de lesiones que semejan a la fase verrucosa de la enfermedad, en huacos de cerámica antropomórfica y en monolitos de la cultura preinca Huaylas encontrados en el departamento de Ancash. Durante la conquista, los españoles sufrieron una enfermedad con la característica de verruga sangrante y mortal, siendo diezmos por ella. Durante la República, se registró una grave epidemia mientras se construía el ferrocarril central.

Existen zonas endémicas en Ancash, Cusco, Cajamarca, Amazonas, Lima, Piura, La Libertad, Huancavelica, Huánuco, Ayacucho y Junín. Durante el Fenómeno el Niño de los años 1997-1998, se produjeron cambios climatológicos que incrementaron la densidad del vector en varios valles interandinos y se presentaron rebrotes después de muchos años en los valles de Cañete-Yauyos en Lima, Pataz en Trujillo, Quillabamba en Cusco y en zonas donde no había reportes anteriores de enfermedad como el Valle del Urubamba en el Cusco.

El año 2002 se presentó otro brote, en una zona no endémica, en la localidad de Cañaris, departamento de Lambayeque. Durante el 2004 se han presentado casos no autóctonos en Madre de Dios; y entre marzo y abril del 2005, se presentó un brote después de muchos años en Huarochirí – Lima Este; y recientemente en setiembre de 2006 se presentó un caso fatal en una persona que visitó la cuenca de Santa Eulalia

La localización, diagnóstico, confirmación y tratamiento de los casos agudos de esta enfermedad, se constituyen en actividades fundamentales de un sistema de vigilancia. En este sentido, siendo el diagnóstico

bacteriológico necesario para confirmar la sospecha clínica, se requiere la estandarización y definirse las pautas para la correcta obtención de muestras de sangre y realización del frotis sanguíneo, cultivo, aislamiento e identificación de la *Bartonella bacilliformis*.

El Instituto Nacional de Salud pone a disposición este manual de procedimientos orientado al diagnóstico de la enfermedad de Carrion con el objeto de fortalecer la capacidad diagnóstica de los establecimientos de salud.

SECCIÓN 1

BIOSEGURIDAD

1.1. AGENTE INFECCIOSO

NOMBRE: *Bartonella bacilliformis*

CLASIFICACIÓN

PHYLUM BXII.	Proteo bacteria
CLASE I.	Alpha proteo bacteria
ORDEN VI.	Rhizobiales
FAMILIA II	Bartonellaceae
GENERO	<i>Bartonella</i>
ESPECIE	<i>bacilliformis</i>

SINÓNIMOS: Bartonelosis humana, fiebre de La Oroya, enfermedad de Carrión, verruga peruana, anemia grave de Carrión

CARACTERÍSTICAS: Bacilos Gram negativos; móviles con flagelos polares.



Figura 1. *Bartonella bacilliformis* con flagelos unipolares. Microscopía electrónica. Cortesía: Dr. Luis Solano. Instituto de Medicina Tropical «Daniel Alcides Carrión», Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

1.2. PELIGROS PARA LA SALUD

Patogenicidad: Caracterizada por dos formas clínicas diferentes: (a) la anemia febril (fiebre de la Oroya) manifestada por fiebre irregular, anemia grave, linfadenopatía generalizada y delirio; (b) la erupción dérmica (verruga peruana) caracterizada por nódulos pequeños tipo hemangioma, acompañada por dolores musculares y articulares, puede ser precedida por la fiebre de la Oroya.

1.3. EPIDEMIOLOGÍA

Limitada a los valles interandinos de Perú, Ecuador y el sudoeste de Colombia donde el vector está presente.

RANGO DE HOSPEDEROS: Humanos.

DOSIS INFECTANTE: No conocida.

MODO DE TRANSMISIÓN: Por la picadura de mosquitos del género *Lutzomyia*, o por transfusión sanguínea.

PERÍODO DE INCUBACIÓN: Usualmente de 16 a 22 días, ocasionalmente de tres a cuatro meses.

COMUNICABILIDAD: No se ha documentado transmisión de persona a persona, la sangre del paciente permanece infecciosa para el mosquito por varios meses después de la enfermedad.

1.4. DISEMINACIÓN

RESERVORIO: Humanos

ZOONOSIS: No

VECTORES: Mosquitos del género *Lutzomyia*.

1.5. VIABILIDAD

SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS: Susceptible a penicilina, estreptomycin, ciprofloxacino, cloramfenicol, tetraciclina, azitromicina.

RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS: Ácido nalidíxico, se ha encontrado resistencia in vitro a penicilina, ampicilina, tetraciclina y vancomicina.

SUSCEPTIBILIDAD A LOS DESINFECTANTES: Susceptible a los desinfectantes comunes como el etanol 70%, el hipoclorito de sodio 1%, y el formaldehído 2%.

INACTIVACION FÍSICA: Sensible al calor.

SOBREVIDA FUERA DEL HUESPED: Puede sobrevivir en agua de caño a temperatura ambiente hasta por siete días.

1.6. DATOS GENERALES

VIGILANCIA: Buscar síntomas, demostrar la presencia del microorganismo en sangre o en las lesiones de la piel.

PRIMEROS AUXILIOS / TRATAMIENTO: Terapia antibiótica

INMUNIZACIÓN: Ninguna.

PROFILAXIS: Ninguna.

1.7. RIESGOS EN EL LABORATORIO

INFECCIONES ADQUIRIDAS EN EL LABORATORIO: Un caso reportado hasta 1988; infección de un médico al momento de hacer una transfusión a un paciente anémico (Rebagliati, 1940).

FUENTES / MUESTRAS: Sangre, lesiones de la piel.

RIESGOS PRIMARIOS: Inoculación parenteral accidental, contacto con mosquitos infectados (medio ambientales o en el laboratorio).

RIESGOS ESPECIALES: Ninguno.

1.8. PRECAUCIONES

REQUERIMIENTOS DE CONTENCIÓN: Nivel de bioseguridad II, aplicable a las prácticas, equipos y edificaciones para realizar las actividades que tengan material infeccioso o potencialmente infeccioso.

ROPA DE PROTECCIÓN ADECUADA: Mandil de laboratorio con manga larga y puños cerrados; guantes cuando se trabaje con material infeccioso.

OTRAS PRECAUCIONES: Evitar la inoculación accidental y seguir reglas generales de seguridad en el uso de agujas.

1.9. MANEJO DE MATERIAL EN CASO DE ACCIDENTES

DERRAMES: Permitir que los aerosoles se depositen; utilizando ropa de protección, cubrir cuidadosamente el derrame con papel absorbente y aplicar una solución de hipoclorito de sodio al 1% empezando en el perímetro y terminando en el centro; permitir un tiempo de contacto adecuado (30 minutos) antes de limpiar.

ELIMINACIÓN: Descontaminar todos los desechos antes de eliminarlos, por esterilización en autoclave, desinfección química o incineración.

ALMACENAMIENTO: En contenedores sellados que estén apropiadamente etiquetados, en un laboratorio de bioseguridad de nivel II.

Nota: Aunque la información, opiniones y recomendaciones de seguridad se han compilado de fuentes que se consideran confiables, no aceptamos responsabilidad por la precisión, suficiencia, confiabilidad o por cualquier pérdida o daño resultante del uso de esta información. La aparición de nuevos riesgos es frecuente y esta información puede no estar completamente al día.

