

96
2 Ecu.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROYECTO DE UN MANUAL PARA EL LABORATORIO
DE HEMATOLOGÍA**

**TRABAJO MONOGRAFICO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ANA MA. SALAZAR VILLALOBOS**

MEXICO, D.F.

1985



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION	1
I. TOMA DE MUESTRAS ANTICOAGULANTES	3
II. BIOMETRIA HEMATICA	15
1) DETERMINACION DE HEMOGLOBINA	16
2) HEMATOCRITO	25
3) CUENTA DE ERITROCITOS	30
4) CUENTA DE RETICULOCITOS	42
5) VELOCIDAD DE SEDIMENTACION GLOBULAR	47
6) INDICES ERITROCITICOS	52
7) CUENTA DE LEUCOCITOS	57
8) CUENTA DIFERENCIAL	
a) Preparación de extensiones sanguíneas. Recomendaciones.	63
b) Preparación de colorantes y métodos de tinción, para extensiones sanguíneas y frotis de médula ósea.	67
c) Características morfológicas de eritrocitos y leucocitos. Procedimiento para efectuar una cuenta diferencial.	79
9) CUENTA DE PLAQUETAS	88
10) VALORES ABSOLUTOS	99
III. TECNICAS ESPECIALES	101
1) INDUCCION DE DREPANOCITOS	102
2) FRAGILIDAD OSMOTICA	106
3) DETERMINACION DE HEMOGLOBINA FETAL	111
4) DETERMINACION DE HEMOGLOBINA EN PLASMA	117
5) ELECTROFORESIS DE HEMOGLOBINA	122
6) HEMOGLOBINURIA PAROXISTICA NOCTURNA	131
a) Prueba de hemólisis en sacarosa	
b) Prueba de Ham	

	PAG.
7) DETERMINACION DE HIERRO	138
8) CAPACIDAD DE FIJACION DE HIERRO	144
9) INVESTIGACION DE CELULAS L.E.	148
10) TINCION DE SIDEROBLASTOS Y SIDEROCITOS	152
IV. HEMOSTASIA	156
1) INTRODUCCION	156
2) RECOMENDACIONES	161
3) DERIVADOS SANGUINEOS USADOS EN LOS PROCESOS DE COAGULACION	163
4) TIEMPO DE SANGRADO	166
5) TIEMPO DE COAGULACION	171
6) RETRACCION DEL COAGULO	175
7) FRAGILIDAD CAPILAR	179
8) ADHESIVIDAD PLAQUETARIA	183
9) PLASMA RECALCIFICADO	188
10) TIEMPO DE PROTROMBINA	192
11) TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL	198
12) TIEMPO DE TROMBINA	202
13) FIBRINOGENO	206
14) GENERACION DE TROMBOPLASTINA	210
15) PDF y pdf	216
a) Gel de etanol	218
b) Lisis de euglobulinas	220
c) Sulfato de protamina	222
16) FACTOR V	225
17) INVESTIGACION DE INHIBIDORES E INACTIVADORES: UTILIZANDO EL TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADO.	230
V. INVESTIGACION DE LA COMPATIBILIDAD SANGUINEA	234
1) DETERMINACION DE LOS GRUPOS DEL SISTEMA A B O	235
2) DETERMINACION DEL FACTOR Rh	244
3) PRUEBAS CRUZADAS	251
a) Con solución salina	254
b) Con alto contenido protético (albúmina)	255
c) Tratamiento de eritrocitos con enzimas (bromelina y fiscina)	257
d) Pruebas de Coombs. Directa e Indirecta	259

	PAG.
4) TITULACION DE HEMOLISINAS Y AGLUTININAS	267
VI. CITOQUIMICA	272
1) REACCION DE SUDAN NEGRO B	274
2) REACCION DE PAS-SCHIFF	276
VII. APENDICE	280
LISTA DE REACTIVOS	281
VALORES DE REFERENCIA	290
ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL MANUAL	295
TABLA DE TRANSMISION-EXTINCION	297
CONCLUSIONES	298

I N T R O D U C C I O N

El diagnóstico en Hematología depende de la interpretación correcta de los resultados. Generalmente estos derivan de una serie de pruebas - que el médico solicita para el paciente. El personal del laboratorio debe contar con una sólida base de conocimientos de las técnicas a emplear y además para sugerir otras pruebas que permitan definir un diagnóstico. Actualmente la información con respecto a fundamentos, opciones de técnicas, valores de referencia, etc., está dispersa en una amplia gama de referencias que incluyen manuales, libros de texto y publicaciones científicas a las que no se tiene acceso fácilmente. El objetivo de este trabajo es presentar una concentración de las técnicas - más usuales acorde con las posibilidades que existen en el ámbito profesional, obtenidas de la bibliografía citada y de los manuales de instituciones como IMSS, ISSSTE y SSA, lo que será una herramienta de gran ayuda para los estudiantes en las diferentes instituciones educativas del país, técnicos laboratoristas, químicos y médicos que laboren en el Sector Salud y tienen relación con esta materia, así como a los profesionales que se dediquen a la investigación en esta rama de la medicina, como un medio de consulta o referencia.

Para la fácil comprensión, este manual ha sido desglosado en 7 capítulos que a continuación se mencionan:

- I. Toma de muestras. Anticoagulantes
- II. Biometría Hemática
- III. Técnicas Especiales
- IV. Hemostasia
- V. Investigación de la Compatibilidad Sanguínea
- VI. Citoquímica
- VII. Apéndice

Considerando en cada punto, el objetivo, su fundamento científico, la técnica incluyendo material a emplear, los cálculos requeridos, valores de referencia, bibliografía, que ha sido citada para realizar un examen más a fondo sobre el tema a tratar.

CAPITULO I

TOMA DE MUESTRAS ANTICOAGULANTES

OBTENCION DE MUESTRAS DE SANGRE

Objetivo:

1. Señalar la importancia de las condiciones en que debe efectuarse la toma de muestra de sangre, así como describir el material que deberá usarse.

Generalidades: Las células sanguíneas se modifican y alteran con gran rapidez cuando son extraídas de la circulación, por tales razones es importante obtenerlas, manipularlas y conservarlas mediante procedimientos que aseguren su integridad y morfología funcional.

En particular para observar la morfología celular es indispensable hacer extensiones de sangre sin la acción anticoagulante.

Las soluciones anticoagulantes aquí propuestas son las que menos alteraciones producen en las células sanguíneas, no obstante, es indispensable seguir las instrucciones recomendadas a fin de optimizar su uso y por lo tanto obtener resultados confiables en los análisis que se practiquen con estas muestras de sangre.

PUNCION VENOSA

La punción más común es en la vena mediana cefálica. Cuando resulte difícil localizar la vena, puede hacerse resaltar diciendo al paciente que abra y cierre la mano. La mayoría de las muestras se obtienen por punción venosa, aunque puede ser arterial o capilar. (1)

Antes de tomar las muestras debe verificarse el material a usar y que los tubos estén rotulados correctamente (nombre del paciente, No. de registro, fecha).

Se pueden usar agujas hipodérmicas, jeringas con una aguja hipodérmica o el sistema vacutainer, que es un tubo con vacío.

TECNICA

MATERIAL Y REACTIVOS

Material:

Tubos de ensaye de 12 x 75 mm con anticoagulante
Jeringa hipodérmicas de 5 ml, estériles
Agujas hipodérmicas número 20 ó 21 de dos pulgadas,
estériles
Ligadura de plástico
Torundas de algodón
Tapones de hule para tubos de ensaye
Etiquetas de papel engomado.

Reactivos:

Solución anticoagulante de EDTA al 10%
Alcohol etílico al 70%

METODOLOGIA

Usar jeringa estéril seca de tamaño conveniente, observando las reglas de la asepsia y antisepsia, se le adapta una aguja de longitud mediana, de 20x32 mm ó 21 x 32 mm, estéril; el protector estéril de la aguja se deja sobre ella. El paciente escoge una posición cómoda, en la cual puede presentar el brazo y mantenerlo inmóvil sin esfuerzo ni fatiga.

Se hace asepsia de la región anterior del antebrazo con una torunda de algodón empapada en una mezcla de partes iguales de alcohol etílico al 70% y éter, o alcohol al 70% solamente. Se aplica un torniquete con una ligadura de hule a unos 7 cm por encima del pliegue del codo (fig. 1) el cual no debe apretarse demasiado.

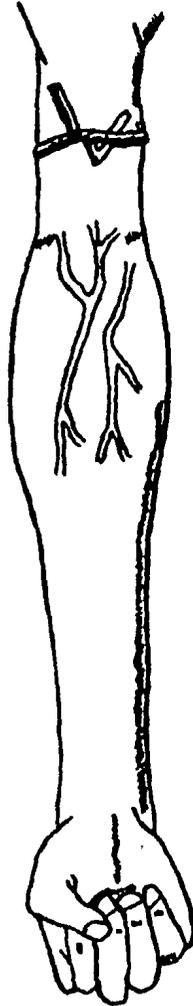


FIG.1 APLICACION DEL TORNIQUETE

Quitar el estuche protector de la aguja y se toma la jeringa de manera que el bisel de la aguja se encuentre hacia arriba.

Poniendo la aguja al trayecto de la vena, se hace avanzar la punta de la aguja de 0.5 a 1.0 cm en el tejido subcutáneo y luego se perfora la pared de la vena. La sangre puede drenar espontáneamente a la jeringa, pero si no es así, se jala ligeramente el émbolo, a una velocidad igual a la sanguínea. Es preferible soltar el torniquete, pues al cabo de un minuto de estasis se produce cierta hemoconcentración. En cuanto se tenga la muestra necesaria, se suelta el torniquete (si no se hizo antes) y la aguja se retira rápidamente aplicando una torunda de algodón sobre el sitio de la punción, indicando al paciente que la comprima con los dedos de la otra mano o que flexione el codo.

Se coloca el protector sobre la aguja y se remueve de la jeringa con un movimiento de torsión, la muestra se vacía lentamente por la pared de los recipientes correspondientes. Los que contienen anticoagulante se mezcla por inversión varias veces. Es importante evitar que la jeringa se vacíe a través de la aguja, empujar mucho el émbolo y la formación de espuma, pues en cualquiera de estos casos probablemente se producirá hemólisis. (2,3)

VENTAJAS:

1. Es el método más fácil y adecuado para obtener un volumen de sangre suficiente para llevar a cabo gran número de pruebas. La muestra puede dividirse y tratarse conforme a las necesidades del caso; por ejemplo: obtener plasma, sangre completa o ambas.

2. Disminuye la posibilidad de error por dilución con líquido tisular o constricción de los vasos sanguíneos por el frío o la emoción, fenómeno que pueden presentarse durante la punción capilar.

RECOMENDACIONES:

1. La muestra puede guardarse en refrigeración entre 4 y 10°C, bien tapada, si no es posible procesarla antes de 3 horas.
2. Es recomendable que las muestras no se congelen porque en el calentamiento los eritrocitos se hemolizan.

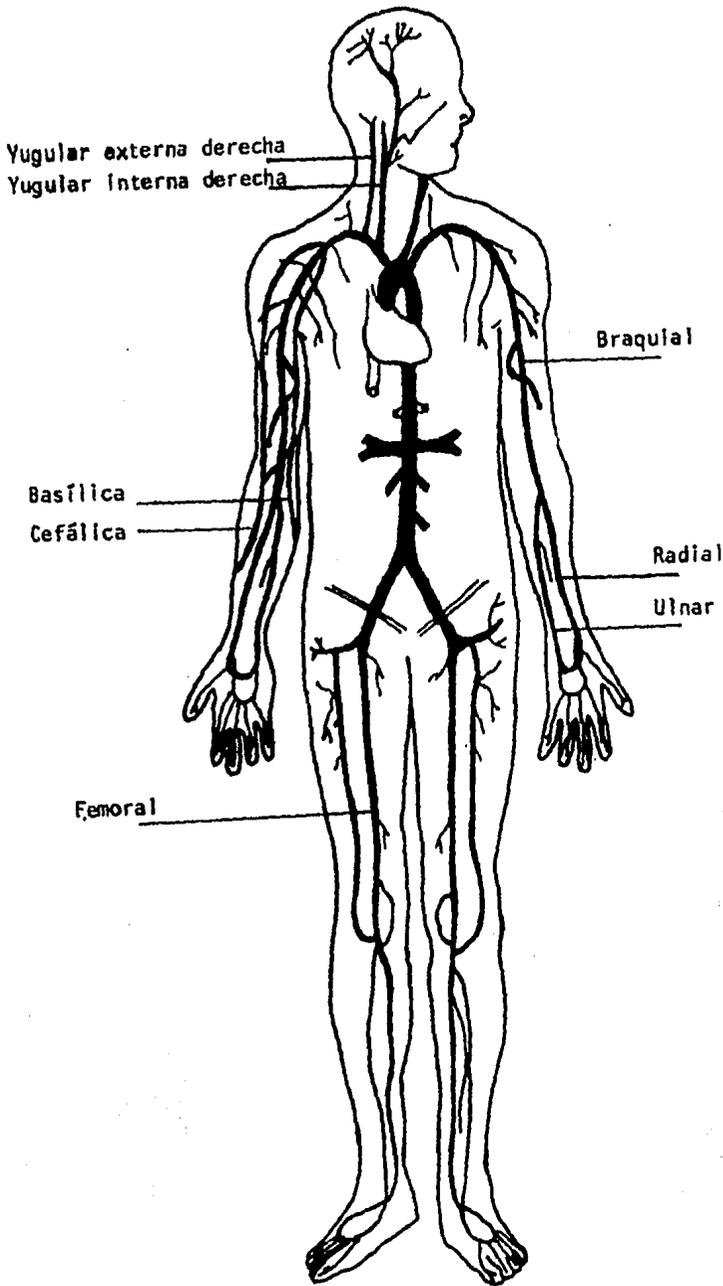


FIG. 2 PRINCIPALES ZONAS DE PUNCION

Se utiliza cuando la punción venosa resulta difícil, por ejemplo_ en los niños y en casos de quemaduras extensas y cuando se requiera de pequeñas cantidades de sangre (hemoglobina, recuento de glóbulos blancos o rojos y de plaquetas, frotis de sangre y microanálisis bicoquími-cos). (2, 3)

Los sitios de elección son: lóbulo de la oreja, pulpejo del dedo. En niños en el pulpejo del dedo gordo del pie o el talón

TECNICA

MATERIAL Y REACTIVO

Material:

Capilares heparinizados
Lancetas estériles, desechables
Torundas de algodón

Reactivos:

Etanol al 70%

METODOLOGIA

Efectuar limpieza del sitio elegido para la punción con una torunda de algodón humedecida con etanol al 70%. La punción es de 2-3 mm con una lanceta estéril, se hará de un solo golpe y con rapidez.

La primera gota de sangre que salga se desecha porque contiene líquidos hísticos. Las siguientes gotas se recogen con capilares de vidrio heparinizados. Puede hacerse con un poco de presión a 2 cm aproximadamente de distancia del pinchazo. No exprimir para evitar diluir la sangre con líquido tisular. Una vez colectada la muestra suficiente - aplicar al lugar de la punción una torunda de algodón y se presiona durante 5-10 min. (4)

Si se desea pinchar el talón hay que frotarlo un rato para calentarlo o aplicar una compresa empapada de agua caliente. Si no se hace así tal vez se obtengan valores considerablemente mas altos que con sangre venosa, sobre todo en los recién nacidos.

ANTICOAGULANTES EMPLEADOS EN EL LABORATORIO
DE HEMATOLOGIA

Objetivo:

1. Conocer las diferentes soluciones anticoagulantes, que pueden emplearse en el laboratorio de hematología.
2. Señalar las limitaciones de cada una de ellas.

1. IONIZANTES: EDTA al 10%, sol. de citrato de sodio al 3.8%

Ácido Etilendiaminotetracético (EDTA)

Pueden usarse las sales dipotásica o disódica, aunque la segunda es la más soluble. Se prepara una solución al 10% y se utiliza 1 mg por cada ml - de sangre. Su exceso produce cambios degenerativos en las células. El uso adecuado evita la aglutinación de plaquetas. Es el anticoagulante de elección para la biometría hemática.

Citrato de Sodio

A nueve partes de sangre se le adiciona una parte de la solución de citrato de sodio al 3.8%, por ejemplo, a 2.5 ml de sangre se le agrega 0.25 ml de citrato. Evita la aglutinación de plaquetas, se usa para pruebas de coagulación. (1,2)

2. PRECIPITANTES: Oxalato de amonio y potasio, oxalato de potasio.

Oxalato de amonio y potasio (llamada mezcla de Paul Heller).

Se prepara de la siguiente forma: tres partes de oxalato de amonio y dos partes de oxalato de potasio. De esta manera se usan 2 mg por cada ml de - sangre. Su utilidad en extensiones sanguíneas es limitada, ya que causa de- generación de los granulocitos.

Oxalato de potasio al 30%

Se usan 0.01 ml de ésta solución por cada ml de sangre o una solución al 2% y usando 0.5 ml de ésta por cada 4 ml de sangre. Estas soluciones - (tanto la mezcla de Paul-Heller como el oxalato de potasio) deben evaporar se a sequedad una vez que fueron puestas en tubos de recolección de la san gre.

3. ANTITROMBINICO

Heparina

Polisacáridos en su forma de sales de sodio y potasio. Se usa seco - porque evita la hemólisis, 0.1 a 0.2 mg por cada ml de sangre. Recomendable en la investigación de anemia hemolíticas, fragilidad osmótica. No de be utilizarse para preparar extendidos sanguíneos.