SECCIÓN 2

PROCEDIMIENTOS DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS

2.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

La efectividad y éxito del diagnóstico bacteriológico depende en gran medida de la obtención y el transporte oportuno de las muestras al laboratorio, por esta razón el equipo de salud involucrado debe entender la naturaleza crítica de mantener la calidad de las muestras durante todo el proceso.

2.1.1. Objetivo

Describir los procedimientos para la obtención de muestras de sangre para el diagnóstico directo mediante coloración Giemsa, aislamiento bacteriano y pruebas moleculares.

2.1.2. Tipos de muestra

a) Para el diagnóstico directo:

- Frotis sanguíneo de sangre periférica en láminas portaobjetos.

b) Para aislamiento - cultivo:

- Sangre total con anticoagulante en tubos al vacío con citrato de sodio, heparina o EDTA.
- Sangre total inoculada directamente al medio de cultivo bifásico (inmediatamente después de la extracción de la muestra sanguínea).
- Biopsias de las lesiones, colocadas en recipiente estéril.

c) Para diagnóstico histopatológico:

- Biopsias de las lesiones en formol al 10%

2.2. CONDICIONES GENERALES

2.2.1. Todas las muestras de sangre deben ser consideradas como potencialmente patógenas, por eso deben ser manipuladas tomando las medidas de protección y tratadas como altamente infecciosas, para evitar posibles contagios de enfermedades como hepatitis viral B, C, VIH, etc. Se debe usar guantes durante todo el procedimiento de obtención de muestras.

2.2.2. Elegir el lugar correcto para obtener la muestra, usando una técnica aséptica que evite la contaminación de la muestra con flora normal.

2.2.3. Obtener suficiente cantidad de muestra de sangre (5mL) para asegurar el aislamiento del germen y evitar los resultados falsos negativos.

2.2.4. Obtener las muestras antes de la administración de algún agente antimicrobiano. Si la muestra ha sido tomada después de haber iniciado terapia antibiótica, el laboratorio debe ser informado al respecto.

2.2.5. Las muestras se colocan en un recipiente secundario apropiado para su transporte al laboratorio para evitar cualquier derrame, y por lo tanto los riesgos que de ello se derivan.

2.2.6. Luego de ser obtenidas, enviar las muestras al laboratorio tan pronto como sea posible.

2.2.7. Las muestras deben conservarse en forma adecuada.

2.2.8. El paciente debe ser informado en forma clara y sencilla de acuerdo con su grado de instrucción, sobre los procedimientos que se van a realizar con las muestras biológicas que de él se han obtenido.

2.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

2.3.1. Procedimiento

Para la obtención de muestras de frotis sanguíneo y sangre total seguir las indicaciones del *Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras, Norma Técnica N° 15*.

2.3.2. Errores comunes al preparar las muestras de frotis sanguíneo.

Se deben seguir las siguientes indicaciones para evitar errores:

- *No colocar la cantidad adecuada de sangre en la lámina.* El tamaño de la gota para hacer el frotis sanguíneo, idealmente es una gota similar a aquella formada cuando se hace una gota con una aguja hipodérmica N° 21.
 - Si la gota es muy grande el extendido será muy grueso, se formará una película con varias capas superpuestas de células, la coloración quedará oscura y durante el examen no se podrán observar las células que están por debajo de otras y que podrían estar infectadas.

- En caso contrario si la gota es muy pequeña, se obtendrá un frotis de distribución pobre y no homogénea de las células, por lo tanto no se examinará la cantidad adecuada de glóbulos rojos disminuyendo la posibilidad de encontrar células infectadas.
- *No usar láminas con grasa (sin lavar) para hacer el frotis.* En estas láminas la sangre se esparcirá en forma irregular, lo que dificultará la lectura.
- *No usar láminas mal enjuagadas.* Las láminas con algún rastro de detergente pueden alterar el colorante en el momento de la tinción.
- *No usar láminas con borde astillado o irregular para hacer el frotis.* En este caso la sangre se esparcirá irregularmente, el frotis no será homogéneo, y se formarán muchas colas dificultando la lectura.
- *No guardar las muestras inadecuadamente.* Al dejar las muestras de frotis expuestas al ambiente externo, la presencia de insectos, polvo, entre otros, podrían dañar la muestra.
- *No preparar las muestras sobre láminas rayadas.* En este caso también se producen extendidos irregulares y no homogéneos de la muestra de sangre.
- *No colorear las muestras mucho tiempo después de haberlas obtenido.* Esto dificulta la coloración de la lámina y por lo tanto se tienen resultados insatisfactorios.

2.3.3. Riesgos relacionados con la punción venosa

- Sangrado excesivo.
- Desmayo o sensación de mareo.
- Hematoma.
- Punciones múltiples para localizar las venas: el tamaño de las venas varía dependiendo de un paciente a otro y de una parte del cuerpo a otra, por tal razón obtener muestras de sangre de algunas personas puede ser más dificultosa que en otras.
- Infección local (flebitis).

2.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDOS MEDIANTE BIOPSIAS DE ERUPCIONES O VERRUGAS

2.4.1 Objetivo

Describir los procedimientos para la obtención de muestras de tejidos para cultivo.

2.4.2. Materiales para la obtención de biopsias

- Ficha de información básica.
- Fichas de consentimiento informado.
- Sacabocados dermatológico (*punch*), de diferentes diámetros, según el tamaño de la lesión: #3, #4, #5, #6 y #8.
- Frascos estériles con formol al 10%.

2.4.3. Procedimientos

Las muestras de biopsias se obtienen de las verrugas del paciente, de la siguiente manera:

- Identificar la verruga en la que se realizará el procedimiento, no debe tener infección secundaria.
- Realizar la asepsia de la lesión y de 3 a 4 cm alrededor del área afectada.

Técnicas estándar.

- Colocar un campo fenestrado para evitar la contaminación.
- Infiltrar la lesión con xilocaína al 5% sin epinefrina, se utilizará de 0,5 a 1mL por verruga, se hace un habón en la base de la verruga y se infiltra dermis y tejido celular subcutáneo.
- Se toma el sacabocados adecuado al tamaño de la lesión, lo ideal es que cubra toda la verruga siempre y cuando su localización lo permita.
- Cuando la lesión es en la cara, sólo se tomará una muestra pequeña con *punch* # 3.
- La muestra se toma mediante movimientos rotatorios y ejerciendo una presión sostenida pero suave, calculando que se haya alcanzado el tejido celular subcutáneo (TCSC).

- Luego la muestra se retira con una pinza quirúrgica estéril, si la muestra estuviera fijada al TCSC se puede utilizar una tijera quirúrgica para liberarla.
- Cortar la biopsia en dos, una para patología y otra para estudios bacteriológicos.
- Colocar las biopsias para cultivo y pruebas moleculares en un frasco estéril con tapa segura y mantenerla en refrigeración. Enviar las muestras lo más pronto posible (máximo tres días).
- Colocar las biopsias para estudios de anatomía patológica en frascos conteniendo formol al 10%. Conservarlas y enviarlas a temperatura ambiente.
- No se necesita realizar sutura para la hemostasia, esta se realiza por compresión.
- Luego de que haya cesado el sangrado se coloca sobre la lesión un antibiótico en crema y se cubre con una gasa estéril.
- Se debe realizar curaciones diarias en el lugar de la toma de muestra para evitar sobreinfección.