4. MECANICO

Desfibrinación

Usando perlas de vidrio con agitación secundaria. Es útil en la inves tiguación del fenómeno L.E. (3)

BIBLIOGRAFIA

1. Gradwohl's, R.
CLINICAL LABORATORY METHODS AND DIAGNOSIS
7a. edición. Vol. I
U.S.A. (1970)

2. Lynch, J.M. y col.
METODOS DE LABORATORIO
2a. edición
Ed. Interamericana
México (1972)

3. Tietz
QUIMICA CLINICA MODERNA
1a. edición
Ed. Interamericana
México (1972)

4. Todd, C. J. and et al.
CLINICAL DIAGNOSIS AND MANAGEMENT
Ed. W. B. Saunders Co.
U.S.A. (1979)

CAPITULO II
BIOMETRIA HEMATICA

DETERMINACION DE HEMOGLOBINA

Objetivo:

1. Cuantificar la hemoglobina existente en una muestra.
2. Evaluar las ventajas, desventajas y limitaciones del método.

Generalidades: La hemoglobina es la proteína pigmentada de rojo que da a la sangre ese color característico. Se encuentra casi totalmente en los eritrocitos, sus principales funciones son: fijación, transporte y liberación de oxígeno.

NOMENCLATURA DE DERIVADOS DE HEMOGLOBINA		
TERMINO USADO	SIMBOLO	OTROS TERMINOS
Hemoglobina	Hb	
Oxihemoglobina	Hb O ₂	
Carboxihemoglobina	Hb CO	
Sulfohemoglobina	SHb	
Carboxisulfohemoglobina	SHbCO	
Hemiglobina	Hi	Metahemoglobina
Hemiglotina cianuro	HiCN	Cianometahemoglobina

La hemoglobina se forma en el eritrocito en desarrollo dentro de la médula ósea. La formación más rápida ocurre en el normoblasto policromatófilo, cuando se produce el 80% aproximadamente de la hemoglobina que llevará el glóbulo maduro. Aunque puede formarse hemoglobina en el reticulocito y, en circunstancias especiales en el eritrocito no reticulado y no maduro, en condiciones normales su formación solo tiene lugar en los normoblastos en desarrollo dentro de la médula ósea. (2)

La Hb tiene un peso molecular de aproximadamente 64,458 y se considera que tiene forma elipsoidal. Está compuesta por dos medias moléculas idénticas, donde cada mitad de molécula contiene dos cadenas diferentes de péptidos, que han sido denominados X y B con 142 y 146 aminoácidos respectivamente.

Además de la porción proteínica, la molécula de hemoglobina contiene cuatro grupos Hem. Cada grupo Hem es una estructura porfirínica cíclica que contiene un átomo de hierro quelado (protoporfirina ferrosa), o sea la unión de cuatro anillos pirrólicos con un nitrógeno en su vértice, conectados por enlaces metálicos y con hierro en el centro. La globina equivale al 96% y el Hem al 4% de la hemoglobina. (1) (Fig.1)

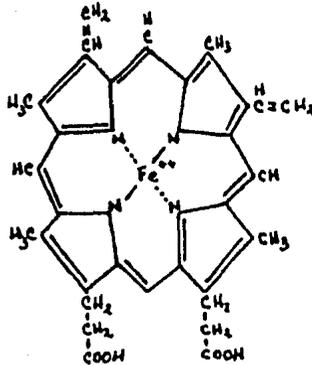


FIG.1 GRUPO HEM

La hemoglobimetría es la medida de la concentración de hemoglobina en la sangre. La anemia, una disminución de la concentración de hemoglobina por debajo de lo normal, del recuento de eritrocitos o el hematocrito, constituye una alteración muy corriente y una frecuente complicación de otras enfermedades.

Las técnicas usadas para la determinación de hemoglobina incluyen: Hematina ácida, Hematina alcalina, Cianohematina, Hemocromógeno de piridina, Carboxihemoglobina, Oxihemoglobina, Cianometahemoglobina, todos ellos basados en las características espectrales de la hemoglobina.

En 1966 el Comité Internacional de estandarización de Hematología - aceptó y recomendó el método de la cianometahemoglobina como de rutina, - ya que presenta las siguientes ventajas.

1. Las soluciones de cianometahemoglobina son las más estables de los diversos pigmentos hemoglobínicos. Puede afirmarse que las soluciones de cianometahemoglobina se mantienen estables no menos de seis meses en refrigeración.
2. Todas las formas de hemoglobina que pueden encontrarse en la sangre (oxihemoglobina, hemoglobina reducida, carboxihemoglobina y metahemoglobina excepto la sulfometahemoglobina) se convierten íntegramente en cianometahemoglobina por la adición de un reactivo.
3. Estas soluciones se pueden estandarizar exactamente.
4. La banda de observación de la cianometahemoglobina encuentra su máximo a una longitud de onda de 540 nm. por lo que pueden emplearse fotómetros de filtros y espectrofotómetros. (4.5)

Fundamento: En medio ligeramente alcalino el Fe^{++} del grupo hemo de la hemoglobina, oxihemoglobina y carboxihemoglobina es oxidado al estado Fe^{+++} por ferricianuro para formar metahemoglobina. La metahemoglobina se combina con el cianuro de potasio ionizado produciendo la cianometahemoglobina que es estable y se mide fotométricamente a 540 nm.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

- Anticoagulante EDTA al 10% (sol. disódica)
- Solución estándar de cianometahemoglobina de 60mg/dl
- Solución de Drabkin (solución diluyente)

Material:

- Tubos de ensaye de 13X100 mm
- Pipetas serológicas de 5 ml
- Pipetas de Sahli
- Boquilla
- Gradilla para tubos
- Celdas de 10 mm de paso de luz
- Gasa

Material Biológico

- Sangre capilar o venosa con anticoagulante

Equipo:

- Fotocolorímetro o Espectrofotómetro
- Agitador para tubos

1. Se colocan exactamente 5.0 ml de la solución de Drabkin en un tubo de ensaye de 13X100 mm.

2. Homogenizar perfectamente bien la sangre. Tomar exactamente 0.02 ml (20 ul) de sangre con una pipeta de Sahli y limpiar cuidadosamente con una gasa el exterior de la pipeta.

3. Transferir la sangre de la pipeta de Sahli al tubo que contiene la solución de Drabkin, enjuagando 3 veces la pipeta. Dilución 1:251

4. Se mezcla la sangre y la solución . Se dejan en reposo durante 10 minutos para permitir la formación de la cianometahemoglobina.

5. Leer a 540 nm en espectrofotómetro o a 550 nm en fotocolorímetro - contra un blanco de reactivos (solución diluyente). Extrapolar en la curva de calibración.

CURVA DE CALIBRACION

Se usan soluciones de cianometahemoglobina estables de concentración correcta y conocida y que son evaluadas por estandarización comercialmente.

1. Preparar 5 tubos de ensaye de 13X100 mm de acuerdo a la tabla siguiente:

TUBO	SOLUCION DE DRABKIN	SOLUCION ESTANDAR	CONCENTRACION g/dl
Blanco	5.0 ml	0.0	0
1	4.0 ml	1.0 ml	
2	3.0 ml	2.0 ml	
3	2.0 ml	3.0 ml	
4	1.0 ml	4.0	
5	0.0	5.0	

Las ampollitas comerciales de estándar son diluciones de cianometahemoglobina en líquido de Drabkin a concentraciones conocidas.

2. Obtener la concentración de hemoglobina equivalente para cada tubo empleando la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{ml estándar} \times \text{concentración estándar g/dl}}{\text{ml totales}} \times 251 = \text{g de Hb/dl}$$

Ejemplo:

Para el tubo No. 2. Si la concentración del estándar es 0.08 g/dl, aplicando la fórmula anterior calculamos la concentración de Hemoglobina correspondiente:

$$\begin{aligned} \text{ml estándar} &= 2 \\ \text{concentración estándar} &= 0.08 \text{ mg/dl} \\ \text{ml totales} &= 5 \end{aligned}$$

$$\frac{2 \text{ ml } (0.08 \text{ g/dl})}{5 \text{ ml}} \times 251 = 8.06 \text{ g Hb/dl}$$

$$\text{Tubo No. 2} = 8.06 \text{ g Hb/dl}$$

3. Los resultados obtenidos se grafican colocando en las abscisas la concentración de hemoglobina g/dl y en las ordenadas las lecturas de extinción.

El factor 251 resulta de la relación entre volumen total y volumen de la muestra.

$$\begin{aligned} \text{Volumen total} &= \text{volumen muestra} + \text{volumen reactivo} \\ &= 0.02 \text{ ml} + 5 \text{ ml} \end{aligned}$$

Tenemos que:

$$\frac{5.02}{0.02} = 251$$

VALORES DE REFERENCIA

Varones: 14 - 18 g Hb/dl
2.09 - 2.77 mmol de Hb/l

Mujeres 12 - 16 g Hb/dl
1.86 - 2.48 mmol Hb/l

Para convertir g/dl de Hb a mmol/l, se hace uso de la siguiente ecuación:

$$\text{g/dl} \times \frac{10}{\text{masa molecular Hb}} = \text{mmol/l}$$

Sí la masa molecular de la hemoglobina es 64 458, tenemos que el factor es 0.15.

NOTA:**Precauciones en el empleo del reactivo de Drabkin.**

Las sales y soluciones de cianuro son venenosas y hay que evitar llevarlas a la boca o inhalar sus vapores, por lo que debe emplearse una perilla de succión para llenar las pipetas con la solución de Drabkin.

Si la solución de Drabkin se prepara en el laboratorio, téngase especial cuidado en el manejo del producto químico. Si al pesarlo se cae accidentalmente en la mesa o en el suelo, recójase el polvo seco con un trapo húmedo. Luego se desecha el trapo en un recipiente cerrado a propósito. La solución o el polvo no se debe dejar en un fregadero que contenga ácido. La solución puede tirarse al fregadero solo si corre agua abundante.

Si se observa un cambio de color en el reactivo este debe desecharse. Este reactivo es estable durante varios meses (de 9 a 12) si se guarda en frascos color ámbar, bien tapados y en refrigeración.

BIBLIOGRAFIA

1. Leavell, B. S., Thorup, O.A.
HEMATOLOGIA CLINICA
4a. edición
Ed. Interamericana
México (1977)
2. Rapaport, S. I.
INTRODUCCION A LA HEMATOLOGIA
Ed. Salvat
Barcelona (1974).
3. Schmidt, R. M., and Brosious,
E. M.
BASIC LABORATORY METHODS OF
HEMOGLOBINOPATHY DETECTION
7a. edición

4. Todd, C. J. and et al.
CLINICAL DIAGNOSIS AND MANAGEMENT
6a. edición
Ed. W. B. Saunders Co.
U.S.A. (1979).

5. Weatherburn, N. W., and Logan, J. E.
"The effect of freezing on the potassium
ferricyanide-potassium cyanide reagent
used in the cyanmethemoglobin procedure
for hemoglobin determination".
Clinica Chimica Acta, 9, 581 (1961).

6. Zijlstra, W. G., and Van Kampen, E. J.
"Standardization of hemoglobinometry. II
The hemoglobincyanide method". Clinica
Chemica Acta, 6, 538 (1961).

HEMATOCRITO

Objetivo:

1. Explicar los fundamentos de las técnicas de hematocrito.
2. Evaluar su importancia diagnóstica.

Generalidades: El hematocrito representa la proporción de glóbulos rojos en la sangre circulante y se expresa en volumen por ciento.

Este valor depende del número de hematíes circulantes, de la forma y tamaño de los mismos. Dada la simplicidad y rapidez de su medición, puede utilizarse como índice relativo de las variaciones de glóbulos rojos.

Un valor hematocrito alto puede ser secundario a poliglobulia o a disminución del volumen plasmático-hemoconcentración. En estas falsas poliglobulias se obtiene valores hematocritos muy elevados que pueden llegar al 60-70%. Un valor hematocrito reducido se encuentra en todas las anemias (1).

Fundamento: El hematocrito es el volumen de eritrocitos expresado como un porcentaje del volumen de sangre total existente en una muestra. Es determinado en sangre con anticoagulante por medio de centrifugación y es expresado como el volumen de eritrocitos por dl de sangre.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10% (sol. disódica)

Material:

Tubos de ensayo de 13X100 mm

Tubos de Wintrobe de 11.5 cm de largo por 3 mm de luz,
graduados

Pipetas Pasteur con bulbo

Capilares

Plastilina

Material Biológico:

Sangre capilar o venosa con anticoagulante

Equipo:

Centrífuga para capilares

Centrífuga

MACROMETODO DE WINTROBE

METODOLOGIA

El tubo de hematocrito de Wintrobe, es un tubo de cristal de paredes gruesas con un orificio interno uniforme y un fondo aplanado. Tiene marcado en el exterior del lado izquierdo de la columna de 0 - 10 cm y en el derecho 10 - 0 cm comenzando en el tope del tubo. Cada división representa 1 cm y cada división pequeña 1 mm. Para convertir la lectura a por ciento cuando el tubo está lleno hasta el tope (marca 10 cm), multiplicar la lectura en cm de la columna de eritrocitos por 10 o leer directamente en milímetros.

1. Homogeneizar perfectamente la muestra.
2. Con una pipeta Pasteur llenar con sangre un tubo de Wintrobe hasta la marca 10. Evitar la formación de espuma. El tubo de Wintrobe tiene 1 ml de volumen.
3. Centrifugar a 2,200 rpm durante 30 minutos.
4. La lectura se realiza en la línea de separación superior de la columna de glóbulos rojos, donde empieza la de glóbulos blancos.

MICROHEMATOCRITO

1. Se llenan las 2/3 partes de dos tubos capilares. Puede hacerse también a partir del punto de punción con dos capilares heparinizados.

2. El extremo vacío se cierra con flama, o con plastilina efectuando un movimiento de rotación.

3. Colocarlos en los canales o surcos radiales del aparato de centrifugación (cabezal ranurado con numeración para colocar los capilares) con el extremo cerrado dirigido hacia afuera. Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min. El aire del extremo externo del capilar será desplazado en el curso de la centrifugación.

4. Los tubos capilares no están graduados. La longitud de toda la columna, que incluye el plasma y de la columna de eritrocitos sólo debe medirse en cada caso con una regla milimetrada o con aparatos disponibles.

CALCULOS:

Calcular el % del paquete eritrocítico con relación al volumen total.

L1 - 100%

L2 - X

en donde:

L1 = volumen total

L2 = paquete eritrocítico

VALORES DE REFERENCIA

Varones	47%	±	2.5
Mujeres	42%	±	2.5
Niños	35%	±	5
Recién nacidos	56%	±	10

BIBLIOGRAFIA

1. Dacie, J. V., Lewis, S. M.
PRACTICAL HAEMATOLOGY
5a. edición
Ed. Churchill Livingstone
London (1975).
2. Leeson, D., and Reeve, E. B. "The plasma in the packed cell column of the hematocrit". *Journal of Physiology*, 115, 129 (1951).
3. Strumia, M.M., Sample, A.B. and Hart, E.D. "An improved micro hematocrit method". *American Journal of Clinical Pathology*, 24, 1016 (1954).

RECUESTO DE ERITROCITOS

Objetivo:

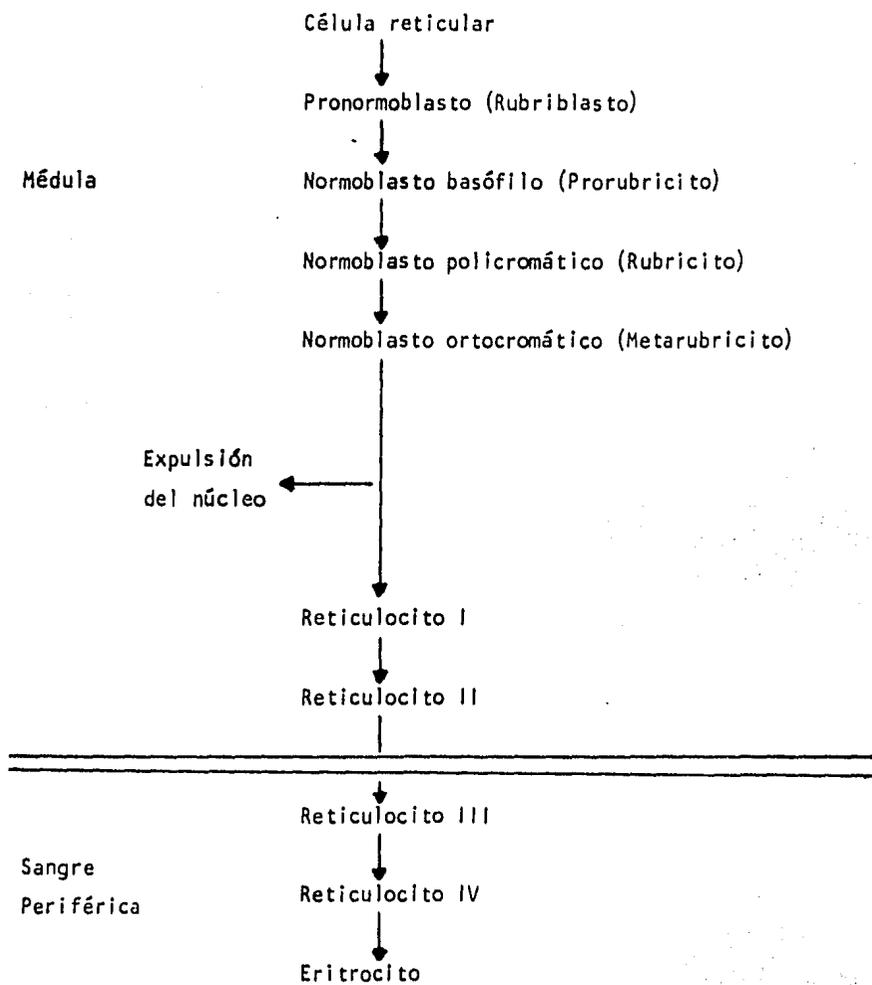
1. Efectuar el recuento de eritrocitos.
2. Evaluar las ventajas y desventajas del uso de la cámara de Neubauer.