Figura 2. Obtención de muestra de tejido por biopsia con sacabocado.

SECCIÓN 3

CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS Y CULTIVOS

3.1. OBJETIVO

Describir los procedimientos y condiciones para la conservación y transporte de las muestras para diagnóstico de la enfermedad de Carrión.

3.2. CONDICIONES ESPECÍFICAS

3.2.1. Muestras de sangre y biopsias

- Las muestras de sangre y tejidos preferentemente deben ser conservadas a -20 °C o en cajas de *teknopor* conteniendo hielo seco, y enviadas al laboratorio antes de los siete días. De no tener esas condiciones, se pueden mantener en refrigeración de 4 - 8 °C hasta por cinco días.
- Los tubos (contenedores primarios) con las muestras de sangre, se envuelven individualmente con papel absorbente o en bolsa plástica, colocándolos dentro de un contenedor secundario (recipiente de plástico o metal).
- Entre los contenedores primarios y el secundario, colocar lana o algodón en cantidad suficiente para absorber el contenido completo de todos los contenedores primarios en caso de filtraciones o rotura del contenedor primario.
- Colocar dentro del contenedor terciario (caja de *teknopor*) al contenedor secundario rodeado de hielo seco. De no tener hielo seco poner bloques refrigerantes.
- Cerrar y sellar herméticamente el último empaque.
- Adjuntar la ficha de información básica y una lista de los contenidos en una bolsa plástica, adherirlo al contenedor terciario.
- Colocar una etiqueta o rótulo sobre el último empaque, del tamaño o dimensiones suficientes, que permita colocar todos los datos. Los datos o marcas deben ser visibles y legibles.

DESTINO - DIRECCIÓN
TELÉFONO
NOMBRE DEL RESPONSABLE DEL TRANSPORTE
MATERIAL INFECCIOSO - RIESGO BIOLÓGICO
URGENTE MATERIAL BIOLÓGICO PERECIBLE
EN CASO DE FUGAS O DAÑOS NOTIFICAR A LAS AUTORIDADES
SANITARIAS

3.2.2. Remisión de cultivos

- Enviar al Instituto Nacional de Salud los frascos de cultivos con crecimiento de colonias sospechosas a *Bartonella bacilliformis*, para reaislamiento, confirmación e identificación de especie.
- El envío de los cultivos se hace a temperatura ambiente.
- Los frascos deben ser rotulados con plumón indeleble (fecha de obtención de la muestra, nombre del paciente y código).
- Los frascos de cultivo se envuelven en material absorbente como algodón o papel que permita absorber y amortiguar el material infeccioso en caso de golpes o rotura del frasco y colocados dentro de un envase plástico duro con tapa hermética. Luego en un contenedor TERCIARIO como el *teknopor*.
- Enviar la ficha de información básica respectiva en un sobre, y éste dentro de una bolsa plástica, con los datos del destinatario.
- El contenedor terciario debe marcarse señalando la orientación del embalaje (figura 3), también se deben colocar etiquetas indicando el tipo de riesgo.
- Rotular la caja térmica con los siguientes datos:

DESTINO - DIRECCIÓN
TELÉFONO
NOMBRE DEL RESPONSABLE DEL TRANSPORTE
MATERIAL INFECCIOSO - RIESGO BIOLÓGICO
URGENTE MATERIAL BIOLÓGICO PERECIBLE
EN CASO DE FUGAS O DAÑOS NOTIFICAR A LAS AUTORIDADES
SANITARIAS



Figura 3. Embalaje con señal de orientación.

SECCIÓN 4

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

4.1. COLORACIÓN DEL FROTIS SANGUÍNEO CON GIEMSA

La coloración de Giemsa es una modificación de la coloración de Romanowsky, está disponible en cualquier laboratorio y nos permite detectar los glóbulos rojos infectados por *Bartonella bacilliformis* en sus formas bacilares, cocobacilares o cocoides. La muestra debe ser fijada con metanol antes del proceso de tinción.

4.1.1. Objetivo

Describir los procedimientos técnicos de tinción del frotis sanguíneo mediante el método de la coloración Giemsa.

4.1.2. Materiales para la Coloración

- Colorante Giemsa (*stock*).
- Solución de trabajo (colorante diluido).
- Metanol.
- Varillas de vidrio para coloración.
- Bandeja.
- Frascos gotero.
- Papel de filtro.
- Pinza.
- Embudo.
- Reloj.
- Tampón fosfato.

4.2. PROCEDIMIENTO DE LA COLORACIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA

- El frotis sanguíneo debe estar seco antes de la fijación, se puede acelerar el secado empleando calor suave como el generado por una lámpara. Evitar utilizar demasiado calor porque esto dificulta la coloración.



Figura 4. Muestras de frotis sanguíneo para coloración.

- Fijar el frotis sanguíneo sumergiendo la lámina en un frasco con metanol por tres segundos. Sacarlo y dejar secar o colocar la lámina sobre una varilla de vidrio y cubrir la superficie con metanol y dejar que se evapore por completo (Figura 5).

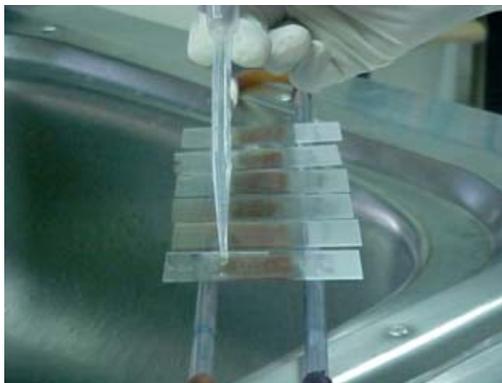


Figura 5. Fijación de la muestra de frotis sanguíneo.

- Preparar el colorante diluido o solución de trabajo inmediatamente antes de iniciar la coloración (ver anexo 1) y asegurarse que el volumen preparado sea suficiente para las muestras que se va a colorear (aprox. 1 mL por lámina). Se debe evaluar y ajustar el colorante de trabajo en función al estado y características del colorante madre.

- Filtrar la solución de trabajo con papel filtro (Figura 6).



Figura 6. Filtración de la solución de trabajo con papel filtro.

4.2.1. Coloración sobre varillas de vidrio

Es la forma más rápida y se puede colorear hasta diez láminas al mismo tiempo.

- Colocar la varilla de vidrio sobre un lavatorio o recipiente, para facilitar la eliminación de los líquidos usados en la coloración.
- Se colocan las láminas con los frotis sanguíneos, previamente fijados sobre la varilla, separadas una de otra para poder manipularlas con seguridad.



Figura 7. Muestras de frotis sanguíneo fijadas para colorear.

- Se cubre la extensión con el colorante de trabajo diluido 1:10 por 15 minutos. (La dilución y el tiempo de coloración se ajusta de acuerdo con las características del colorante preparado).



Figura 8. Coloración de muestras de frotis sanguíneo sobre varillas.