Generalidades: Los glóbulos rojos o eritrocitos son células que carecen de núcleo, tienen forma de un disco bicóncavo, con un diámetro promedio de 8 μ , 2 μ de espesor y 90 μ^3 de volumen. (4)

Los principales componentes del eritrocito son: 1) membrana celular - delgada y 2) hemoglobina, en concentración aproximada de 33 por 100, en el interior - Además de la hemoglobina hay pequeñas cantidades de otras sustancias como proteínas (estromatina, elinina) y lípidos (cefalina, lecitina, colesterol) que constituyen las estructuras de la célula, como membrana y armazón interna. Otras son enzimas (catalasa, anhidrasa carbónica), minerales (Cu, Zn) y sustancias secundarias (hemocupreína, ergotioneína, glutatión) importantes para el metabolismo interno de la célula. (3)

Cuando la eritropoyesis tiene lugar normalmente, su resultado final es la producción de una célula-eritrocito perfectamente diferenciada y apta para su función principal que es la de transportar oxígeno y bióxido de carbono. El oxígeno difunde por la membrana pulmonar a la sangre, y después - atraviesa la membrana celular para combinarse con la hemoglobina que contienen los eritrocitos. Cuando los eritrocitos llegan a los capilares tisulares, ocurre lo contrario. La hemoglobina pone en libertad el oxígeno, que se difunde a los tejidos. La falta de núcleo del eritrocito, le confiere la virtud de acarrear el oxígeno sin consumir prácticamente nada de él; su forma bicóncava es la que mejor se presta para evitar y afrontar la hemólisis; su membrana no admite la salida de la hemoglobina. (DIAGRAMA 1)

DIAGRAMA I. ERITROPOYESIS



En el feto, los eritrocitos se forman en estos sitios: 1) saco vitelino; 2) hígado; 3) bazo y 4) médula ósea. En el recién nacido la eritrogénesis solo ocurre en la médula ósea.

Los eritrocitos permanecen en la circulación en promedio de 120 días antes de desintegrarse. El equilibrio entre la formación y la destrucción de los hematíes en la sangre se mantiene de manera fija, por lo que se tiene una masa hemoglobínica bastante constante en la circulación. La anemia surge cuando aumenta la eliminación de hematíes de la sangre y no se puede compensar por un aumento de la producción o cuando la oferta de hematíes o de hemoglobina a la sangre ha disminuído, o cuando los dos procesos ocurren a la vez.(2)

Fundamento: La sangre es diluída con un líquido isotónico (Hayem o Gówers).

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10% (sol. disódica)
Líquido de Hayem o Gówers

Material:

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
Pipetas de Thoma para glóbulos rojos
Cámara de Neubauer con cubrehematímetro
Boquilla
Gradilla para tubos
Gasa

Material Biológico:

Sangre capilar o venosa con anticoagulante

Equipo:

Microscopio

Agitador de pipetas de Thoma

METODOLOGIA

Pipeta para el recuento de eritrocitos. Las pipetas de Thoma están constituidas por dos porciones capilares y un bulbo central. El tubo capilar inferior está dividido en 10 partes iguales con marcas de 0.5, 1.0 y 101.

En el interior del bulbo existe una perllita de plástico (rojo) para favorecer la mezcla de la sangre con el líquido. (16.4)

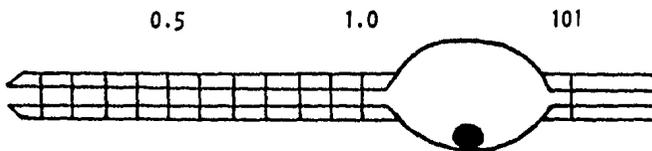
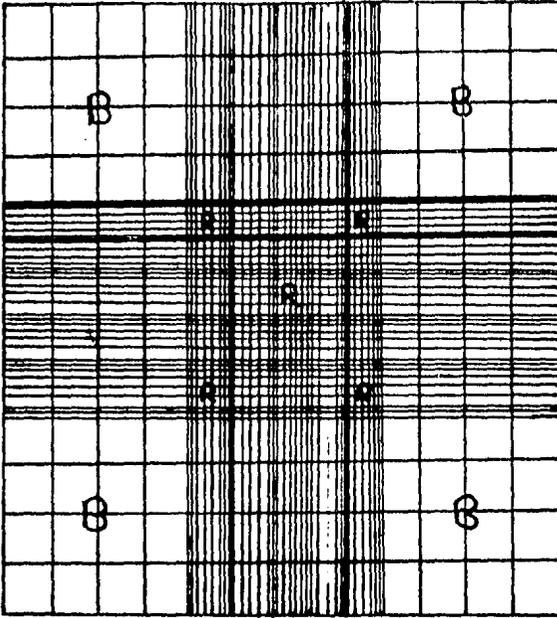


FIG. 4 PIPETA PARA EL RECUENTO DE ERITROCITOS

Cámara de Neubauer.

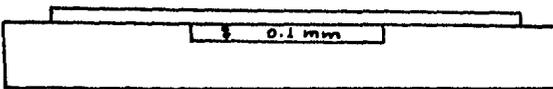
La Cámara de Neubauer se usa para la cuenta directa de células. La superficie de la cámara está formada por 2 áreas rayadas. Cada área rayada consiste en un cuadro de 3 mm por cada lado con una superficie total de 9 mm^2 , dividida en 9 cuadros grandes de 1 mm^2 cada uno. Los cuatro cuadros grandes de las esquinas (divididos a su vez en 16 cuadros para facilitar la lectura) son los que usualmente se emplean para contar leucocitos. De los 9 cuadros grandes el central es el único que está dividido en 25 - cuadros (y cada uno de estos a su vez en 16 cuadros pequeños para facilitar la lectura) y se emplean para contar glóbulos rojos. (2) (FIG. 5)

1. Llenar con sangre bien mezclada una pipeta de Thoma para glóbulos rojos hasta la marca 0.5. Limpiar cuidadosamente con gasa la parte exterior de la pipeta.
2. Completar el volumen hasta la marca 101 con la solución de Hayem. Dilución 1:200. Sostener la pipeta casi horizontalmente con objeto de evitar la aspiración de burbujas de aire, cuando ésta está casi llena, la pipeta debe colocarse en posición vertical.
3. Agitar durante 3 minutos.
4. Colocar el cubrehematímetro sobre la cámara de Neubauer.
5. Eliminar las primeras 4-5 gotas de la pipeta de Thoma, llenar la cámara por uno de los bordes del cubrehematímetro. Dejar que el líquido penetre por capilaridad entre la superficie de la cámara de Neubauer y el cubrehematímetro hasta que la plataforma de recuento esté completamente cubierta.
6. Reposar 3-5 minutos.
7. Localizar la cuadrícula con el objetivo de 10X y posteriormente efectuar el recuento de eritrocitos contenidos en 80 cuadros pequeños, uno central y cuatro de los extremos de los 25 cuadros presentes en el área -



Area de 1 B = 1 mm^2 Dividido en 16 cuadros, para contar
Glóbulos Blancos.

Area de 1 R = 0.04 mm^2 Dividido en 25 cuadros (y cada uno
de estos a su vez en 16 cuadros pequeños), para contar -
Glóbulos Rojos.



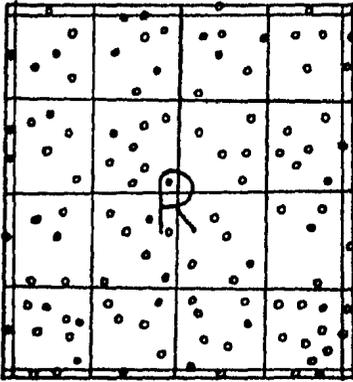
Profundidad de la Cámara de Recuento = 0.1 mm

Fig. 5: CAMARA DE NEUBAUER

central de 1 mm^2 (ver diagrama). Usar el objetivo de 40X.

NOTA:

Se sugiere la regla siguiente para evitar confusiones en los recuentos celulares que bordean los límites: los eritrocitos que contactan con cualquiera de las tres líneas o la única línea de la izquierda y los límites superiores de los cuadros pequeños deben contarse como si estuvieran dentro de los cuadrados, pero los que contactan con alguna de las líneas situadas sobre los bordes derecho y el fondo de los cuadros pequeños no deben contarse. De esta manera se evita el contar dos veces las mismas células. Las células se cuentan en cada uno de los cuadros pequeños, primero de izquierda a derecha, empezando por la parte superior de cuatro cuadros pequeños y luego de derecha a izquierda para la próxima hilera y así sucesivamente. El número de células para cada uno de los 5 grupos de 16 cuadrados se registra por separado y se suman los resultados. (FIG. 6)



$6 \rightarrow 7 \rightarrow 7 \rightarrow 4$
 \downarrow
 $7 \leftarrow 8 \leftarrow 5 \leftarrow 6$
 \downarrow
 $6 \rightarrow 7 \rightarrow 5 \rightarrow 4$
 \downarrow
 $8 \leftarrow 5 \leftarrow 6 \leftarrow 8$

FIG. 6 EJEMPLO PARA EL RECUENTO CELULAR

CALCULOS:

Para conocer el número de eritrocitos por milímetro cúbico ($1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ ul}$), se hace uso de la siguiente fórmula:

$$\frac{N \times 200 \times 10 \times 40}{80} = N \times 10,000 = \text{eritrocitos} / \text{mm}^3$$

$$= \text{eritrocitos} / \text{ul}$$

en donde:

- N = número de eritrocitos contados
- 10 = corrección por la altura de la cámara
- 200 = factor de dilución
- 40 = cuadrillos pequeños presentes en el cuadro central
- 80 = cuadrillos en los que se efectuó el conteo de eritrocitos

VALORES DE REFERENCIA

Varones: $4.5 \times 10^6 - 5.5 \times 10^6$ eritrocitos / mm^3 o
eritrocitos / ul

Mujeres: $4.3 \times 10^6 - 5.0 \times 10^6$ eritrocitos / mm^3 o
eritrocitos / ul

FUENTES DE ERROR:

1. Homogenización incorrecta de la muestra con el anticoagulante o con la sol. diluyente.
2. Contaminación del líquido.
3. Hemoconcentración.
4. Masaje excesivo, extracción de sangre de una piel pálida, fría o cianótica.
5. Pipeta sucia o húmeda.
6. Llenado incorrecto de la cámara de Neubauer.
7. Conteo incorrecto de células rojas.

METODO AUTOMATIZADO

RECUESTO ELECTRONICO DE LOS ERITROCITOS

1. Recuento de impulsos eléctricos. Las células que atraviesan una abertura por la cual está pasando una corriente provocan cambios en la resistencia eléctrica que se registran como impulsos eléctricos.

2. Recuento con luz dispersa. En los contadores ópticos eléctricos, un tubo fotomultiplicador detecta la luz dispersa, por reflexión externa de las superficies celulares o por transmisión y refracción a través de las células o de la luz difraccionada que pasa tangencial a las superficies celulares. (1,2)

VENTAJAS;

- a) Menor cantidad de reactivos

- b) Prontitud en la realización de la técnica

- c) Disminuyen los errores comunes de las técnicas manuales.

BIBLIOGRAFIA:

1. Biggs, R., and Mac Millan, R.L.
"The error of the red cell count"
Journal of Clinical Pathology,
1,288 (1948).

2. Gradwohl's, R.
CLINICAL LABORATORY METHODS AND
DIAGNOSIS
7a. edición. Vol. I
Ed. Mosby Co.
U.S.A. (1970).

3. Guyton, A. C.
FISIOLOGIA HUMANA
3a. edición
Ed. Interamericana
México (1969)

4. Vélez, A. O.
INTRODUCCION A LA HEMATOLOGIA
FUNDAMENTOS Y TECNICAS
Ed. Sociedad Mexicana de Hematología
México (1970).

Objetivo:

1. Realizar la técnica del recuento de reticulocitos.

2. Señalar las aplicaciones de la técnica y evaluar las ventajas y limitaciones de la misma.

Generalidades: Los reticulocitos son eritrocitos inmaduros que carecen de núcleo, contienen restos de ribosomas y filamentos de ácido ribonucleico que da lugar a una basofilia difusa en el reticulocito. Los filamentos de RNA, llamados retícula, no pueden ser demostrados por una simple tinción de Wright.

De acuerdo al grado de maduración y distribución de retículo, los reticulocitos pueden ser clasificados en cuatro grupos:

RETICULOCITO			
INMADURO		MADURO	
GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
Retículo denso	Retículo flojo	Retículo incompleto	Gránulos

En las coloraciones vitales empleando los colorantes azul de metileno o azul de cresil brillante, los gránulos o filamentos azules representan ribosomas y RNA precipitado en los reticulocitos, dando lugar a una basofilia difusa. (2)

El número de reticulocitos normal en la sangre periférica refleja una actividad eritropoyética normal y hay una liberación de reticulocitos de la médula ósea que permanecen en circulación su período de tiempo correspondiente. Cuando la actividad eritropoyética se ve incrementada, lleva a una liberación prematura de reticulocitos con un aumento del tiempo de maduración en sangre periférica. (4)

Fundamento: El ácido ribonucleico presente en los reticulocitos puede observarse mediante una coloración supravital empleando el colorante nuevo azul de metileno o el colorante azul de cresil brillante.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10% (sal disódica).
Solución de nuevo azul de metileno al 0.5%
Solución de azul de cresil brillante al 1%
Colorante de Wright
Amortiguador de fosfatos pH 7.2

Material:

Tubos de ensaye de 13 X 75 mm
Pipetas Pasteur con bulbo
Aplicadores de madera
Portaobjetos limpios y desengrasados
Gradillas para tubos

Material Biológico:

Sangre capilar o venosa con anticoagulante

Equipo:

Microscopio
Aceite de inmersión

METODOLOGIA

1. Colocar 3 gotas de solución de nuevo azul de metileno al 0.5% en un tubo de ensaye de 13X75 mm (puede usarse también solución de azul de - cresil brillante al 1%), añadir 3 gotas de la muestra de sangre del pacien te.

2. Agitar cuidadosamente y mezclar perfectamente. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (si se uso solución de azul de cresil brillante in- cubar 15 minutos a 20°C).

3. Hacer una extensión en un portaobjetos utilizando una gota de la mezcla (realizar la extensión de igual manera que para una cuenta diferencial).

4. Dejar secar al aire. Teñir con el colorante de Wright. (paso opcional).

5. Observar al microscopio empleando la lente de inmersión contar 1,000 eritrocitos, anotando el número de reticulocitos observados dentro de este conteo. Los reticulocitos son aquellas células que contienen material de coloración azul oscuro en forma de gránulos o filamentos.

CALCULOS

$$\frac{\text{Número de reticulocitos contados}}{1,000} \times 100 = \text{Reticulocitos \%}$$

en donde 1,000 es el número de eritrocitos contados.

Para calcular el valor absoluto de reticulocitos se emplea la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Reticulocitos \%}}{100} \times \text{Cuenta de eritrocitos} = \text{Reticulocitos /ul de sangre}$$

Ejemplo:

$$\text{Reticulocitos \%} = 1.2$$

$$\text{Cuenta de eritrocitos } 4.5 \times 10^6 \text{ Eritrocitos /ul sangre}$$

$$\text{Reticulocitos /ul sangre} = \frac{1.2}{100} (4.5 \times 10^6)$$

$$\text{Reticulocitos /ul sangre} = 54,000$$

VALORES DE REFERENCIA

De 0.5 a 1.5 Reticulocitos %

De 35,000 a 75,000 Reticulocitos /ul sangre

BIBLIOGRAFIA

1. Cline, M. J., and Berlin, N. I. "The reticulocyte count as an indicator of rate of erythropoiesis".
American Journal of Pathology, 39, 121 (1963).
2. Gradwohl's, R.
CLINICAL LABORATORY METHODS AND DIAGNOSIS
7a. edición. Vol. I
Ed. C. V. Mosby Co.
U.S.A. (1970).
3. Myhre, E. "Reticulocyte count".
Nordisk Medicin, 65, 37 (1961).
4. Todd, C. J. and et al.
CLINICAL DIAGNOSIS AND MANAGEMENT
6a. edición
Ed. W. B. Saunders Co.
U.S.A. (1979).

VELOCIDAD DE SEDIMENTACION DE LOS ERITROCITOS

Objetivo:

1. Efectuar la técnica de velocidad de sedimentación de los eritrocitos.
2. Analizar su importancia clínica.

Generalidades: En una muestra de sangre, el descenso de los glóbulos rojos causa desplazamiento hacia arriba del plasma, lo cual produce una corriente ascendente y una fuerza de retraso. En la sangre normal, las fuerzas descendente y ascendente son casi iguales y hay poca sedimentación. Cuando se aglomeran los eritrocitos, el aumento de peso de la masa tiene mayor efecto para aumentar la velocidad de sedimentación que el aumento de volumen para retrasarla. En consecuencia, cualquier estado que cause aglomeración de eritrocitos o formación de pilas de monedas aumentará la velocidad de sedimentación de los eritrocitos.(1,2)

En estado normal los eritrocitos no se aglomeran, porque tiene carga negativa y se repelen mutuamente. Se considera que un aumento de determinadas proteínas del plasma puede disminuir la carga negativa del hematíe y originar su aglomeración. El aumento de fibrinógeno guarda estrecha relación con el aumento de la VSE, pero también puede guardar relación con ella los aumentos en globulinas y alfa y gamma.

La sedimentación de los hematíes se efectúan en tres etapas: 1) etapa preliminar de aglomeración de hematíes; 2) período de descenso rápido, y 3) período de aglomeración final, cuando la masa de glóbulos rojos, al acumularse en el fondo del tubo disminuye la rapidez de sedimentación.

Las anemias, las infecciones bacterianas aumentan la VSE. A la inversa, la VSE suele ser muy lenta en pacientes policitémicos. La mayor parte de las virosis se acompañan de velocidad normal o con aumento mínimo. Las enfermedades de la colágena, las neoplasias y muchos trastornos gastrointestinales y renales se acompañan de aumento de la velocidad de sedimentación, que también se observa después de cirugía, quemaduras o traumatismos importantes. (1)

Fundamento: Los eritrocitos sedimentan porque su densidad es mayor - que la del plasma, por lo que la velocidad de sedimentación es la distancia (en milímetros) que descienden los eritrocitos por unidad de tiempo (generalmente una hora) desde la parte superior de una columna de sangre hasta la parte superior de la capa de hematíes.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10% (sol. disódica)

Material:

Tubos de ensaye de 13X100 mm

Tubos de Wintrobe de 11.5 cm de largo por 3 mm de luz,
graduado

Pipetas Pasteur con bulbo

Gradilla de sedimentación

Material Biológico:

Sangre capilar o venosa con anticoagulante

METODOLOGIA

1. Siga todos los pasos de la técnica del macrohematocrito para llenar un tubo de Wintrobe.
2. Después de que el tubo de Wintrobe esté lleno de sangre, taparlo con un tapón de hule o con tela adhesiva para evitar evaporación.
3. Poner el tubo en posición vertical en una gradilla de sedimentación por un lapso de 60 minutos.
4. Leer en la escala descendente de la izquierda el nivel en que se encuentra la zona de separación entre el plasma y los eritrocitos sedimentados.
5. Informar el resultado en milímetros en una hora.

VALORES DE REFERENCIA

Niños	0 a 20 mm por hora
Adultos: Mujeres	0 a 20 mm por hora
Varones	0 a 9 mm por hora

CORRECCION POR HEMATOCRITO

$$\frac{A}{Ht} \times 100 = VSE$$

A = mm después de centrifugar a 3 000 rpm 30'

Ht = Hematocrito

100 = volumen total del tubo

NOTA:

La VSE se corregirá cuando el valor de Ht de la muestra se encuentre por debajo de los valores de referencia.

BIBLIOGRAFIA

1. Dacie, J. V., Lewis, S. M.
PRACTICAL HAEMATOLOGY
5a. edición
Ed. Churchill Livingstone
London (1975).
2. International Committee for
Standardization in Hematology
"Standard techniques for the
measurement of redcell of
Haematology, 25, 801 (1973).

3. Jones, R. F. "Determination of packed cell volume by centrifugation".

Journal of clinical Pathology,
14, 198. (1961).

INDICES ERITROCITICOS

Objetivo:

1. Conocer los índices eritrocíticos, las ventajas y desventajas de su aplicación.
2. Definir estos índices y realizar la determinación de cada uno de ellos.

Generalidades: Las constantes del eritrocito o índice eritrocíticos son las siguientes y son útiles en la clasificación inicial de una anemia.

Volumen Corpuscular Medio (V C M)

Hemoglobina Corpuscular Media (H C M)

Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina (C C M H)

Se necesita tres valores básicos, que son: recuento de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito.

El aspecto de los eritrocitos sobre la extensión de sangre debe compararse siempre con los valores obtenidos para los índices.

Los índices eritrocitarios solamente son útiles si son razonables y exactos, esto depende de su precisión en las mediciones a partir de los cuales - aquellas son calculados, por lo que los contadores electrónicos son de gran utilidad. (1)

VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO
(VCM)

El VCM es el volumen medio de los eritrocitos individuales, en micras cúbicas (μ^3) o femtolitros (fl).

$$1 \text{ Femtolitro} = 10^{-15} \text{ litros} = 1 \mu^3$$

El VCM es calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hematocrito \%} \times 10}{\text{Número de eritrocitos (millones /mm}^3)}$$

Debe considerarse los artefactos y los cambios fisiológicos antes de suponer anomalías en el desarrollo de la célula. El VCM puede estar alto debido a una cuenta elevada de reticulocitos ya que las células jóvenes son más grandes que las células maduras. Aún cuando la cuenta de reticulocitos no esté importantemente elevada, puede ocurrir macrocitosis moderada debido a mayor estimulación de eritropoyetina. Un aumento en el VCM no explicable por error metodológico o por eritropoyesis estimulada indica una anomalía de maduración nuclear. Por otra parte la microcitosis implica alguna anomalía en la síntesis de hemoglobina.

VALORES DE REFERENCIA

VCM de 82 a 98 μ^3

Nota 1:

Si el hematocrito de una muestra de sangre es 32 y número de eritrocitos 4,000 000 /ul calcular VCM

$$\text{VCM} = \frac{32 \times 10}{4} = 80 \mu^3 = 80 \text{ fl}$$

HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA

La HCM es el contenido (peso) de hemoglobina en un hematíe individual medio, expresado en micromicrogramos (uug) o picrogramos (pg).

Se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hemoglobina (g/dl de sangre)} \times 10}{\text{Número de eritrocitos (millones/ul)}}$$

En la mayoría de las anemias las variaciones del tamaño medio de los eritrocitos (VCM) van paralelas a cambios similares del peso de su hemoglobina (HCM). Por tanto el VCM y la HCM dan variaciones similares. La HCM es más sensible para detectar una disminución en la síntesis de hemoglobina en la célula ya que combina los déficits de VCM y CCMH disminuidos.

Nota 2:

Hb 11g/dl
eritrocitos 4,200,00

$$\text{HCM} = \frac{11 \times 10}{4.2} = 26 \text{ uug (pg)}$$

VALORES DE REFERENCIA

HCM de 27 a 33 pg.

CONCENTRACION CORPUSCULAR MEDIA DE HEMOGLOBINA

La CCHM es la concentración media de hemoglobina por 100ml de eritrocitos concentrados, se expresa en por ciento (%) y se calcula usando la siguiente fórmula)

$$\text{CCHM} = \frac{\text{Hemoglobina (g/dl de sangre)} \times 100}{\text{Hematocrito \%}}$$

La CCMH está disminuída por trastornos en la síntesis de hemoglobina aunque la anemia ferropénica es el único estado microcítico en la cual la CCMH cae abajo de 28. La CCMH también puede estar disminuída por pérdida de hemoglobina como con una hemoglobina inestable o con trastornos en la regulación del líquido de la célula que resulta en sobrehidratación de ésta. Un aumento de la CCMH puede verse en situaciones de pérdida de membrana (esferocitosis hereditaria).

Nota 3:

Hemoglobina 13 gr/dl; hematocrito 40%.

$$\text{CCMH} = \frac{13 \times 100}{40} = 32 \%$$

VALORES DE REFERENCIA

CCHM de 31 a 37%

BIBLIOGRAFIA

1. Miale, J. V.
LABORATORY MEDICINE HAMATOLOGY
4a. edición
Ed. C. V. Mosby Co.
St. Louis (1972).
2. Ponder, E., and Millar, W. G.
"Measurement of diameters of erythrocytes: I. Mean diameter of red cell of man".
Quarterly Journal of Experimental Physiology, 14, 67 (1933).

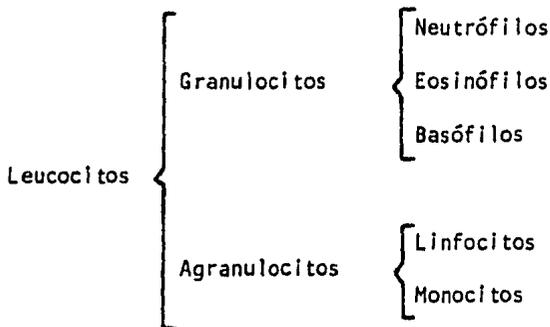
3. Westerman, M. P. Pierce, L. E., and Jensen, W. N. "A direct method for the quantitative measurement of red cell dimensions."
Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 57, 819 (1961).

RECUESTO DE LEUCOCITOS

Objetivo:

1. Efectuar la técnica del recuento de leucocitos.
2. Señalar las aplicaciones de la técnica y evaluar sus ventajas y limitaciones.

Generalidades: En la sangre del hombre normal pueden distinguirse - los siguientes tipos de leucocitos:



La producción de linfocitos es en sitios diseminados (bazo, ganglios linfáticos y otros tejidos linfáticos organizados), pero la producción de neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos está limitada a la médula ósea en el humano normal.

Los sistemas leucocitarios difieren de los sistemas eritroide y de las plaquetas en muchos aspectos. Los dos últimos efectúan su función en la sangre, mientras que la función de los leucocitos se lleva a cabo extra vascularmente. Por lo tanto, la sangre solo sirve como una vía que un leu cocito utiliza para trasladarse de un lugar a otro. (1)

El examen de los leucocitos comprende dos fases técnicas. Una fase - cuantitativa que determina el número de leucocitos totales, las cifras absolutas y relativas de las diversas formas de glóbulos blancos. Una segunda fase cualitativa que determina morfología celular. (2,4)

En ocasiones basta su examen para formular un diagnóstico específico, por ejemplo las leucemias; con más frecuencia puede ser de ayuda diagnóstica o establecen un pronóstico en relación al curso de la enfermedad.

Por estas y otras razones, el recuento de leucocitos es una de las - pruebas llamadas de rutina.

Fundamento: La sangre es diluida 1:20 con una solución hipotónica de acético glacial (líquido de Turk) que lisa a los eritrocitos maduros.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10% (sol. disódica)
Solución de Turk (líquido diluyente)

Material:

Tubos de ensaye de 13x100 mm
Pipetas de Thoma para glóbulos blancos
Cámara de Neubauer con cubrehematímetro
Boquilla
Gradilla para tubos
Gasa
Agitador para pipetas de Thoma

Material Biológico:

Sangre capilar o venosa con anticoagulante

METODOLOGIA

Las pipetas de cristal Thoma para glóbulos blancos, constan de un tubo capilar graduado, dividido en 10 partes y marcado con un 0.5 en la quinta - señal y con un 1 en la décima y, por encima nsanchamiento, bulbo o pera pa ra mezcla, con una bolita de cristal Blanca en su interior y por encima de la pera otro tubo capilar corto con una marca 11 grabado en la pipeta.(Fig.7)

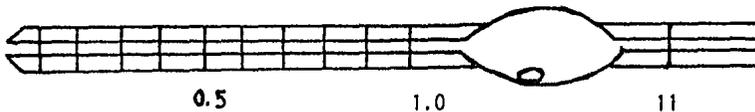


FIG. 7 PIPETA PARA EL RECuento DE LEUCOCITOS

1. Homogenizar perfectamente la muestra.
2. Con la pipeta de Thoma para glóbulos blancos, aspirar sangre hasta la - marca 0.5. Secar cuidadosamente con gasa la parte exterior de la punta de la pipeta.
3. Completar con líquido de Turk hasta la marca 11. Dilución 1:20.
4. Agitar durante 3 minutos.
5. Se desechan las primeras 4-5 gotas y se carga la cámara de Neubauer, - procedimiento descrito en el recuento de eritrocitos.
6. Dejar reposar la cámara con la muestra durante 3 minutos.
7. Ver el microscopio con objetivo de 10X.

8. Se cuentan los leucocitos en cada uno de los cuatro cuadrados grandes de las esquinas (de 1 mm^2) ver diagrama.

CALCULOS:

Para obtener la cifra de leucocitos por milímetro cúbico (ul) aplicar la siguiente fórmula:

$$\frac{N' \times 20 \times 10}{4} = N' \times 50 = \text{leucocitos / mm}^3 \text{ de sangre}$$

$$\text{leucocitos / ul de sangre}$$

en donde:

- N' = número de leucocitos contados
- 20 = factor de dilución
- 10 = corrección por la altura de la cámara
- 4 = número de cuadros de 1 mm^2 en los que se efectuó el conteo de leucocitos.

El factor 50 variará si se cambia la dilución y/o el número de cuadros contados.

CORRECCION POR PRESENCIA DE NORMOBLASTOS

En presencia de normoblastos debe efectuarse cuenta corregida de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{Recuento total de leucocitos} \times 100}{\text{NRN} \times 100} = \text{número verdadero de leucocitos / ul de sangre}$$

en donde:

NRN = número de eritrocitos nucleados que son contados
en el recuento por cada 100 leucocitos.

Ejemplo:

Un frotis de sangre muestra 20 eritrocitos nucleados -
por cada 100 leucocitos. El recuento total de leucoci-
tos es 9,000.

$$\text{Recuento verdadero de leucocitos} = \frac{9,000 \times 100}{120}$$

$$\text{Recuento verdadero de leucocitos} = 7,500 / \text{ul de sangre}$$

VALORES DE REFERENCIA

Adultos:	5,000 - 10,000 leucocitos / ul
Niños:	8,000 - 15,000 leucocitos / ul
Recién nacidos:	10,000 - 25,000 leucocitos / ul

BIBLIOGRAFIA

1. Gruchy, G. C.
CLINICAL HAEMATOLOGY IN MEDICAL
PRACTICE
3a. edición
Ed. Blackwell Scientific Pub.
Great Britain (1970).

2. Hynes, M. "The distribution of leucocytes on the counting chamber".
Journal of Clinical Pathology, 1, 25.
(1947-48).
3. Merck México, S.A.
CLINICAL LABORATORY
11ava. edición
Médico-chemical Investigation Methods
Federal Republic Germany (1970).
4. Sanders, C., and Skerry, D. W.
"The distribution of blood cells on
haemocytometer counting chambers with
special reference to the amended British
Standards Specification 748 (1958)"
Journal of Clinical Pathology 14, 298
(1961).

PREPARACION DE EXTENSIONES SANGUINEAS

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10% (sal disódica)

Material:

Tubos de ensaye de 13X100 mm con tapón de hule
Portaobjetos limpios y desengrasados
Cubreobjetos limpios y desengrasados

Material Biológico:

Sangre venosa o capilar con anticoagulante

METODO DE LOS DOS PORTAOBJETOS

1. Poner una gota de sangre (de 3 mm-5 aproximadamente de ancho) en un portaobjetos limpio y desengrasado a unos 19 mm de su extremo y teniendo cuidado de que el portaobjetos no toque la piel.

2. Colocar el portaobjetos en una mesa u otra superficie lisa.

3. Con el pulgar y el índice de la mano derecha se sujeta por el extremo un segundo portaobjetos contra la superficie del primero, con un ángulo de 40-45° (este portaobjetos debe tener de preferencia los bordes pulidos), se acerca a la gota de sangre hasta tocarla y se espera a que la sangre se reparta homogéneamente sobre la línea de contacto.

4. Se empuja lentamente el portaobjetos extensor a velocidad moderada hacia delante para que la sangre se extienda uniformemente sobre el otro portaobjetos por detrás del borde extensor, manteniendo el contacto entre ambos hasta que toda la sangre se haya extendido en una película moderadamente fina. (2, 4)

5. El frotis tendrá una longitud de aproximadamente 3-4 cm. Se vigilará que el extendido sea uniforme a lo largo y a lo ancho, que no presente huecos y que no sea ni muy grueso ni muy delgado lo que facilitará su lectura. Es necesario preparar de 2-3 extensiones de cada muestra y únicamente se teñirá la mejor. (FIG. 8)

6. Los portaobjetos se secan rápidamente al aire; la rapidez en el secado se favorece agitando el portaobjetos en el aire o mediante un ventilador eléctrico. (No soplar pues se contamina la muestra).

7. El portaobjetos puede etiquetarse escribiendo los datos de identificación con un lápiz de grafito directamente sobre el extremo más espeso de la película de sangre, también pueden utilizarse etiquetas de papel.

RECOMENDACIONES:

- Los portaobjetos tienen que estar perfectamente limpios y desengrasados.

- La gota de sangre no debe ser demasiado grande, generalmente de 3-5 mm de tamaño, de esto depende en gran parte el espesor de la extensión.

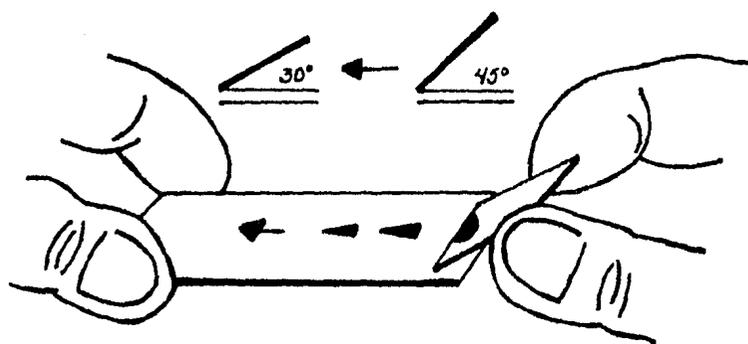
- El espesor de la extensión puede variar cambiando el ángulo del portaobjetos extensor, variando la precisión y la rapidez con que se extiende la sangre.

- El borde del portaobjetos extensor debe ser liso; para evitar flecos con muchos leucocitos.

- Extender rápidamente; a mayor rapidez corresponde más uniformidad y espesor.

- Cuando más rápidamente la película se seca al aire mejor se obtiene la extensión de las células sobre el portaobjetos.

FIG. 8 PREPARACION DE UN EXTENDIDO SANGUINEO



METODO DE LOS DOS CUBREOBJETOS

El método de los dos cubreobjetos tiene la ventaja de una distribución más uniforme de los leucocitos.

1. Hacer contactar un cubreobjetos (22 X 22 mm) con la parte superior de una gota pequeña de sangre (de alrededor de 2 a 3 mm de tamaño) sin tocar la piel.

2. Colocar el cubreobjetos con la parte manchada hacia abajo, encima de otro cubre, de manera que las esquinas de los dos aparezcan como una estrella de 8 puntos.

3. Si la gota no es demasiado grande y los cubreobjetos están bien limpios, la sangre se extenderá uniforme y rápidamente como una capa fina entre las dos superficies.

4. En el momento de cesar de extenderse la sangre, separar los cubreobjetos rápida y firmemente tirando de ellos en el plano paralelo a sus superficies, no levantándolos.

5. Se colocan con la extensión hacia arriba encima de un papel limpio y se dejan secar al aire, o bien se puede colocar adosados diagonalmente en rendijas abiertas en una caja de cartón. (4)

PREPARACION DE COLORANTES Y METODOS DE TINCION PARA
EXTENSIONES SANGUINEAS Y FROTIS DE MEDULA OSEA

Los colorantes de anilina, ampliamente usados en los estudios de la sangre, son de dos tipos generales: los básicos tales como el azul de metileno y los ácidos, como la eosina. Los núcleos y algunas otras estructuras de la sangre se tiñen con los básicos, por lo que se denominan basófilos. Ciertas estructuras sólo toman los colorantes ácidos y se llaman acidófilas, oxífilas o eosinófilas. Algunas estructuras se tiñen por una combinación de ambos y se denominan neutrófilas. El establecimiento de estas propiedades marcó el comienzo de la hematología moderna.