- Descartar el colorante y lavar la lámina a chorro suave y continuo de agua de caño hasta que arrastre todo exceso de colorante.

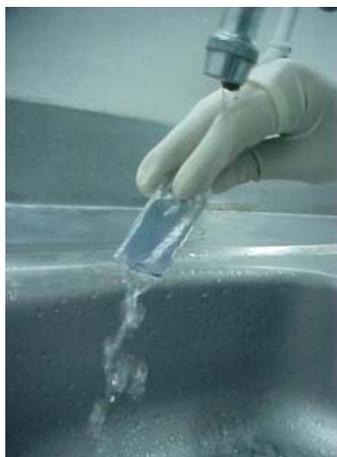


Figura 9. Lavado de lámina.

- Colocar las láminas inclinadas en una gradilla para que escurra el agua y dejar secar a temperatura ambiente.
- Proteger el frotis del polvo.

4.2.2. Coloración mediante lámina invertida

Este método se utiliza para colorear varias láminas al mismo tiempo y para evitar o disminuir el precipitado del colorante sobre el frotis sanguíneo.

Para realizar este procedimiento se usa una bandeja especial de coloración de material acrílico o de vidrio.

- Colocar a bandeja de coloración sobre una superficie plana de preferencia cerca de un lavatorio (Figura 10).
- Colocar las láminas fijadas con metanol que se van a colorear en forma invertida, es decir, con la muestra del frotis hacia abajo.
- Entre lámina y lámina debe haber una distancia tal que permita correr o agregar el colorante a cada una de las láminas.
- Vaciar el colorante de trabajo a la altura de cada lámina sobre la bandeja y dejar fluir el colorante por debajo de cada una de ellas (Figura 11).

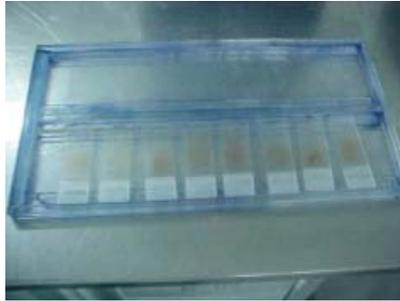


Figura 10. Bandeja de coloración con las láminas colocadas en posición invertida.



Figura 11. Proceso de coloración mediante el método de lámina invertida (A-C).

- En esta forma de coloración, el precipitado del colorante se va al fondo de la bandeja quedando la superficie en contacto con el frotis, libre de precipitado.
- Dejar colorear por 15 - 20 minutos
- Descartar el colorante y lavar la lámina a chorro suave y continuo de agua de caño hasta que arrastre todo el exceso de colorante.
- En este procedimiento el colorante de la bandeja puede ser reusado hasta por tres veces.
- Colocar las láminas inclinadas en una gradilla para que escurra el agua y dejar secar a temperatura ambiente.

4.3. OBSERVACIÓN Y LECTURA MICROSCÓPICA DE LOS FROTIS SANGUÍNEOS

Para la lectura de las láminas es importante conocer el manejo y limitaciones del microscopio y mantenerlo en buen estado.

En la lectura se debe tener en cuenta:

- a) Índice de bacteriemia
- b) Forma de las bacterias

En función a estos parámetros se deben emitir los resultados para el pronóstico médico.

- Se lee de 50 a 100 campos por lámina con la muestra de frotis sanguíneo a 1000 aumentos (objetivo de 100x) con aceite de inmersión, buscando la presencia de formas cocobacilares, bacilares o cocoides que se encuentran dentro de los hematíes.
- Un frotis sanguíneo tiene tres partes cabeza, cuerpo y cola; entre el cuerpo y la cola generalmente se encuentra una sola capa de células y los hematíes están separados, buscar esta zona para la lectura de la muestra.
- Las formas cocoides se encuentran en pares o cadenas. Si se observa un solo hematíe con forma cocoide es preferible revisar toda la lámina, es posible que no sea la forma cocoide sino algún artefacto.
- En un frotis positivo, se observan hematíes deformados y muchas veces toman la forma ameboide.

- El resultado de la lectura del frotis sanguíneo se expresa en porcentaje de hematíes infectados, para lo cual se cuenta 100 hematíes y se determina cuántos están infectados.
- Si se observa que las células infectadas son más del 50%, se leerán 50 campos.
- Si se observa que las células infectadas son menos del 50%, se leerán 100 campos.
- Si se observa que el porcentaje de hematíes infectados es menor a 5%, se debe leer toda la lámina.
- En el reporte se debe colocar las formas bacterianas observadas, ya sea bacilar, cocobacilar o cocoide.
- En la fase aguda de la enfermedad se observan predominantemente formas bacilares de color rojizo o violeta, separadas o en grupos dentro de los hematíes; con menos frecuencia se ven formas cocoides.

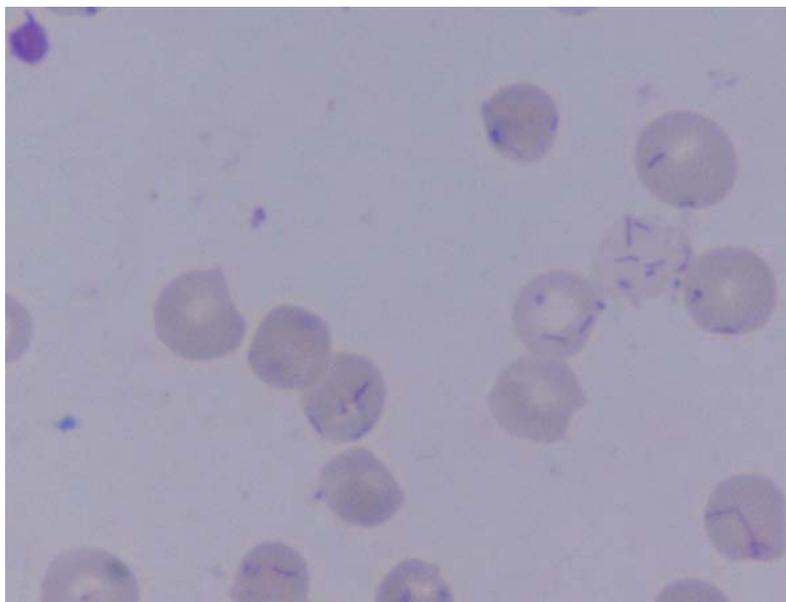


Figura 12. Frotis sanguíneo con hematíes infectados con formas cocoides y bacilares. Giemsa X1000.

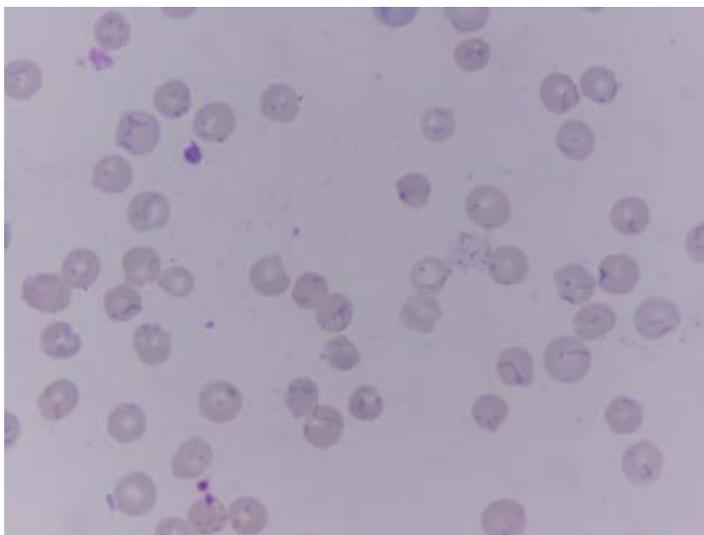


Figura 13. Frotis sanguíneo con 100% de hematíes infectados. Giemsa X 1000.