Las tinciones son sensibles a la concentración de iones hidrógeno. - A un pH alcalino se favorece la acción del azul de metileno a expensas de la eosina y viceversa a un pH ácido. (4,5)

La tinción de preparaciones de sangre en extensiones sobre portaobjetos se realiza en general de tal manera que éste quede cubierto por la solución colorante con una capa de 1-2 mm de espesor pero evitando que se derrame por los bordes.

Los métodos de tinción para extensiones sanguíneas más comúnmente usados son:

1. De Wright
2. De Giemsa
3. De May-Grunwald o de Jenner
4. Panóptica de Pappenheim
5. Leishman

1. TINCION DE WRIGHT

El colorante usado en esta tinción se llama policromático porque produce varios colores. Es una solución de alcohol metílico de un colorante ácido y otro básico y es uno de los mejores y más empleados, por su corto tiempo de realización. (5)

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Solución colorante de Wright
Amortiguador de fosfatos pH 7.2

Material:

Portaobjetos o cubreobjetos con extensiones sanguíneas
Soporte de vidrio para portaobjetos
Papel secante

METODOLOGIA

1. Colocar la placa con la extensión secada al aire hacia arriba en un soporte de vidrio para portaobjetos y este a su vez en el lavabo o en una bandeja.
2. Cubrir la extensión con la solución colorante de Wright, dejar teñir de 2 - 3 minutos.
3. Pasado ese tiempo, se añade a la preparación amortiguador de fosfatos pH 7.2 hasta que aparece en la superficie un brillo metálico.
4. A los 3-5 minutos lavar la preparación con un chorro de agua (preferible agua destilada, primero suave, luego más fuerte). El lavado tardará de 5 a 30 segundos hasta que las partes más delgadas se pongan de un color rosado.

5. Después del lavado quitar el exceso de agua inclinando la placa y tocando con un papel secante el borde inferior.

6. Dejar secar al aire.

7. El cubreobjetos se monta con la extensión hacia abajo sobre un portaobjetos con bálsamo del Canadá. (1,2)

RESULTADOS

Los núcleos de los leucocitos y eritrocitos nucleados: violeta rojizo.

Gránulos eosinófilos: rojo brillante hasta rojo pardusco; gránulos basófilos: violeta oscuro; gránulos neutrófilos: violeta claro.

Protoplasma de los linfocitos: azul; de los monocitos: azul grisáceo.

Eritrocitos: rosa pálido.

Plaquetas: violeta rojizo

2. TINCION DE GIEMSA

Es quizá mejor para descubrir parásitos de la sangre y otros protozoos.
(5)

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Colorante de Giemsa diluída
Amortiguador de fosfatos pH 7.2
Alcohol metílico

Material:

Portaobjetos o cubreobjetos con extensiones sanguíneas
Soporte de vidrio para portaobjetos
Papel secante

METODOLOGIA

1. Lo mismo que en la tinción de Wright.
2. Las extensiones de sangre se fijan con metanol durante 5 minutos.
3. Se dejan secar y se cubren con el colorante de Giemsa diluído en buffer de fosfatos pH 7.2, durante 20-30 minutos.
4. Lavar las extensiones con amortiguador de fosfatos de pH 7.2
5. Secar al aire las preparaciones poniéndolas en posición vertical sobre papel secante.

RESULTADOS

Núcleos: violeta rojizo.

Gránulos eosinófilos: pardo rojizo o rojo; gránulos basófilos: azul; gránulos neutrófilos: violeta rojizo.

Protoplasma de los linfocitos: azul; eventualmente con gránulos azurófilos finos de color rojo purpúreo.

Eritrocitos: rojo pálido.

Plaquetas: azul con corpúsculos internos violeta.

Núcleos de parásitos hemáticos y protozoos: rojo brillante.

ADVERTENCIAS TECNICAS

La coloración de Giemsa varía mucho según sea la concentración de iones hidrógeno. Se consigue una coloración óptima en unos 25 minutos con el colorante diluido. Las soluciones ácidas aumentan la acción de la eosina hasta dar aspecto rojizo a la extensión, pero contrarresta la metacromasia del azul. Las soluciones alcalinas incrementan la metacromasia del azul, pero rebajan en mayor grado el tono de la eosina, de modo que domina un tono de color azul grisáceo. (2)

Lo mejor es realizar la tinción con la preparación colocada verticalmente dentro de la cubeta correspondiente; estando la preparación en posición horizontal, el colorante no deberá decantarse después de la tinción, sino arrastrarse con un chorro de agua para que la película superficial no se fije sobre la capa de extensión. (2)

3. TINCION DE MAY-GRUNWALD O DE JENNER

El eosinato de azul de metileno de Jenner, disuelto en alcohol metílico, hace destacarse bien los gránulos de leucocitos y es, por tanto, especialmente útil en su recuento diferencial. Tiñe poco los núcleos y es muy inferior al de Wright y al de Giemsa para descubrir los parásitos del paludismo, porque no produce la llamada coloración de Romanowsky. (4, 5)

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Colorante de May-Grunwald
Amortiguador de fosfatos pH 7.2

Material:

El mismo que para las tinciones anteriores

METODOLOGIA

1. Lo mismo que en las tinciones anteriores.
2. Cubrir la extensión sanguínea con solución de May-Grunwald y dejarla actuar durante 3-5 minutos.
3. Añadir la misma cantidad de amortiguador de fosfatos pH 7.2 y teñir durante 5-10 minutos (se mezcla cuidadosamente el colorante y el buffer moviendo el portaobjetos).
4. Lavar la preparación con amortiguador de fosfatos pH 7.2 hasta que la extensión tome una tonalidad rosa pálido.
5. Dejar secar al aire poniendo las preparaciones en posición vertical sobre papel secante.

RESULTADOS

Linfocitos: núcleo violeta azulado; plasma: azul.

Monocito: núcleo violeta azulado; plasma: azul.

Granulocitos: núcleo violeta azulado; gránulos según su clase:
rojo violeta o azul obscuro.

Plaquetas: azul con corpúsculos internos violeta.

ADVERTENCIAS TECNICAS

Las mejores coloraciones se obtienen con extensiones recién preparadas. Las extensiones no tan recientes se fijan durante unos 30 minutos con metanol o durante unas horas con una mezcla de éter-etanol. (2,4)

4. TINCION PANOPTICA DE PAPPENHEIM

Con el fin de combinar las ventajas de varios colorantes, Pappenheim recomendó el siguiente procedimiento. (5)

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

- Colorante de May-Grunwald
- Colorante de Giemsa diluído
- Amortiguador de fosfatos pH 7.2

Material:

El mismo que para las tinciones anteriores

METODOLOGIA

1. Lo mismo que en las tinciones anteriores.
2. Teñir la extensión sanguínea con una solución de May-Grunwald durante 3 minutos.
3. Añadir una cantidad igual de amortiguador de fosfatos pH 7.2 y dejar teñir durante 1 minuto.
4. Vertir (sin lavar) la solución colorante diluida y añadir la solución de Giemsa diluída durante 15 minutos.
5. Pasado este tiempo lavar la preparación con amortiguador de fosfatos pH 7.2.
6. Secar al aire perfectamente poniendo la preparación en posición vertical sobre papel secante.

Nota: El colorante de May-Grunwald es el mismo que el de Jenner. El colorante de Giemsa puede sustituirse por el de Wright, diluido con una cantidad igual de agua, pero la duración de la tinción no deberá exceder de 5 minutos.

RESULTADOS

Núcleos: violeta rojizo.

Plasma de las células linfoides: azul claro.

Corpúsculos azurófilos linfoides: rojo púrpura brillante; corpúsculos - azurófilos mieloides: violeta tirando a pardo violáceo.

Gránulos neutrófilos: violeta claro.

Gránulos eosinófilos: de rojo ladrillo a pardo rojizo.

Gránulos basófilos: de violeta oscuro a negro.

Eritrocitos: rosa; formas policromas de los eritrocitos, predominantemente azuladas; punteado basófilo de los eritrocitos, azul cobalto intenso.

Corpúsculos de Jolly: de rojizo a violeta. (2,4)

5. TINCION DE LEISHMAN

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Colorante de Leishman
Amortiguador de fosfatos pH 7,2

Material:

El mismo que para las tinciones anteriores

METODOLOGIA

1. Lo mismo que las tinciones anteriores.
2. Cubrir las extensiones con la solución alcohólica saturada de Leishman (colorante de Leishman). Se deja teñir de 0.5 a 1 minuto.
3. Después de ese tiempo se diluye con aproximadamente la doble cantidad de amortiguador de fosfatos pH 7.2 y se mezcla moviendo el portaobjetos.
4. A los 5 minutos lavar la preparación con amortiguador de fosfatos pH 7.2 y se mueve ligeramente. Aparece una nubécula de color azulado, en el agua y la preparación se colorea de rojo claro.
5. Repetir el lavado.
6. Secar de la manera ya mencionada.

RESULTADOS

El aspecto de la coloración es como el obtenido en la coloración de May-Grünwald. (2)

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES COLORANTES PARA EXTENSIONES
SANGUINEAS

Para preparar las soluciones colorantes a partir de los colorantes, se seguirán las siguientes instrucciones.

COLORANTE DE WRIGHT

Eosina azul de metileno según Wright	0.24 g
Glicerina	3.0 ml
Metanol R.A.	97.0 ml

Se disuelve el colorante con un poco de metanol y se agrega la glicerina y lo que resta de metanol. Se agita durante una hora empleando agitador magnético, si hay uno disponible. Después se filtra y la solución queda lista para ser usada. (1,4)

COLORANTE DE GIEMSA

Azur-eosina-azul de metileno seg. Giemsa	0.76 g
Glicerina bidestilada	50.0 ml
Metanol R.A.	50.0 ml

Se incorpora el colorante a la glicerina y se calienta durante 3 horas en baño maría a 60°C. Seguidamente se añade metanol. La solución se deja en reposo durante cinco días y a continuación se filtra. (2,4)

COLORANTE DE GIEMSA DILUIDO

Colorante de Giemsa	30.0 ml
Amortiguador de fosfatos pH 7.2	1,000.0 ml

mezclar perfectamente.

COLORANTE DE MAY-GRUNWALD

Eosina azul de metileno seg. May-Grunwald	0.25 g
Metanol R.A.	100.0 ml

El colorante se disuelve calentando ligeramente a 60°C en baño maría. Una vez frío se filtra.

COLORANTE DE LEISHMAN

Eosina azul de metileno seg. Leishman	0.12 g
Metanol R.A.	100.0 ml

El colorante se disuelve bajo agitación, en metanol calentando a unos 40°C y la solución se deja en reposo 5 días antes de filtrarla. (2,5)

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS pH 7.2

Fosfato dibásico de sodio	1.14 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 : 2\text{H}_2\text{O}$	
Fosfato monobásico de potasio	0.49 g
KH_2PO_4	
Agua destilada	900.0 ml
Ajustar el pH a 7.2	
Agua destilada c.b.p.	1,000.0 ml

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE ERITROCITOS Y LEUCOCITOS

Observación del Frotis.

A continuación se menciona el procedimiento para efectuar la observación correcta de una extensión sanguínea previamente teñida.

Primero, se inspecciona la preparación con el objetivo de 40 X para darnos una idea del número de leucocitos presentes, su distribución y su tinción, así como la distribución de los eritrocitos y su forma.

Posteriormente, se selecciona un área de la preparación y se le pone una gota de aceite de inmersión, observamos al microscopio con objetivo de 100 X. Observar perfectamente si existen variaciones en el tamaño y forma de los glóbulos rojos, así como variaciones estructurales en ellos, agrupaciones y su tinción. Además, se efectúa el recuento diferencial de leucocitos ya que puede apreciarse perfectamente sus características tanto de leucocitos normales en sangre periférica como anormales. (5)

ERITROCITOS

En una persona sana, los eritrocitos se presentan, cuando no están aglomerados, como discos bicóncavos homogéneos de tamaño casi uniforme entre 6 y 8 μm de diámetro. Sin embargo, también en la sangre normal puede haber células individuales tan pequeñas como de 5 μm y tan grandes como de 9.5 μm . En los casos de enfermedad varían los eritrocitos en cuanto al contenido de hemoglobina, tamaño, forma, propiedades de tinción y estructura. (5)

La morfología del eritrocito proporciona información relacionada con la eritropoyesis, incluyendo: 1) valoración de la estimulación de la eritropoyetina, 2) hallazgo de anomalías de maduración nuclear y citoplásmica, 3) identificación de enfermedades específicas debido a alteraciones singulares en la forma de la célula.

Las alteraciones de la maduración nuclear se caracterizan por un aumento en el tamaño del eritrocito sin un cambio en la concentración de hemoglobina de éste. Esto no afecta uniformemente a todos los glóbulos rojos; también hay presentes fragmentos celulares y microcitos como un resultado de la desorganización de la autoduplicación y maduración de la célula y la rotura subsiguiente de las células que entran a la circulación. (4)

A continuación se describen las alteraciones más comunes de los eritrocitos.

VARIACIONES DE FORMA. (FIG. 9)

La variación formal se llama Poiquilocitosis. Cualquier célula con una forma anormal es un poiquilocito. Sin embargo este término es muy ambiguo - ya que también se llama Poiquilocitosis a la fragmentación de los eritrocitos, por lo tanto se usará variación formal.

1. Eliptocitos: Son eritrocitos con deformación a células elípticas, fácilmente identificables. Son abundantes en la eliptocitosis hereditaria - (ovalocitosis hereditaria).

2. Esferocitosis: Son eritrocitos casi esféricos en contraste con la forma en disco bicóncavo normal. Su diámetro es menor que el normal. Carecen de la zona pálida central o la tienen más pequeña o excéntrica. Se presentan en la esferocitosis hereditaria.

3. Acantocitos: Son eritrocitos espiculados en quienes los extremos de las espículas son bulbosas y redondeadas. Se observan en la abeta-lipoproteinemia hereditaria o adquirida, en algunos casos de hepatopatías. Las células con muescas son células retraídas regularmente que pueden aparecer comúnmente como un artefacto durante la preparación de extensiones.

Fig. 9 VARIACIONES DE FORMA



ELIPTOCITOS



ESFEROCITOS



ACANTOCITOS



CELULAS EN DIANA



CELULAS FALCIFORMES

4. Células en Diana: Son eritrocitos más delgados de lo normal (leptocitos) que, cuando se tiñen, muestran un reborde periférico hemoglobínico con una zona oscura central, la cual contiene hemoglobina. Ambas zonas están separadas entre sí por un anillo pálido no teñido que contiene menos hemoglobina. Esto ocurre en muchas hemoglobinopatías, talasemias, enfermedad hepática.

5. Esquistocitos: Son fragmentos de eritrocitos. Indican la presencia de hemólisis en la anemia megaloblástica y en quemaduras graves, pueden deberse a traumatismos intravasculares o daño de los eritrocitos recientemente formados al entrar en circulación.

6. Células Falciformes: Son eritrocitos en forma de uso, semilunares, hoz. También son llamados drepanocitos. Se presentan en la anemia drepanocítica. (4)

VARIACIONES ESTRUCTURALES

1. Punteado basófilo (degeneración granular basófila; agrega basófila; basofilia punteada). Se caracteriza por la presencia, dentro del eritrocito, de gránulos basófilos irregulares, que varían en cuanto a su tamaño desde puntitos apenas visibles a gránulos casi tan grandes como los de los gránulos azurófilos de promielocitos. Se presentan en la intoxicación con plomo, en la anemia megaloblástica.

2. Cuerpos de Howell-Jolly. Estas partículas, lisas y redondas, son restos de cromatina nuclear. Pueden observarse aisladamente en la anemia megaloblástica, anemia hemolítica y después de esplenectomía.

3. Cuerpos de Heinz. Son precipitados de hemoglobina desnaturalizada, unidos por sí mismo de forma característica a la membrana de los eritrocitos. Su presencia se puede deber a: a) Administración al individuo de fenilhidracina, cloratos o un compuesto nitro o amino aromático lo que ocasiona una desnaturalización oxidativa de la hemoglobina; b) administración de un fármaco como la primaquina y c) existe un defecto hereditario, una anemia hemolítica asociada con una hemoglobina estable.

4. Anillos de Cabot. Son estructuras en forma de anillo, ocho o en asa. Ocasionalmente están formados por dos o varias líneas concéntricas. Se ha observado raramente en los eritrocitos en la anemia perniciosa, intoxicación por plomo. (1,3,4)

5. Punteado palúdico intracelular. Aplicable al aspecto finamente granuloso de los eritrocitos que albergan los parásitos del paludismo terciario. Estos hematíes generalmente son mayores de lo normal. Presentes en caso de anemia hemolítica y fiebre.

6. Apilamiento de eritrocitos. Es la alineación de eritrocitos, unos sobre otros, por lo cual en preparaciones húmedas se parecen a pilas de monedas. Se presenta en mieloma múltiple.

7. Eritrocitos nucleados. Pueden ser normoblastos tardíos, pero algunas veces pueden ser formas más tempranas de eritrocitos, indican desorganización de liberación de los eritrocitos o ausencia de función esplénica. (4,5)

ANISOCITOSIS. VARIACIONES EN EL TAMAÑO

Normocito.	mide aproximadamente 7 u
Microcito.	mide aproximadamente menos de 7 u
Esferocito.	mide aproximadamente 5 u
Macrocito.	mide de 10 a 20 u
Megalocito.	mide de 20 a 25 u.

LEUCOCITOS

El término "leucocito" fue creado para indicar a las células o glóbulos blancos de la sangre. Aunque hay muchas características morfológicas por las cuales pueden ser reconocidas las células, el patrón de cromatina nuclear es la manifestación sencilla de identificación útil. (4)

En la sangre del hombre normal pueden distinguirse los siguientes tipos de leucocitos: (FIG. 10)

1. Neutrófilos en banda: Son una forma inmadura en comparación con los polimorfonucleares. El núcleo tiene una cromatina más condensada y una forma alargada más bien uniforme. En la fase de banda está incluida una constricción parcial del núcleo, hasta que se forma un delgado filamento (largo, pero no ancho) entre los dos lóbulos, momento en el cual la célula queda clasificada como neutrófilo segmentado.

2. Neutrófilos segmentados. Polimorfonucleares: Miden aproximadamente 12 u. Tienen un núcleo segmentado. El número de lóbulos nucleares oscila de 2 a 5, unidos por finos filamentos. El núcleo se tiñe intensamente de color azul oscuro y la cromatina está densamente aglutinada. El citoplasma abundante se tiñe de color rosa y está lleno de finas granulaciones que se tiñen de color rosa. Alrededor de dos tercios de éstas son gránulos específicos y un tercio gránulos azurófilos: la intensidad de coloración de estos últimos es menor que la de la célula inmadura.

3. Eosinófilos: Miden de 12 a 13 u. La estructura de estas células se parece a la de los neutrófilos polimorfonucleares, pero con la singular diferencia con los granulocitos neutrófilos que su citoplasma contiene gránulos más grandes, redondos u ovalados y con gran afinidad por los colorantes ácidos. Se identifican fácilmente por el tamaño y color de estos gránulos que se ponen de rojo brillante con un colorante que contenga eosina. Su citoplasma es incoloro o presenta un tono débilmente azul celeste. El núcleo tiene dos segmentos conectados, rara vez tres o más. (4.5)

FIG. 10 LEUCOCITOS

Neutrofilo en
BandaNeutrofilo
Segmentado

Eosinofilo



Basófilo

Linfocito
GrandeLinfocito
Pequeño

Monocito

4. Basófilos: Miden de 12 a 13 u. En general, los granulocitos basófilos se parecen a los neutrófilos, pero su núcleo es menos irregular (generalmente solo mellado o ligeramente lobulado) y los gránulos son mayores y con gran afinidad por los colorantes básicos y se tiñen de color púrpura oscuro, mientras que el núcleo se ve algo más pálido y a menudo está parcial o completamente oculto por los gránulos, por lo que resulta difícil distinguir su forma.

5. Linfocitos: Existen dos tipos: linfocitos grandes que miden de 12 a 15 u y linfocitos pequeños que miden de 6 a 10 u. Son células mononucleares sin gránulos citoplásmicos específicos. Su núcleo contiene bloques pesados de cromatina que se tiñe de azul oscuro. El citoplasma tiene color azul claro, puede ser escaso, siendo difícil distinguirlo. Con frecuencia se encuentran linfocitos grandes a veces mayores que un monocito, con un núcleo más pálido y citoplasma más abundante.

6. Monocitos: Miden de 14-20 u. Son las células mayores de la sangre normal. Contiene un sólo núcleo, lobulado, profundamente mellado o en forma de herradura y en ocasiones redondo u ovalado; con cromatina aglutinada, se tiñe densamente que el linfocito, mientras que el citoplasma tiene un color gris azulado y a veces aparece como espolvoreado uniformemente o en manchas - por unos gránulos rojizos. (1,3,4)

BIBLIOGRAFIA

1. Mac Gregor, R. G. Scott, Richards, W., and Loh, G. L. "The differential leucocyte count." *Journal of Pathology and Bacteriology*, 51, 337 (1940).
2. Merck México, S.A.
CLINICAL LABORATORY
11ava. edición
Médico-chemical Investigation Methods
Federal Republic Germany (1970)

3. Sturgis, C.C. and Bethell, F. H.
"Quantitative and qualitative
variations in normal leucocytes"
Physiological Reviews, 23, 279
(1943).
4. Gradwohl's. R.
CLINICAL LABORATORY METHODS AND
DIAGNOSIS
7a. edición. Vol. I
Ed. C. V. Mosby Co.
U.S.A. (1970).
5. Todd, C. J. and et al.
CLINICAL DIAGNOSIS AND MANAGEMENT
6a. edición
Ed. W. B. Saunders Co.
U.S.A. (1979).

RECUESTO DE PLAQUETAS

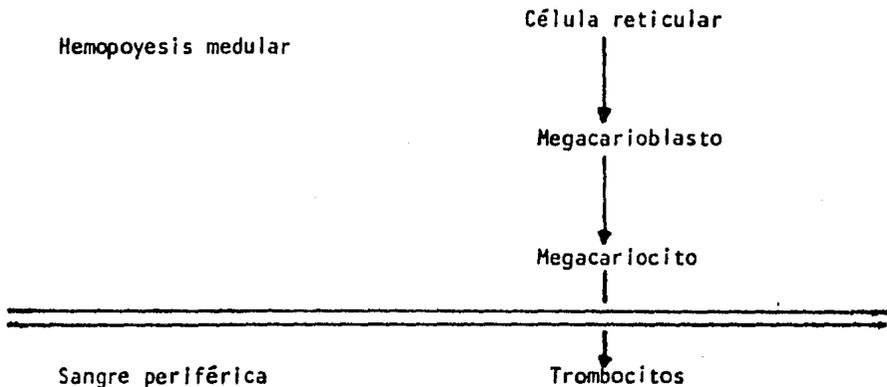
Objetivo:

1. Comparar las diferentes técnicas para el recuento de plaquetas.
2. Evaluar las ventajas y limitaciones de cada una de ellas.

Generalidades: Las plaquetas son redondas u ovaladas de 2 a 4 μm de diámetro. En extensiones de sangre obtenidas por punción cutánea pueden existir intensas deformaciones y elongaciones con tendencias a la aglomeración o agregación.

Las plaquetas se originan en la médula ósea a partir del megacariocito. **DIAGRAMA 2**

DIAGRAMA 2 ORIGEN DE LAS PLAQUETAS



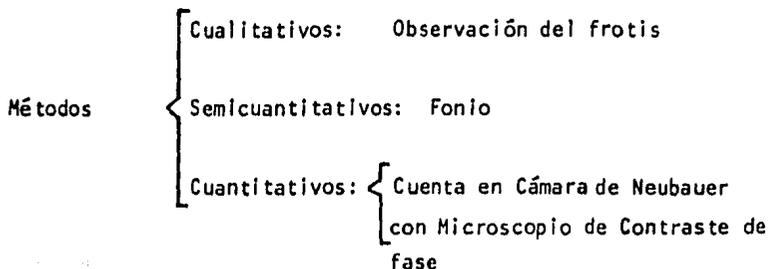
En cualquier momento, alrededor de una tercera parte de las plaquetas del sistema vascular están transitando lentamente a través del brazo. Esto significa que dos tercios están en el resto de la circulación. Las plaquetas viven unos 8-11 días en el sistema vascular. Su función es mantener la integridad vascular y taponar las lesiones vasculares. (1)

Las plaquetas desempeñan una función crítica en la hemostasis que consiste en: 1) mantenimiento continuo de la integridad vascular; 2) paro inicial del sangrado por formación del tapón plaquetario; 3) estabilización del tapón hemostático por la contribución de un fosfolípido al proceso de formación de fibrina. Con sus propiedades de sello y procoagulantes, la plaqueta representa una unidad hemostática completa, como implica su nombre funcionalmente más apropiado de trombocito.(2)

Se llama trombocitosis al aumento de la cifra de plaquetas por encima de 400,000/ul. Habitualmente parece ser debida a un incremento en la producción de plaquetas en situaciones tales como déficit de hierro, hemorragia aguda, hemólisis, procesos malignos y afecciones inflamatorias. Una producción disminuida, distribución alterada y aumentada de la destrucción o eliminación, son causas de trombocitopenia, la cual, si es grave, constituye una causa clínicamente importante de hemorragia; se presentan en: procesos mielísticos, anemias megaloblásticas, esplenomegalia de diferentes causas, coagulación intravascular diseminada, trombocitopenia inmune, púrpura trombocitopénica idiopática.(3)

En general, con una trombocitopenia por debajo de 50,000/ul se facilita el riesgo de una hemorragia anormal, ya que la eficacia funcional y el número de plaquetas son importantes para la hemostasia.

Para obtener resultados satisfactorios en el recuento de plaquetas deben realizarse los siguientes métodos.



METODO CUALITATIVO

OBSERVACIONES DEL FROTIS

Las plaquetas son difíciles de contar debido a que son pequeñas, su tendencia a adherirse al cristal, a cualquier cuerpo extraño y en particular unas a otras. Con la sangre capilar, las extensiones deben ser uniformes y llevarse a cabo con gran rapidez después de obtener la sangre, - con objeto de evitar la aglomeración de plaquetas y minimizar la disminución debido a la adhesividad de las plaquetas a los bordes de los vasos lesionados.

Es posible un mejor cálculo (un examen relacionando una plaqueta por aproximadamente 20 eritrocitos) examinando las extensiones teñidas, las plaquetas se distribuyen uniformemente y la aglomeración y pérdidas debidas al proceso hemostático no tiene lugar. Por consiguiente, cuando se informa acerca de un recuento diferencial, debe hacerse referencia especial a las anomalías plaquetarias o alteraciones en su número si existen.

METODO SEMICUANTITATIVOS (FONIO)

Fundamento: Se hace contar el número de plaquetas presentes, la aglutinación de las plaquetas es prevenida por la mezcla de una gota de sangre con una gota de solución de sulfato de magnesio.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Solución de sulfato de magnesio al 14%
Colorante de Giemsa diluido
Alcohol Etílico al 70%
Alcohol Etílico absoluto

Material:

Portaobjetos limpios y desengrasados
Lancetas estériles
Torundas de algodón

Material Biológico:

Sangre capilar

Equipo:

Microscopio
Aceite de inmersión

METODOLOGIA

1. Se prepara el pulpejo de un dedo desinfectándolo con una torunda de algodón empapada de alcohol etílico al 70% y se coloca una gota de solución de sulfato de magnesio al 14%.

2. Con una lanceta estéril se hace una punción a través de la gota de la solución de sulfato de magnesio al 14%.

Se espera que fluya una cantidad de sangre igual a la - de la solución usada, permitiendo la mezcla entre ambas.

3. Tomar una gota y se hace un extendido en un portaobjetos.

4. Se tiñe con la técnica de coloración usado habitualmente en el laboratorio (Giemsa o Wright).

5. Observar al microscopio con objetivo de 100X. Contar 1,000 eritrocitos e inducir el número de plaquetas observados en el curso de esta cuenta, hacerlo en varios campos correspondientes a distintas zonas del preparado.

Cálculos:

Para calcular el número absoluto de plaquetas /ul de sangre, es necesario también la cuenta de eritrocitos.

$$P = \frac{\text{No. de plaquetas por 1,000 eritrocitos (Eritrocitos/ul sangre)}}{1,000}$$

en donde P = plaquetas /ul de sangre.

VALORES DE REFERENCIA

De 40 a 60 plaquetas por 1,000 eritrocitos

De 150,000 a 300,000 plaquetas /ul de sangre.

METODOS CUANTITATIVOS

CUENTA EN CAMARA

Fundamento: Empleando el colorante azul de cresil brillante las plaquetas pueden observarse al microscopio como células con un movimiento browniano.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10% (sal disódica)
Solución de azul de cresil brillante (líquido diluyente de plaquetas) (filtrar antes de usar)

Material

Tubos de ensaye de 13 X 100 mm
Pipetas de Thoma para glóbulos rojos
Cámara de Neubauer con cubrehematímetro
Boquilla
Gradilla para tubos
Cajas de Petri
Gasa
Papel Filtro

Material Biológico

Sangre capilar o venosa con anticoagulante

Equipo:

Microscopio
Agitador para pipetas de Thoma

METODOLOGIA

1. Cargar con sangre una pipeta de Thoma para glóbulos rojos hasta la marca 1.0
2. Limpiar cuidadosamente con gasa la parte externa de la pipeta.
3. Completar el volumen hasta la marca 101 con el líquido diluyente de plaquetas. Dilución 1:100.
4. Agitar durante 5 minutos.
5. Descartar las primeras 4-5 gotas de la pipeta de Thoma y llenar la cámara de Neubauer, descrito previamente.
6. Dejar reposar durante 15 minutos en una caja de Petri con papel filtro humedecido, para permitir el depósito de las plaquetas en un plano óptico.
7. La cuenta se hace con el objetivo de 40 y el ocular de 10 X. Debe trabajarse con una buena iluminación en el microscopio para evitar confundir las plaquetas con basuras, levaduras o colorante precipitado. En la cámara las plaquetas aparecen como cuerpos refráctiles ovales o elongados.
8. Contar de igual manera que en eritrocitos.

NOTA: Esta determinación debe hacerse rápidamente para evitar que las plaquetas se aglomeren.

CALCULOS:

Para obtener el número de plaquetas /ul de sangre se emplea la siguiente fórmula:

$N \times 10 \times 100 = \text{Número de plaquetas /ul de sangre.}$

en donde:

- N = número de plaquetas contadas
- 10 = corrección por la altura de la cámara
- 100 = factor de dilución

$N \times 1000$ = Número de plaquetas /ul de sangre.

VALORES DE REFERENCIA

De 150,000 a 400,000 plaquetas /ul de sangre.

RECUESTO EN MICROSCOPIO CON CONTRASTE DE FASE

Fundamento: Las plaquetas se cuentan en una cámara de Neubauer utilizando microscopio de fase después de lizar los eritrocitos con solución de oxalato de amonio al 1%.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10% (sal disódica)
Solución de oxalato de amonio al 1%

Material:

El mismo que para la cuenta en cámara

Material Biológico:

Sangre capilar o venosa con anticoagulante

Equipo:

Microscopio con contraste de fase
Agitador para pipetas de Thoma

METODOLOGIA

1. Llenar una pipeta de Thoma para glóbulos rojos hasta la marca
2. Limpiar cuidadosamente con una gasa la parte exterior de la pipeta y completar el volumen hasta la marca 101 con la solución de oxalato amónico al 1%. Dilución 1:100.

3. Mezclar por agitación durante 3 a 5 minutos.

4. Descartar las primeras 4-5 gotas de la pipeta y llenar la cámara de Neubauer en la forma habitual.

5. La cámara se pone en una caja Petri durante 15 minutos para permitir el depósito de las plaquetas en un plano óptico. Debajo de la cámara, para prevenir la evaporación, se deja un fragmento de papel filtro humedecido.

6. Contar todo el cuadrado central (para eritrocitos) de 1 mm^2 .

CALCULOS

Para obtener el número de plaquetas /ul de sangre se emplea la siguiente fórmula:

$$N \times 10 \times 100 = \text{Número de plaquetas /ul de sangre}$$

en donde:

N = número de plaquetas contadas

10 = corrección por la altura de la cámara

100 = factor de dilución

$$N \times 1000 = \text{Número de plaquetas /ul de sangre}$$

VALORES DE REFERENCIA

De 150,000 a 400,000 plaquetas /ul de sangre.

BIBLIOGRAFIA

1. Hutchison, D
PLATELET FUNCTION DISORDERS AND
TESTING
Dade Monograph
U.S.A. (1978)
2. Pizzuto, J., Harker, L. A., Marder, V.
PROGRESOS RECIENTES EN HEMATOLOGIA
Ciclos sobre el avance continuo de la
Medicina, IMSS
México (1978).
3. Quick, A.J.
HEMORRAGIC DISEASES
Ed. Lea and Febiger
Philadelphia (1957)
4. Tanum Gunnar. "The megakaryocyte DNA
content and platelet formation after the
sublethal whole body irradiation of rats".
Blood. 63: 917 (1984).
5. Wermacher, W. H. "Guarding the
Prothrombin". Current Medical Digest,
34: 432 (1967).

VALORES ABSOLUTOS

Estos valores expresan el número absoluto de un tipo de célula (leucocito) presente en un ul de sangre. (2)

Los valores absolutos se calculan de acuerdo al siguiente procedimiento e incluye corrección por presencia de normoblastos.

Cuenta de leucocitos	9000/ul
Eritrocitos nucleados	20 por cada 100 leucocitos
Neutrófilos segmentados	53%

$$\text{No. verdadero de leucocitos} = \frac{9000 \times 100}{20 \times 100}$$

por ul de sangre

$$= 7,500 / \text{ul sangre}$$

$$\text{No. absoluto de cada tipo de leucocitos} = \frac{L \times \text{número relativo}}{100}$$

en donde L es la cuenta de leucocitos corregidos por la presencia de normoblastos. (1,2)

Ejemplo:

$$\text{No. absoluto de neutrófilos segmentados} = \frac{7,500 \times 53}{100}$$

$$= 3975 / \text{ul}$$

BIBLIOGRAFIA

1. Gradwohl's, R
CLINICAL LABORATORY METHODS AND DIAGNOSIS
7a. edición. Vol. I
Ed. C. V. Mosby Co.
U.S.A. (1970)

2. Gruchy, G. C.
CLINICAL HAEMATOLOGY IN MEDICAL
PRACTICE
3a. edición
Ed. Blackwell Scientific Pub.
Great Britain (1970)

CAPITULO III

TECNICAS ESPECIALES

Objetivo:

1. Analizar el origen de producción de drepanocitos.
2. Establecer la importancia clínica de este estudio.

Generalidades: La anemia de células falciformes solo aparece cuando lo mismo el gene paterno que el materno son anormales. La herencia del - gen de la Hb-S se transmite con un cromosoma autosómico y no con el cromosoma X. La unión de dos heterocigotos Hb-S da vástagos que pueden poseer dos genes anormales, produciéndose anemia de eritrocitos falciformes. Este defecto heredado se halla en la porción globina de la molécula hemoglobínica, no en la porción hem. La hemoglobina de las células falciformes y la normal difieren en el sentido de que la cadena peptídica en cada mitad de la molécula de hemoglobina falciforme contiene valina en una zona, donde la hemoglobina normal contiene ácido glutámico. (1)

La característica fundamental hematológica de las células falciformes, es la forma alargada de media luna y de hoz que los eritrocitos adoptan - cuando se les priva de contacto con el oxígeno (drepanocitos). (2)

Fundamento: Al producir un descenso de la tensión de oxígeno en la - preparación, por el aislamiento producido por el sellado con parafina y la acción reductora del metabisulfito de sodio, los eritrocitos que contienen Hb-S adoptan la forma semilunar o de drepanocitos. (3)

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10% (sal disódica)
Solución de metabisulfito de sodio al 2% (recién preparado)
Solución de cloruro de sodio al 0.85%.