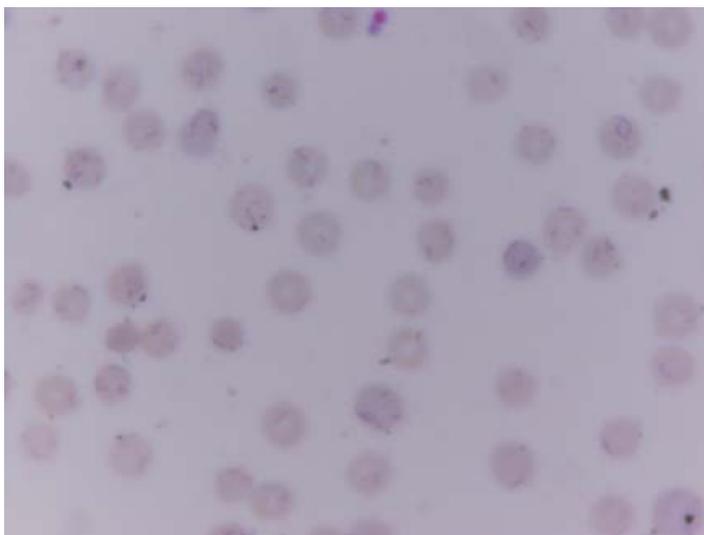


Figura 14. Frotis sanguíneo con 100% de hematíes infectados. Giemsa X 1000.

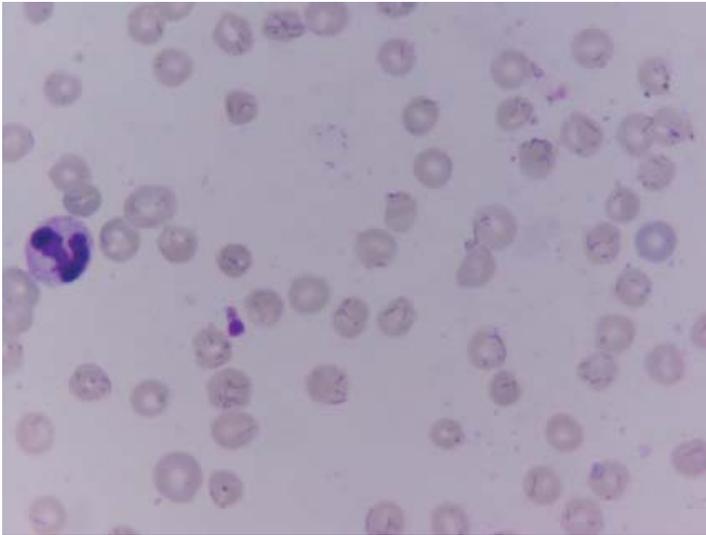


Figura 15. Frotis sanguíneo con 100% de hematíes infectados. Giemsa X 1000.

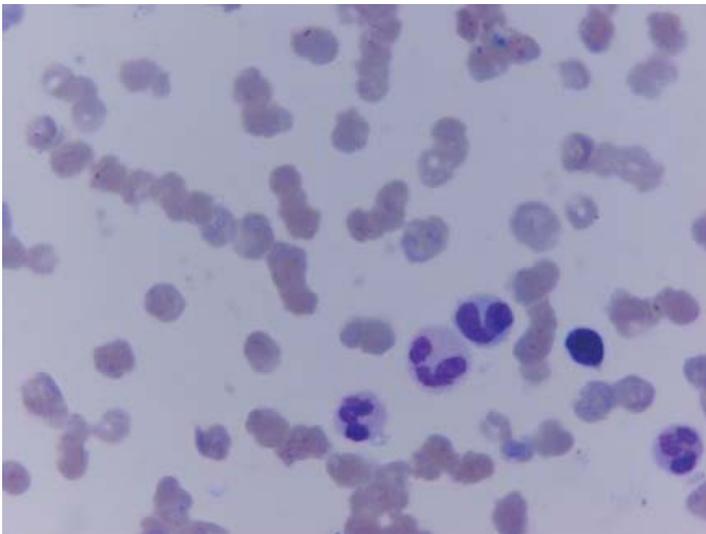


Figura 16. Frotis sanguíneo con 40% de hematíes infectados con formas cocoides de *B. bacilliformis*. Giemsa X 1000.

4.4. ERRORES DURANTE LA LECTURA DE LÁMINAS

Los errores más frecuentes son confundir las formas cocoides con punteado basófilo, precipitados del colorante, células de Heinz o con reticulocitos en los cuales se colorea el núcleo.

La lectura también puede ser obstaculizada en el caso de extendidos gruesos, que se colorean en tono oscuro y no se observan claramente las formas cocoides.

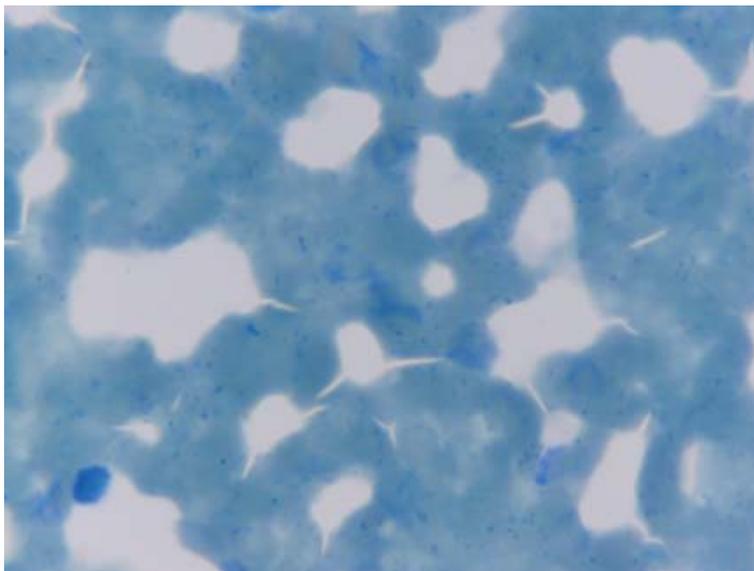


Figura 17. Frotis sanguíneo grueso, hematíes infectados con formas cocoides y bacilares. Giemsa X 1000.