Material:

Tubos de ensaye de 13X100 mm
Pipeta Pasteur con bulbo
Cubreobjetos y portaobjetos limpios y desengrasados
Aplicadores de madera
Varilla de vidrio
Parafina o vaselina

Material biológico:

Sangre venosa con anticoagulante.

Equipo:

Microscopio

METODOLOGIA

1. Sobre un portaobjetos limpio y desengrasado depositar una gota de sangre problema y una o dos gotas de la solución de metabisulfito de sodio al 2%.

2. Mezclar perfectamente con un aplicador de madera y cubrir la mezcla con un cubreobjetos.

3. Con una varilla de vidrio, calentada previamente, sellas los bordes del cubreobjetos con parafina fundida o con vaselina (paso opcional).

4. Preparar un control utilizando solución salina en lugar de la solución de metabisulfito de sodio.

5. Examinar al microscopio una, dos y 24 horas después, investigando la presencia de drepanocitos.

6. Informar la prueba como positiva o negativa.

VALORES DE REFERENCIA

Negativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Báez, V. J.
HEMATOLOGIA CLINICA
7a. edición
Ed. Méndez Oteo
México (1981).
2. Ruíz, R. G.
MORFOLOGIA DE LAS CELULAS HEMATICAS
Curso Teórico - Práctico
México (1975).
3. Schmidt, R. M., Brosious, E. M.
BASIC LABORATORY METHODS OF HEMOGLOBINOPATHY DETECTION
6a. edición
Ed. Department of Health, Education and Welfare
U.S.A. (1976).

4. Singer, K. Chernoff, A. J., and Singer, L. "Studies on abnormal hemoglobins: I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation." *Blood*, 6, 413 (1951).

Objetivo:

1. Analizar las posibles causas que originan cambios en la permeabilidad de la membrana del eritrocito.
2. Evaluar la importancia clínica de esta determinación, así como sus ventajas y limitaciones.

Generalidades: Los eritrocitos están rodeados por una membrana semi-permeable al agua y a electrolitos. Si un eritrocito es colocado en una solución hipotónica, el equilibrio osmótico puede ser estabilizado por la acción del agua dentro de la célula, que en consecuencia se hincha, se produce un desplazamiento de los electrolitos y un cambio en la molécula de hemoglobina; el grado de hinchamiento depende del gradiente de la presión osmótica. Esta presión modifica varios factores como son: el grado de -- cristalización de la hemoglobina, el grado de saturación de oxigenación, la actividad de transferencia de enzimas, el pH, la temperatura y la cuenta total de eritrocitos. (1,2)

En la esferocitosis hereditaria, anemia hemolítica adquirida, anemias ferropénicas, hemoglobinopatías, anemia hemolítica del recién nacido, etc. hay un aumento variable de la fragilidad osmótica, por lo tanto la vida media del eritrocito se ve disminuída. (3)

En la eliptocitosis disminuye el espesor del eritrocito y la fragilidad osmótica se halla disminuída.

Fundamento: La sangre es diluida en solución amortiguada a pH 7.4 con fosfatos. Una serie de tubos es preparada conteniendo cada uno sangre y diferentes concentraciones de solución salina. Después de reposar a temperatura ambiente, los eritrocitos son removidos por centrifugación y el grado de hemólisis en cada tubo es determinado espectrofotométricamente sobre la base de la hemoglobina libre. (4)

Los eritrocitos presentan resistencia globular cuando están en contacto con soluciones salinas hipotónicas de concentración decreciente. Al punto - donde se inicia la hemólisis se le denomina resistencia mínima y tiene mayor valor clínico. Cuando la hemólisis es completa se llama resistencia máxima.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Solución de cloruro de sodio al 1% amortiguada a pH 7.4 con fosfatos.
Heparina.

Material:

Tubos de ensaye de 13X100 mm
Pipetas serológicas de 0.1 ml
Pipetas serológicas de 1 ml
Pipetas serológicas de 5 ml
Gradilla para tubos
Celdas.

Material biológico:

Sangre venosa heparinizada

Equipo:

Espectrofotómetro
Centrífuga.

METODOLOGIA

1. Preparar 12 tubos de ensaye de 13X100 mm perfectamente limpios y secos, rotularlos del número 1 al 12.

2. Preparar diluciones en cada tubo de acuerdo a la tabla siguiente:

TUBO	NaCl 1% ml	Agua destilada ml	Conc. final % Na Cl	Extinción	Hemólisis
1	4.25	0.75	0.85		0
2	3.75	1.25	0.75		
3	3.25	1.75	0.65		
4	3.00	2.00	0.60		
5	2.75	2.25	0.55		
6	2.50	2.50	0.50		
7	2.25	2.75	0.45		
8	2.00	3.00	0.40		
9	1.75	3.25	0.35		
10	1.50	3.50	0.30		
11	1.00	4.00	0.20		
12	0.50	4.50	0.10		100

3. Homogenizar perfectamente bien la sangre.

4. Adicionar a cada tubo 0.05 ml de la muestra de sangre y mezclar inmediatamente agitando suavemente.

5. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 1 hora.

6. Centrifugar a 1,500 rpm durante 5 minutos.

7. Separar el sobrenadante de cada tubo y leerlo en un espectrofotometro o fotocolorímetro a 530 ó 545 nm, utilizando el sobrenadante del tubo número 1 como blanco.

8. Obtener el por ciento de hemólisis de cada uno de los tubos, relacionando la E (extinción) de cada tubo con la obtenida en el tubo número - 12, ésta equivale al 100% de hemólisis.

9. Graficar % de hemólisis contra la concentración final de % Na Cl.

VALORES DE REFERENCIA

0.20%	NaCl	_____	97	_____	100% de hemólisis
0.35%	NaCl	_____	90	_____	99% de hemólisis
0.40%	NaCl	_____	50	_____	90% de hemólisis
0.45%	NaCl	_____	5	_____	45% de hemólisis
0.50%	NaCl	_____	0	_____	5% de hemólisis
0.55%	NaCl	_____			0% de hemólisis

Resistencia mínima _____

Resistencia máxima _____

50% de hemólisis _____ 0.40% NaCl

BIBLIOGRAFIA

1. Brown, B.

TECNICAS DE LABORATORIO DE HEMATOLOGIA

Ed. Elicien

España (1976).

2. Hillman, R.S.

MANUAL DE HEMATOLOGIA

Ed. El Manual Moderno

México (1977).

3. Leavell, B. S.

HEMATOLOGIA CLINICA

4a. edición

Ed. Interamericana

México (1977).

4. Williams, W. J. and et al.

HEMATOLOGY

3a. edición

Ed. Mc Graw-Hill Book Co.

U.S.A. (1983).

DETERMINACION DE HEMOGLOBINA FETAL

Objetivo:

1. Describir la composición de la hemoglobina fetal.
2. Señalar la importancia de su determinación en el diagnóstico clínico.

Generalidades: La hemoglobina fetal (Hb F) consiste en 2 cadenas α y 2 cadenas γ ($\alpha_2 \gamma_2$). En niños recién nacidos, el 60-80% de la hemoglobina es de tipo fetal. La distribución de la hemoglobina fetal en el adulto es estabilizada en la edad de 4 a 5 años.

La distribución irregular de la Hb-F es vista en extensiones sanguíneas de niños recién nacidos y también en talasemia mayor y talasemia menor y en las varias combinaciones de talasemias, además en eritroleucemia, esferocitosis hereditaria en transfusión feto-materna. Por la distribución irregular es de pensarse que algunas células no contienen Hb-F y otras contienen pura Hb-F con alguna otra hemoglobina. (2)

La cuantificación correcta de Hb-F es importante para la diferenciación precisa de hemoglobinopatías resultantes de anomalías genéticas en la producción de hemoglobina. (2, 3)

Fundamento: La hemoglobina fetal es más resistente a la desnaturalización alcalina que otra hemoglobina. Para esta prueba, es adicionado un álcali fuerte al hemolizado problema. Después de un minuto se agrega solución de sulfato amónico acidificado, el cual precipita a la hemoglobina desnaturalizada. Se filtra la solución y se determina espectrofotométricamente la Hb-F presente en el filtrado y es expresado como el porcentaje de Hb-F álcali resistente. (4)

REACTIVO Y MATERIAL**Reactivos:**

Solución de citrato de sodio al 3.8%
Solución de cloruro de sodio al 0.9%
Solución de hidróxido de sodio al 0.083 N
Solución precipitante (solución de sulfato de amonio saturado y acidificada con HCl)
Solución anticoagulante de EDTA al 0.3% (sal disódica)
Cloroformo R.A.
Tolueno R.A.

Material:

Tubos de ensaye de 13X100 mm
Tubos de ensaye de 16X150 mm
Tubos cónicos para centrífuga
Pipetas serológicas de 0.2 ml
Pipetas serológicas de 1 ml
Pipetas serológicas de 5 ml
Pipetas serológicas de 10 ml
Pipetas Pasteur con bulbo
Celdas
Gradilla para tubos de ensaye
Papel filtro
Embudo

Material biológico:

Sangre venosa

Equipo:

Espectrofotómetro
Centrífuga
Vortex
Cronómetro

Método a)

1. Tomar 10 ml de la muestra de sangre con 2 ml de la solución de citrato de sodio al 3.8%. Mezclar perfectamente.

2. Centrifugar a 2,000 rpm durante 5 minutos y separar el plasma.

3. Lavar los eritrocitos tres veces con solución salina al 0.9% Después del último lavado marcar el volumen que las células ocupan en el tubo.

4. Añadir volúmenes iguales (al volumen de las células lavadas) de agua destilada y cloroformo R.A. Mezclar vigorosamente (con Vortex) durante 5 a 7 minutos.

5. Dejar reposar 12 horas a 4°C y centrifugar posteriormente a 3000 rpm durante 30 minutos.

6. Colectar la capa superior acuosa y transferirla a un tubo de 13X100 mm limpio, ésta contiene la solución de hemoglobina para la determinación de hemoglobina fetal. (4)

Método b)

1. En un tubo de centrifuga graduado adicionar 5 ml de la muestra de sangre con 1 ml de solución de citrato de sodio al 3.8. Mezclar.

2. Centrifugar a 3,000 rpm durante 15 minutos.

3. Separar el plasma y lavar los eritrocitos tres veces con solución de cloruro de sodio al 0.9%.

4. Para cada 1 ml de células lavadas adicionar 1.4 ml de agua destilada y 0.4 ml de tolueno. Agitar vigorosamente por 5 minutos y centrifugar a 3,000 rpm durante 15 minutos.

5. Extraer la capa de tolueno y centrifugar nuevamente a 3,000 rpm por 10 minutos.

6. Colectar la capa superior acuosa y transferirla a un tubo de 13X100 mm limpio, listo para usarlo en la determinación de hemoglobina fetal.

METODO PARA LA DETERMINACION DE HEMOGLOBINA FETAL.

1. Añadir 0.2 ml de la solución de hemoglobina (obtenida anteriormente) a 3.2 ml de solución de hidróxido de sodio 0.083 N en un tubo de ensaye de 16X150 mm. Lavar la pipeta varias veces con la misma solución. Poner en funcionamiento el cronómetro en el momento de la adición.

2. En exactamente 60 segundos adicionar 6.6 ml de la solución precipitante (solución de sulfato de amonio acidificado).

3. Mezclar invirtiendo el tubo 6 veces y filtrar inmediatamente a través de papel filtro. Un color rosa en el filtrado denota una cantidad anormal de hemoglobina fetal. Si el filtrado no es claro, volver a filtrar. Si el filtrado es incoloro denota que la Hb-F es normal o está ligeramente incrementada.

4. En otro tubo hacer un control, adicionando 0.02 ml de solución de hemoglobina 5 ml de solución de EDTA al 0.3%, obteniendo así una relación de 1:251.

5. Leer las extinciones del problema y del control utilizando agua como blanco, a 540 nm.

Cálculos:

$$\% \text{ Hb-F} = \frac{\text{Absorción del problema}}{\text{Absorción del control} \times 5} \times 100$$

El factor 5 resulta de la relación de la dilución de la Hb-F del problema que es 1:50 y la dilución de la Hb-F del control que es 1:251 teniendo entonces:

$$50/251 = 1/5$$

Por lo tanto:

$$\% \text{ Hb-F} = \frac{\text{Absorción del problema}}{\text{Absorción del control}} \times 20$$

VALORES DE REFERENCIA

En adultos de 0.5 a 1.7% de Hb-F

BIBLIOGRAFIA

1. Bet Ke, A., Mati, H.R., and Schlicht,
I. "Estimation of small percentages of foetal haemoglobin". Nature (London), 184,1877 (1959)
2. Bunn, Forget.
HEMOGLOBINOPATHIES
Vol. XII
Ed. W. B. Saunders Co.
London (1977).

3. Gruchy, G. C.
CLINICAL HAEMATOLOGY IN MEDICAL PRACTICE
3a. edición
Ed. Blackwell Scientific Pub.
Great Britain (1970).

4. Henry, R. J., Cannon, D. D.
CLINICAL CHEMISTRY AND TECHNICS
2a. edición
Ed. Harper and Row
U.S.A. (1974).

DETERMINACION DE HEMOGLOBINA EN PLASMA

Objetivo:

1. Realizar la determinación de hemoglobina en plasma.
2. Establecer la importancia clínica de esta determinación así como sus limitaciones.

Generalidades: Cuando la exagerada destrucción de la sangre es crónica, puede no haber ningún signo clínico o hallarse ictericia, anemia u otros signos. Cuando la destrucción es muy rápida, en cambio sobrevienen síntomas de toxicidad.

En la mayoría de los trastornos hemolíticos no existe hemoglobinemia. La mayoría de las veces existen cantidades pequeñas e invisibles de hemoglobina libre que se identifican con la bendición. (4)

Importancia de la determinación de hemoglobina en plasma.

Hemoglobina en plasma elevada	Hb en plasma normal o ligeramente elevada
Umbral renal bajo	
Hemólisis intravascular	Esferocitosis hereditaria
Anemia hemolítica autoinmune	Enfermedad por Hb-C
Anemia de células drepanocíticas	
Anemia mediterránea severa	
Defecto glucosa 6-P-deshidrogenasa	

Las concentraciones elevadas de hemoglobina en plasma generalmente se observan con hemoglobinuria. (2)

Fundamento: La acción catalítica de las proteínas que contienen el grupo hem, causan la oxidación de la bencidina por el peróxido de hidrógeno, - dando un color verde que cambia a azul y finalmente a color violeta. La intensidad de l color puede ser comparado en un espectrofotómetro o en un fot colorímetro con soluciones de Hb de concentración conocida.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Reactivo de Bencidina
Solución de peróxido de hidrógeno al 1%
Solución de ácido acético al 10%
Solución estándar de hemoglobina 200 ml/l

Material:

Tubos de ensaye de 13X100 mm
Tubos de ensaye de 16X150 mm
Pipetas serológicas de 1 ml
Pipetas serológicas de 5 ml
Pipetas serológicas de 10 ml
Pipetas Pasteur con bulbo
Gradillas para tubos
Celdas

Equipo:

Espectrofotómetro
Vortex
Centrífuga

1. Extraer 5 ml de sangre venosa y colocarla en un tubo que contenga 0.1 ml de heparina (100 unidades). Mezclar perfectamente.
2. Centrifugar para obtener el plasma, transferirlo a otro tubo y volver a centrifugar.
3. En 3 tubos de 16X150 mm poner lo que indica la siguiente tabla:

	Problema	Estándar	Control
Plasma problema	0.02 ml	-	-
Sol. estándar de hemoglobina	-	0.02 ml	-
Agua destilada	-	-	0.02 ml
Reactivo de Bencidina	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Sol. de peróxido de hidrógeno	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

Mezclar perfectamente. Reposar los tubos 20 minutos a temperatura ambiente

Sol. de ácido acético	10 ml	10 ml	10 ml
-----------------------	-------	-------	-------

Mezclar y dejar reposar por 10 minutos. Leer a 515 nm.

Nota: Efectuar la extracción venosa extremando las precauciones para evitar la más mínima hemólisis.

La bencidina deberá manejarse con mucho cuidado.

Cálculos:

Para obtener la concentración de hemoglobina libre en plasma se hace uso de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorción del problema}}{\text{Absorción del estándar}} \times 200 = \text{mg Hemoglobina/l}$$

en donde:

200 = concentración de la solución estándar de hemoglobina.

VALORES DE REFERENCIA

De 10 a 40 mg de Hemoglobina/l

BIBLIOGRAFIA

1. Crosby, W.H., and Furth, F. W. "A modification of the benzidine method for measurement of hemoglobin in plasma and urine." Blood, 11, 380 (1956).
2. Dacie, J.V., Lewis, S.M.
PRACTICAL HAEMATOLOGY
5a. edición
Ed. Churchill Livingstone
London (1975).

3. Lewis, G.P. "Method using ortho-tolidine for the quantitative determination of haemoglobin in serum and urine"
Journal of Clinical Pathology, 18,235
(1965).

4. Miale, J.V.
LABORATORY MEDICINE HEMATOLOGY
4a. edición
Ed. C. V. Mosby Co.
St. Louis (1972).

Objetivo:

1. Realizar la técnica de electroforesis de Hemoglobina, con una muestra problema.
2. Determinar la importancia de esta técnica por la gran variedad de aplicaciones que tiene.

Generalidades: La hemoglobina es una proteína conjugada y cada molécula de la misma tiene una parte de globina que sirve de soporte a cuatro grupos heme (cada heme es una protoporfirina pigmentada) conteniendo un átomo de hierro en cada uno de los cuatro grupos.

La parte de globina está integrada por cuatro cadenas de aminoácidos, Las cadenas pueden ser de diferentes tipos: alfa, beta, gama, delta y/o epsilon. Los tipos se forman y se controlan genéticamente.