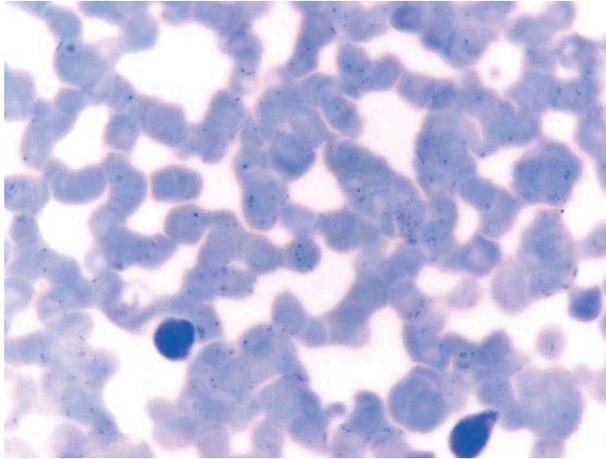


Figura 18. Frotis sanguíneo grueso con 100% de hematíes infectados con formas cocoides. Giemsa X 1000.

4.5. DIAGNÓSTICO MEDIANTE CULTIVO

El cultivo de las muestras sanguíneas es importante para confirmar la sospecha clínica, y con fines epidemiológicos.



Figura 19. Medio de cultivo de agar Columbia con sangre de carnero.

El aislamiento de *Bartonella bacilliformis* se puede realizar en los siguientes medios:

- En agar Columbia con sangre de carnero al 10% en placas Petri.
- En medio de cultivo bifásico distribuido en frascos, constituido por una fase sólida de agar Columbia con sangre de carnero al 10% y extracto de levadura al 0,1% y una fase líquida con medio RPMI suplementado con suero fetal bovino; una alternativa para la fase líquida es el medio RPMI sin suplemento o infusión cerebro corazón.
- El mayor porcentaje de aislamientos (70-80%) se logra en las dos primeras semanas de incubación, en la tercera y cuarta semana se obtiene el resto (20-25%).

4.5.1. Condición específica de la muestra

- La muestra de sangre no debe tener más de siete días de haber sido obtenida.
- La muestra debe ser obtenida antes del tratamiento con antibióticos.

4.5.2. Materiales para el cultivo

- Jeringa descartable con aguja.
- Alcohol de 70°.
- Algodón.
- Guantes estériles.
- Contenedor de material contaminado.
- Estufa de 28 a 29°C.
- Pipetas de transferencia descartables estériles.
- Tubos al vacío conteniendo la muestra de sangre total.
- Medios de cultivo.

4.5.3. Preparación de la muestra sanguínea

- Para incrementar el aislamiento de *B. bacilliformis* de la sangre es conveniente lisar los eritrocitos por medios mecánicos como el de centrifugación de la muestra.

4.5.4. Procedimiento para el cultivo en placas

Colocar en la cabina de seguridad el material necesario para el cultivo de la muestra sanguínea.

- Dejar que los medios de cultivo tomen temperatura ambiente.
- Rotular con el código del paciente las placas con agar Columbia sangre.
- Desinfectar con alcohol de 70° la tapa de jebes del tubo al vacío que contiene la muestra.
- Extraer la muestra con una jeringa, a través de la tapa de jebes o con pipeta de transferencia.
- Inocular de 0,5 a 1mL de sangre sobre el agar Columbia, dejando que la sangre fluya sobre la superficie del medio, luego cerrar la placa.
- Colocar la placa con la muestra sembrada en bolsas de polietileno de baja densidad autosellables para mantener la humedad del medio de cultivo que debido al largo período de incubación se seca y para evitar contaminación con hongos saprofitos.
- Incubar el cultivo a 28 °C hasta por 45 días.

En el caso que el laboratorio no tenga las facilidades ideales para poder realizar el cultivo sin correr el peligro de contaminarlo, se debe usar un mechero de gas que dé a su alrededor un amplio radio (espacio) de esterilidad o, de lo contrario se debe utilizar el medio de cultivo bifásico.



Figura 20. Siembra del medio en placas de agar Columbia con sangre de carnero.



Figura 21. Sellado de las placas en bolsas de polietileno.

4.5.5. Procedimiento para el cultivo en medio bifásico:

- Colocar en la mesa de trabajo las muestras de sangre total, contenidas en tubos al vacío con anticoagulante.
- Dejar que los medios tomen temperatura ambiente.
- Levantar el diafragma y desinfectar la tapa de jebes del frasco con medio de cultivo, con alcohol de 70° o alcohol yodado.
- Extraer con una jeringa la sangre total del tubo que contiene la muestra de sangre.
- Inmediatamente, inocular a través del tapón de jebes 0,5 a 1mL de sangre al frasco con medio de cultivo bañando la fase sólida.
- Si el medio de cultivo se encuentra en frascos con tapa rosca, destapar e inocular la muestra de sangre con una pipeta de transferencia estéril. Este procedimiento debe realizarse cerca de un mechero.
- Se deja reposar el frasco inclinado hasta que la sangre se impregne en el agar por 30 minutos.
- Descartar la aguja y la jeringa en un contenedor resistente a las punturas.
- Limpiar con un algodón empapado con alcohol la tapa del frasco.
- Incubar el cultivo a 28-29 °C hasta 45 días.

4.5.6. Lectura de cultivos

Cultivos en placas:

- Examinar los cultivos visualmente con luz transmitida o con una lupa, todos los días hasta por 45 días.
- Si se ve desarrollo de colonias entre las 24 y 72 horas, no se trata de *B. bacilliformis*. Efectuar un examen microscópico de las colonias, realizar el frotis de una colonia y teñirla con colorante Gram para determinar la forma bacteriana, y si son Gram positivas o negativas. Identificar la bacteria mediante pruebas bioquímicas y serológicas; podría tratarse de una bacteria que esté causando una complicación al paciente, por lo que es necesario identificarla y realizar el antibiograma correspondiente.
- En el aislamiento primario las colonias de *B. bacilliformis* se desarrollan entre cuatro días a seis semanas de incubación, crecen lentamente. Son colonias pequeñas de apenas 1 mm de diámetro, translúcidas tipo rocío o blanquecinas. Realizar el examen del frotis de una colonia y teñirla con colorante Gram para observar la forma bacteriana. *Bartonella bacilliformis* colorea muy débilmente con la tinción de Gram.
- Realizar un subcultivo de las colonias sospechosas.
- Los cultivos pueden ser crioconservados en medio de infusión cerebro corazón con 10% de glicerol a -70 °C, en el Laboratorio de Referencia Regional o Nacional (punto 4.4.).



Figura 22. Cultivo puro en placas con agar Columbia con sangre de cinco a seis días de incubación.



Figura 23. Cultivo puro en placas con agar Columbia con sangre de siete días de incubación.



Figura 24. Cultivo puro en placas con agar Columbia con sangre de nueve días de incubación.

Cultivos en medio bifásico:

- En el caso del medio bifásico, bañar la fase sólida del medio con la fase líquida inclinándolo suavemente cada cuatro o cinco días.
- Si a las 24 ó 48 horas se nota desarrollo de colonias sobre el plano inclinado de la fase sólida o se nota turbidez o lisis de los hematíes en la fase líquida, realizar un subcultivo en placas de agar sangre y Mac Conkey, y proceder a la identificación del microorganismo; no se trata de *B. bacilliformis*, puede ser una infección sobreagregada.
- Si se observa crecimiento de colonias, turbidez o hemólisis después de seis a siete días de incubación, realizar un subcultivo en placas con agar Columbia sangre.
- Si no se observa crecimiento de colonias o turbidez después siete u ocho días, realizar subcultivos ciegos a los 15 días.
- Los cultivos deben seguir incubándose hasta por 45 días.
- Si se carece de una incubadora de la temperatura indicada, mantener los frascos de cultivo a temperatura ambiente y enviarlos tan pronto como sea posible al Laboratorio de Referencia Regional o al Laboratorio de Referencia de Bartonella del INS.



Figura 25. Cultivos en medio bifásicos.



Figura 26. Observación de colonias en medio bifásico.

4.3.7. Subcultivos

- Los subcultivos deben realizarse en cabina de bioseguridad.
- Desinfectar la tapa del frasco de hemocultivo con alcohol 70 °.
- Con una jeringa de tuberculina estéril, extraer 200 μ L de la fase líquida del medio e inocular en la superficie de placas con agar Columbia sangre y colocar una gota sobre una lámina para hacer un frotis y coloración Gram.
- Los subcultivos también pueden realizarse en frascos con medio bifásico.
- Observar la lámina coloreada con Gram y buscar formas bacterianas.
- Incubar los cultivos a 28-29 °C y observar hasta por 45 días.
- Observar los cultivos con luz transmitida todos los días.
- En el caso que se haya realizado la siembra primaria en placas con agar Columbia y se noten colonias sospechosas, puede hacer un cultivo usando un asa de siembra, coger una colonia por puntura, se puede replicar en otra placa con agar Columbia, o se puede inocularla en frascos con tapa rosca conteniendo medio bifásico.

Lectura de los subcultivos

Después de varios pasajes de cultivos o subcultivos sucesivos, el crecimiento de las colonias es más rápido y se hacen visibles después de tres a cuatro días de incubación. Generalmente, las colonias crecen entre los 4 y 14 días; sin embargo, debe observarse el subcultivo hasta los 45 días.

4.5.8. Identificación de *Bartonella bacilliformis*

La identificación del género se realiza por:

- Las condiciones requeridas para el desarrollo bacteriano, como:
 1. La temperatura de crecimiento, entre 28 - 29 °C.
 2. El período de incubación, desarrolla desde los 4 hasta 45 días.
 3. Desarrolla sólo en medios enriquecidos.
 4. El aislamiento primario es lento.
- No produce hemólisis en agar Columbia con sangre de carnero.
- Son Gram negativos.
- Las colonias son pequeñas, puntiformes y translúcidas, de borde entero; otras son ligeramente más grandes blanquecinas, de borde entero y se adhieren a la superficie del agar, esta adherencia es una característica fenotípica de algunas colonias. La morfología de la colonia y las características de crecimiento probablemente estén relacionadas con la patogenicidad del microorganismo.
- No crecen en medio de agar Mac Conkey o agar nutritivo.
- No fermentan los azúcares, son bioquímicamente inertes.
- No crece a 37 °C.
- Son oxidasa negativa, catalasa positiva, ureasa e indol negativo.
- Son móviles, lo que se observa en el medio de gel de fases, forman una banda de desarrollo bacteriano de aproximadamente 6 mm, con migración del cultivo desde el trazo de inoculación hacia las paredes del tubo.



Figura 27. Medio gel de fases.

5.4. CRIOCONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Los aislamientos que tengan características compatibles a *B. bacilliformis* deben ser almacenados bajo condiciones de criopreservación.

Procedimiento:

- a. Si el subcultivo es en placa: Si se tienen subcultivos positivos y con colonias de un solo tipo, coger con una asa de siembra las colonias (cosechar) e inocularlas en crioviales con medio infusión cerebro corazón con glicerol 10%.
- b. Si el subcultivo es en medio bifásico: Coger con una pipeta estéril de 0,5 - 2 mL de la fase líquida del medio e inocularlas en crioviales.
- c. Las cepas deben guardarse por duplicado o más a -20 o -70 °C.

SECCIÓN 5

BIBLIOGRAFÍA

Birtles R, Fry NK, Ventosilla P, Cáceres AG, Sanchez E, Vizcarra H, et al. Identification of *Bartonella bacilliformis* genotypes and their relevance to epidemiological investigations of human bartonellosis. J Clin Microbiol 2002 ; 40(10): 3606-12.

Anderson BE, Neuman A. *Bartonella spp.* as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev 1997; 10(2): 203-19.

Colichón AH, Colichón A, Solano L. La *Bartonella bacilliformis* en el medio de fases. Arch Peru Pat Clin 1971; 25(1): 15-32.

Cuadra M, Cuadra AM. Enfermedad de Carrión: inoculaciones de seres humanos con *Bartonella bacilliformis*, una revisión. An Fac Med 2000; 61(4): 289-94.

Dehio C. Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. Ann Rev Microbiol 2004; 58: 365-90.

Ellis BA, Rotz LD, Leake JA, Samalvides F, Bernable J, Ventura G, et al. An outbreak of acute bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba region of Peru, 1988. Am J Trop Med Hyg 1998; 6(12): 344-49.

Garrity G, Winters M, Searles D. Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera. En: Garrity GM, Holt JN. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition. Berlin: Springer-Verlag KG; 2001.

Huarcaya E, Chinga E, Chavez J, Chauca J, Llanos-Cuentas A, Maguiña C, et al. Influencia del fenómeno de El Niño em la epidemiología de la Bartonelosis humana en los departamentos de Ancash y cusco entre 1996 y 1999. Rev Med Hered 2004; 15(1): 4-10.

Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos. Bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. 3^{ra} ed. Lima: INS; 2005. Serie de Normas Técnicas N° 18.

Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico histopatológico. Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N° 24.

Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Lima: INS; 2003. Serie de Normas Técnicas N° 38.

Maguiña C. Bartonelosis o enfermedad de Carrión. Lima: Editorial AFA Import SA; 1998.

Minnick MF, Mitchell SJ, McAllister SJ. Cell entry and pathogenesis of *Bartonella* infections. Trends Microbiol 1996; 4(9): 343-47.

Perú, Ministerio de Salud. Doctrina, normas y procedimientos para el control de la Bartonelosis o enfermedad de Carrión en el Perú. Lima: MINSA; 1998.

Public Health Agency of Canada. Bartonella bacilliformis [página de internet]. Ottawa: Office of Laboratory Security, Material Safety Data Sheets, Infectious Substances; 2001. Fecha de acceso: enero del 2005. Disponible en: www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds16e.html.

Rebagliatti R. Verruga Peruana (Enfermedad de Carrión) Lima; Imprenta Torres Aguirre; 1940.

Saettone-León A. Verruga Peruana. Dermatol Peru 2004; 14(1-2): 121-33.

Villaseca P, Padilla C, Ventura G, Samalvides F, Yañez H, Chevarria L, et al. Importancia de la *Lutzomia peruensis* en la transmisión de la enfermedad de Carrión en el Valle Sagrado de los Incas, Urubamba-Cusco, Perú. Rev Med Exp 1999; 16(1-2): 28-30.

ANEXO 1

PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y COLORANTE GIEMSA

1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ALCOHÓLICA GIEMSA (solución madre)

Fórmula:

Colorante Giemsa en polvo, certificado	0,75 g
Alcohol metílico puro.	65 mL
Glicerina pura	35 mL

Preparación:

- A un frasco de vidrio de color ámbar conteniendo perlas de vidrio de diámetro no mayor de 5 mm, se agrega la glicerina; luego se adiciona el colorante Giemsa, se va agitando. Finalmente, se adiciona el alcohol metílico.
- Agitar el frasco intensamente varias veces al día, durante tres días como mínimo.
- Extraer diariamente una pequeña muestra del colorante preparado, filtrarla a través de papel filtro # 2, y probar con frotis sanguíneos recién preparados.
- Cuando los elementos de la sangre aparezcan con sus colores apropiados, entonces el colorante está listo para ser utilizado.

2. PREPARACIÓN DEL DILUYENTE (solución amortiguadora)

El diluyente es una solución amortiguadora y se usa en la preparación del colorante diluido o solución de trabajo.

Las sustancias amortiguadoras actúan como un adaptador que inactiva dentro de un margen limitado cantidades variables de ácido o alcali.

Fórmula:

Ortofosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4)	4 g
Ortofosfato monopotásico (KH_2PO_4)	5 g

Preparación:

Mezclar bien, y disolver 1g de la mezcla en un litro de agua destilada y ajustar el pH a 7,2.

3. PREPARACIÓN DEL COLORANTE DILUIDO O SOLUCIÓN DE TRABAJO

Fórmula:

Solución madre Giemsa.	0,05 mL
Solución amortiguadora o diluyente.	0,95 mL

Preparación:

En una probeta de vidrio se añade la solución madre Giemsa al 5% con la solución amortiguadora.

Una forma más rápida de preparar el colorante diluido es agregando una gota de solución madre por mL de solución amortiguadora.

Después de preparado el colorante madre, se debe determinar el tiempo de coloración que puede ser entre 15 - 20 minutos y la dilución en la que se debe preparar el colorante diluido, estas dos características se deben ajustar en función al estado del colorante madre.

Recomendaciones:

- Mantener el frasco de vidrio color ámbar, que contiene la solución madre de Giemsa bien cerrado y en un lugar fresco, seco y protegido de la luz solar directa para evitar la volatilización del solvente y la oxidación del colorante.
- El material de vidrio como probetas, pipetas, cubetas y embudos empleados en la preparación de los reactivos y colorantes deben estar limpios y secos.
- El frasco de vidrio usado en la preparación del colorante debe ser lavado con detergente y enjuagado hasta que no queden residuos de éste, ya que puede alterar el pH del colorante y estropearlo.
- No se debe añadir agua a la solución madre Giemsa, porque la mínima cantidad de ésta deteriora el colorante.
- No agitar el frasco del colorante antes de utilizarlo porque se suspenden pequeños cristales de éste que no han sido disueltos, y se quedan en los frotis sanguíneos durante el proceso de coloración formando precipitados.
- Debe descartarse el colorante diluido no utilizado.

ANEXO 2

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO MONOFÁSICO

Para preparar los medios de cultivo, la sangre de carnero debe ser estéril. Esto se comprueba mediante el cultivo de una muestra de sangre de carnero en medios de cultivo de agar soya tripticase y agar Mac Conkey; incubar por 24 y 48 horas.

MEDIO MONOFÁSICO:

Fórmula:

Fase sólida

- Medio comercial agar Columbia
- Sangre de carnero desfibrinada 10%
- Extracto de levadura 0,1%

Procedimiento:

- Disolver 44 g del medio deshidratado y 1 g de extracto de levadura en 1000 mL de agua destilada, mezclar hasta obtener una solución homogénea. Calentar agitando hasta la ebullición para disolver completamente, mantener a un pH 7,4.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Cuando el medio se encuentra a 50 °C, añadir en forma aséptica 10% de sangre desfibrinada de carnero, agitar suavemente para obtener una mezcla uniforme y repartir en placas Petri.
- Dejar que solidifique y controlar esterilidad.
- Almacenar hasta por 25 días en refrigeración.

ANEXO 3

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO BIFÁSICO

Para preparar los medios de cultivo, la sangre de carnero debe ser estéril. Esto se comprueba mediante el cultivo de una muestra de sangre de carnero en medios de cultivo de agar soya tripticase y agar Mac Conkey; incubar por 24 y 48 horas.

MEDIO BIFÁSICO

Fórmula:

Fase sólida

- Agar Columbia
- Sangre de carnero desfibrinada 10%
- Extracto de levadura 0,1%

Fase Líquida

- RPMI 1640 con 10% de suero bovino fetal (la casa comercial Gibco distribuye el medio de RPMI por litro).

Procedimiento:

- Disolver 44 g del medio deshidratado y 1 g de extracto de levadura en 1000 mL de agua destilada, mezclar hasta obtener una solución homogénea. Calentar agitando hasta la ebullición para disolver completamente, mantener a un pH 7,4.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Cuando el medio se encuentra a 50 °C, añadir en forma aséptica 10% de sangre desfibrinada de carnero. Agitar suavemente para obtener una mezcla uniforme y repartir en frascos de 50 mL.
- Inclinar los frascos sobre una de las paredes del frasco y dejar que se solidifique el medio en plano inclinado.
- Controlar su esterilidad durante 72 horas.
- Preparar la fase líquida del medio de acuerdo con la cantidad de frascos que va a preparar.
- El pH del medio RPMI 1640 debe de ser 7,4.
- Al medio de RPMI añadir el 10% de SBF estéril.

- Añadir 3 mL de la fase líquida a cada frasco que contiene la fase sólida, este procedimiento debe ser realizado en condiciones de esterilidad.
- Colocar el precinto de metal al frasco.
- Controlar su esterilidad por 24 horas.
- Almacenar en refrigeración hasta por 25 días.

ANEXO 4

PREPARACIÓN DE MEDIO GEL DE FASES

A. CALDO PARA LA GELIFICACIÓN

Bacto tryptosa 10 g

Cloruro de sodio 7 g

Agua destilada 1000 ml

Disolver los ingredientes en agua destilada, ajustar a pH 7,0 - 7,2.

Esterilizar a 15 lb X 15 minutos.

B. GEL DE FASES

A 90 mL del caldo de gelificación se le añade 1,5 mL de ClCa^+ al 2% (esterilizado por filtración).

Añadir 10 mL de plasma de carnero.

Repartir inmediatamente 5 mL del caldo plasma en tubos con agar sangre. Dejar en posición vertical por 24 horas, luego llevar a 37 °C para su gelificación y control de esterilidad

ANEXO 5

PREPARACIÓN DE MEDIO DE CRIOCONSERVACIÓN DE CEPAS

CALDO INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN (BHI)

- Preparar 100 mL del medio según las indicaciones del fabricante y luego añadir 10% de glicerol, repartir en crioviales y esterilizar por calor húmedo a 15 lb por 15 minutos.
- Almacenar en refrigeración.

CEPREDIM



SE TERMINÓ DE IMPRIMIR
EN EL MES DE SETIEMBRE DE 2006,
POR ENCARGO DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD,
EN LOS TALLERES GRÁFICOS DEL
CENTRO DE PRODUCCIÓN EDITORIAL E IMPRENTA DE
LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
JR. PARURO 119. LIMA 1.
TELÉFONO: 619-7000 ANEXOS: 6011, 6015/ FAX: 6009
E-MAIL: CEPEDIT@UNMSM.EDU.PE
TIRAJE: 1000 EJEMPLARES