Hemoglobina fetal (Hb F) ($\alpha_2 - \gamma_2$). Esta es la hemoglobina predominante durante la vida fetal. En el momento del parto su concentración es de aproximadamente 50 a 60% de la hemoglobina total. (5)

Hemoglobinas embrionarias (HbE) (ϵ_4) ($\alpha_2 - \epsilon_2$). Estas hemoglobinas no se demuestran sino en la vida embrionaria y también se las conoce como Hb Gower. Hemoglobina A (Hb A) ($\alpha_2 - \beta_2$). Los individuos adultos no solo producen la HbA, sino pequeñas cantidades de HbA₂; HbA₃ y HbF. En todos estos tipos de cadenas alfa son siempre las mismas pero las otras difieren y pueden ser de tipo gama, delta o epsilon y las mismas siempre van en partes individuales.

Composición típica de la sangre	En adultos	En recién nacidos
HbA ₁	95-98 %	15-40 %
HbA ₂	2-3 %	1-2 %
Hb AF	menos de 1%	50-85 %

Composición de las hemoglobinas normales.

HbA (HbA ₁)	Alfa ₂ - Beta ₂
HbA ₂	Alfa ₂ - Delta ₂
Hb ₃	Alfa ₂ - Beta ₂
HbF	Alfa ₂ - Gama ₂
Hb Gower 1	Epsilon 4
Hb Gower 2	Alfa ₂ - Epsilon ₂

Hemoglobina S (HbS) es la más común de las hemoglobinas anormales.

Hemoglobina C (HbC). Esta es una de las hemoglobinas anormales que se presenta con relativa frecuencia. (3)

Todas las hemoglobinopatías hereditarias caen dentro de las 3 categorías siguientes: a) anomalías hereditarias de la estructura de una de las cadenas de la globina, b) anomalías relacionadas con la cantidad de producción de una o más cadenas de la globina y c) fallas en la síntesis normal de HbF y HbA.

Las anomalías de la estructura de la molécula de Hb resultan de la sustitución de uno o más aminoácidos en la cadena de globina. Por ejemplo, la HbS difiere de la HbA, por la sustitución de valina por ácido glutámico en la sexta posición de la cadena beta, mientras que la HbC difiere de la HbA por la sustitución de lisina por ácido glutámico en la sexta posición.

El síndrome de talasemia cae dentro del segundo grupo. La talasemia puede considerarse resultado de un defecto bioquímico en la síntesis de hemoglobina. No se ha demostrado ninguna sustitución de aminoácidos y la hemoglobina, una vez formada, tiene estructura normal. La explicación de la disminución de síntesis de hemoglobina en la talasemia no está muy clara; probablemente incluye cierta alteración del RNA mensajero que dirige la síntesis de una cadena hemoglobínica específica. (3)

En general se utilizan diversos métodos usando electroforesis. Las variantes radican en los diferentes amortiguadores, el uso de diferentes medios de soporte y diversas condiciones de voltaje, amperaje y tiempo de separación.

La hemoglobina es una proteína conjugada; para identificar los diferentes tipos mediante electroforesis se aprovecha el hecho de que se tiene varias proteínas en un medio de un amortiguador sujeto a la acción de un campo eléctrico, la proteína se separa, bajo condiciones determinadas en una serie de bandas estratificadas, las que se forman por la diferente velocidad de emigración que presentan las proteínas en sí. (1)

La velocidad de migración depende principalmente de la carga que presenta la molécula de proteína al pH del amortiguador, principalmente y también - aunque en menor grado del diferente medio de soporte que se utilice para efectuar el corrimiento. Así estos medios pueden ser, entre otros, gel de agar, acetato de celulosa, gel de almidón, papel u otros. En el caso de las diferentes hemoglobinas sus velocidades de emigración depende de su composición - en aminoácidos.(2)

La distancia recorrida por una hemoglobina desconocida se compara con la obtenida con controles de composición conocida. Hay forma de graficar la intensidad de las bandas obtenidas y así poder determinar la concentración de hemoglobina presente. (4)

Fundamento: La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico. A pH 8.4 - 8.6 la hemoglobina está cargada negativamente, por lo tanto migra hacia el ánodo en un campo eléctrico en acetato de celulosa como medio de soporte. Durante la electroforesis varias hemoglobinas son separadas debido a sus diferentes cargas causadas por las variaciones estructurales. Esta separación permite la identificación de las diferentes hemoglobinas.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Solución amortiguadora de Tris - EDTA - ácido bórico pH 8.4
Reactivo hemolizante (EDTA sal disódica, cianuro de potasio
y agua destilada)
Controles para hemoglobina normales y anormales
Colorante de Ponceau S al 0.5%
Solución de ácido acético al 5%
Metanol absoluto
Solución de ácido acético al 30% en metanol absoluto
Solución de cianuro de potasio al 3%
Solución de cloruro de sodio al 0.85%

Material:

Tubos de ensayo de 13X100 mm
Pipetas serológicas de 1 ml
Capilares heparinizados
Tubos de ensayo de 12 X 75 mm

Material Biológico

Sangre venosa con anticoagulante

Equipo:

Cámara de electroforesis
Fuente de poder
Pipeta especial o dosificador
Placas de acetato de celulosa
Aplicadores de muestra
Recipientes para tinción y de coloración
Centrífuga

Forma de preparar la muestra para identificar hemoglobinas (hemolizado).

Se requiere muestras de sangre tomadas con heparina o con EDTA como anticoagulantes. Un paso esencial en la preparación de la muestra es provocar la hemólisis de la misma.

I. Macrométodo

Se toma 0.5 ml de sangre en un tubo de 13X100 mm y se le agregan 10 ml de solución salina fisiológica con lo cual se tiene una dilución 1.20. Se centrifuga por tres minutos. Se descarta la capa de solución fisiológica. Se agrega reactivo hemolizante a las células sedimentadas ya lavadas con solución fisiológica en la proporción de aproximadamente 0.25 ml de células lavadas y 1.5 ml de reactivo hemolizante. Se mezcla bien y el material ya está listo para pasarse por electroforesis. Si no se usa de inmediato debe congelarse; pero es conveniente en este último caso agregar una décima parte de su volumen de cianuro de potasio al 3% para asegurar que no se altere. (6)

II. Micrométodo

Se emplean tubos capilares heparinizados. Se llenan con sangre capilar. Se sella uno de sus extremos. Se centrifuga en una microcentrifuga. Se toma una gota de la parte completa de células y se transfiere la misma a un tubo de ensayo de 12X15 mm. Se agregan 6 gotas del reactivo hemolizante. Se agita y se deja reposar 10 minutos. El hemolizado así obtenido se usa inmediatamente para la electroforesis y si no se va a actuar enseguida debe ser congelado hasta su análisis. (5,6)

1. Poner 100 ml de solución amortiguadora Tris-EDTA-ácido bórico en cada uno de los compartimientos de la cámara de electroforesis. Es importante que el nivel de la solución buffer sea igual en ambos compartimientos.

2. Colocar la placa de acetato de celulosa que se va a emplear dentro de la solución amortiguadora 15 minutos antes de usarla. Tener cuidado de que quede bien equilibrada dentro de la solución.

3. Empleando el dosificador llenar cada orificio de la placa para muestra con los hemolizados problema y los controles que se usarán, poniendo 5 μ l de cada uno.

2. Sacar cuidadosamente la placa de acetato de celulosa que se introdujo en la solución buffer, tener cuidado de no tocar la superficie de la placa con los dedos.

5. Colocar la placa sobre una base horizontal y marcar imaginariamente aproximadamente 2.5 cm de una orilla (de lo ancho de la placa) hacia el centro, en esta marca se aplicarán las muestras.

6. Usando el aplicador, tomar las muestras que se mencionan en el punto 3, presionar el aplicador 3 ó 4 veces sobre las muestras para una mejor toma. Antes de transcurrir 15 segundos después de haber cargado el aplicador, poner las muestras en la placa de acetato de celulosa.

7. Poner la placa de acetato de celulosa dentro de la cámara. Introducir unas tiras de papel filtro dentro de la solución buffer que se encuentra en la cámara y tocar con ellas la placa de electroforesis, para que por medio del papel filtro la placa de acetato de celulosa esté en contacto con la solución buffer. Cubrir la cámara.

8. Aplicar un voltaje de 350 V durante 25 minutos.

9. Sacar cuidadosamente la placa de la cámara de electroforesis y teñirla. (2)

TINCIÓN

10. Introducir la placa en la solución al 0.5% de colorante de Ponceau S durante 5 minutos.

11. Desteñir en 3 lavados sucesivos de la placa en ácido acético al 5% por 2 minutos.

12. Fijar con metanol absoluto 2 veces por 2 minutos.

13. Posteriormente poner la placa en una solución de 30 partes de ácido con 70 partes de metanol absoluto, por 5 minutos para aclarar la placa.

14. Secar al aire durante 1 minuto.

15. Posteriormente secar la placa a 60°C durante 3 ó 4 minutos. Comparar los problemas con los controles.

INTERPRETACION

La electroforesis de Hb es indispensable para la detección de hemoglobinopatías. Las hemoglobinas son genéticamente controladas y la presencia de hemoglobina anormales está asociada con anomalías funcionales, físicas y morfológicas de los eritrocitos y tienen manifestaciones patológicas como son las anemias hemolíticas.

Nota previa :

Frente a la electroforesis en papel, la realizada en placas de acetato de celulosa ofrece las siguientes ventajas:

1. Separación más nítida de las fracciones
2. Acortamiento notable del tiempo de separación, tinción y decoloración
3. Adsorción casi nula de proteína
4. Las placas pueden hacerse transparentes para su evaluación óptica
5. Los resultados concuerdan bien con los de electroforesis libre y con los obtenidos por el método del biuret.

Precauciones

1. Antes de usar la fuente de poder, probarla para comprobar que trabaja a al voltaje que se va a usar en la electroforesis.
2. Si las separaciones de las bandas son confusas, revisar el pH de la solución amortiguadora.

3. Leer cuidadosamente las instrucciones para el equipo que se va a emplear.
4. Tener limpias las manos al coger las placas de acetato de celulosa, una contaminación con sangre o proteínas ocasiona resultados falsos y confusos.
5. Un exceso de muestra ocasiona que ésta penetre en la matriz del acetato de celulosa y por lo tanto no hay corrimiento.
6. Lavar el material empleado inmediatamente despues de ser usado.

BIBLIOGRAFIA

1. Garrick, M.G., Balzer, R.H., Jr., and Carlton, J.P. "An improved method for electrophoretic characterization of globin chains from hemolysates, purified hemoglobins, and fractions selected from chromatographic separations of chains". Anal. Biochem. 34:312 (1970).
2. Helena Laboratories de México, S.A.
Sickle Cell Hemoglobinopathies
Texas.
3. Huisman, T.H.J., and Jonxis, J.H.P.
THE HEMOGLOBINOPATHIES: TECHNIQUES
OF IDENTIFICATION
Ed. Marcel Dekker Inc.
New York (1977).
4. Marengo-Rowe, A.J. "Rapid electrophoresis and quantitation of hemoglobins on cellulose acetate". J. Clin. Pathol. 18:79 (1965).

5. Todd, C. J. and et al.
CLINICAL DIAGNOSIS AND MANAGEMENT
6a. edición
Ed. W. B. Saunders Co.
U.S.A. (1979)

6. Williams, W. J. and et al
HEMATOLOGY
3a. edición
Ed. Mc Graw-Hill Book Co.
U.S.A. (1983).

HEMOGLOBINURIA PAROXISTICA NOCTURNA

Objetivo:

1. Describir las características de la HPN
2. Evaluar la importancia de la prueba de Ham y de lisis en sucrosa para el diagnóstico de esta enfermedad.

Generalidades: La hemoglobinuria nocturna paroxística (HPN) también - llamada síndrome de Marchiafava-Micheli, es una rara afección que se manifiesta en ambos sexos, de cualquier edad, pero más a menudo en la adulta.

Se caracteriza por crisis hemolíticas con paso de hemoglobina a la orina, que se producen preferentemente pero no exclusivamente de noche (durante el sueño o inmediatamente después) y por una hemólisis crónica.(3)

Se ha demostrado que la hemólisis intensa depende de un defecto intravascular, sin saber la verdadera naturaleza de ese defecto, conociéndose únicamente un aumento de la sensibilidad del eritrocito al complemento.(2)

La HPN puede ser sospechada en individuos con anemia hemolítica o hipoplásica graves y asociadas con hemosiderinuria.(3)

Fundamento: Cuando los eritrocitos son suspendidos en una solución isotónica de sucrosa, la lisis de ellos no ocurre. Con la presencia de pequeñas cantidades de suero, las células con HPN sufren lisis en la solución de sucrosa, ya que los glóbulos rojos con HPN son muy sensibles al complemento ocasionando este cambio en la permeabilidad de su membrana.(1)

PRUEBA DE HEMOLISIS EN SACAROSA
TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

- Solución stock de sacarosa
- Solución de trabajo de sacarosa
- Solución de hidróxido de amonio 0.01 M
- Solución de cloruro de sodio 0.15 M

Material:

- Tubos de ensaye de 13X100 mm
- Pipetas serológicas de 1 ml
- Pipetas serológicas de 5 ml
- Pipeta Pasteur con bulbo
- Gradilla para tubos
- Celdas

Material biológico:

Eritrocitos- Las células que se usan son obtenidas por desfibrinación de la sangre del paciente o sangre colectada con EDTA o solución ácido dextrosa. Se centrifuga la muestra para remover el plasma y los leucocitos; los eritrocitos son lavados tres veces con solución de NaCl 0.15 M. Puede determinarse el grupo sanguíneo

Suero- Puede usarse un suero normal fresco, compatible.

Equipo:

- Espectrofotómetro
- Centrífuga

METODOLOGIA

1. Preparar cuatro tubos de ensaye de 13X100 mm de acuerdo al siguiente cuadro.

TUBOS	1	2	3	4
Sol. de trabajo de sacarosa	0.90 ml	0.95 ml	0.95 ml	
Suspensión de Células	0.05 ml	0.05 ml		0.05 ml
Suero	0.05 ml		0.05 ml	
Sol. de hidróxido de amonio 0.01 M				0.95 ml

Mezclar perfectamente e incubar a temperatura ambiente por 60 min.

Sol. cloruro de sodio 0.15 M	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml
------------------------------	--------	--------	--------	--------

Centrifugar a 1500 rpm durante 3 min. Leer en un espectrofotómetro la E del sobrenadante a 540 nm usando agua como blanco. (3)

E = extinción

Cálculos:

El porcentaje de lisis es calculado como sigue:

$$\% \text{ lisis} = \frac{E \text{ tubo } 1 - (E \text{ tubo } 2 + E \text{ tubo } 3)}{(E \text{ tubo } 4 - E \text{ tubo } 2)} \times 100$$

Interpretación: Si se obtiene más del 5% de lisis, el diagnóstico de HNP es casi cierto. Sin embargo, la prueba no siempre refleja verdaderamente el por ciento de células sensibles al complemento y puede haber resultados falsos positivos como en anemia megaloblástica y anemia hemolítica autoinmune.

HEMOLISIS CON SUERO ACIDIFICADO. PRUEBA DE HAM

Fundamento: Los eritrocitos de los pacientes con HNP son lisados con suero normal fresco, especialmente cuando el suero fué acidificado. En esta prueba, el complemento es destruído previamente por calentamiento y con esto se pierde la actividad hemolítica del suero con respecto a las células con HNP. (3)

TECNICA

REACTIVO Y MATERIAL

Reactivos:

Solución de hidróxido de amonio 0.01 M
Solución de cloruro de sodio 0.15 M

Material:

Tubos de ensaye de 13X100 mm
Pipetas serológicas de 0.2 ml
Pipetas serológicas de 1 ml
Pipetas serológicas de 5 ml
Pipetas Pasteur con bulbo
Gradilla para tubos
Celdas

Material biológico:

Eritrocitos. Los mismos que se usan en la anterior técnica.

Suero. Puede usarse un suero normal fresco, compatible. El pH del suero es disminuído "acidificando el suero" con HCl 0.15 N a pH 6.4 - 6.6. El "suero incubado" es preparado por incubación a 56°C por 30 min. Para incrementar la sensibilidad de la prueba, el contenido de magnesio del suero es incrementado por la adición de 0.5 ml de sol. de cloruro de magnesio 0.05 M por cada 3 ml de suero.

Equipo:

El empleado en la técnica de hemólisis en sol. de sacarosa.

TUBOS	1	2	3	4	5	6
Suero acidificado	0.5 ml			0.5		
Suero		0.5 ml				
Suero incubado acidificado			0.5			
Susp. de células	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml		0.05 ml	0.05 ml
Sol. cloruro de sodio 0.15 M				0.05	0.5	
Sol. hidróxido de sodio 0.01 M						0.5

Incubar a 37°C por 60 minutos.

Sol. de cloruro de sodio 0.15 M	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml
---------------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Centrifugar a 1500 rpm durante 3 minutos. Leer en un espectrofotómetro la E del sobrenadante a 540 nm usando agua como blanco.(3)

E = extinción

Cálculos:

$$\% \text{ Lisis} = \frac{E_1 - (E_5 + E_4)}{E_6 - E_3} \times 100$$

Donde E₁ representa la E de los tubos 1,2,3 y E₄, E₅ y E₆ de los tubos 4,5 y 6 respectivamente.

Interpretación: Si ocurre lisis en el tubo 1 (mayor del 1%) y no ocurre lisis en el tubo 2 el diagnóstico del HNP es probable. Pueden presentarse resultados falsos positivos si se usa suero no compatible, si el pH del suero no es el correcto.

BIBLIOGRAFIA

1. Dessypris, E. N., et al. "Increase sensitivity to complement of erythroid and myeloid progenitors in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria". N. Engl. J. Med. 309:690 (1983)
2. Ham, T. H. "Studies on destruction of red blood cells. I. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An investigation of the mechanism of hemolysis, with observations on five cases". Arch. Intern. Med. 64:1271 (1939)
3. Hartman, R. C., and Jenkins, D. E. "The sugar-water test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria". N. Engl. J. Med. 275:155, (1966)
4. Pangburn, M. K., Schreiber, R. D. and Muller-Eberhard H. J. "Deficiency of an erythrocyte membranous protein with complement regulatory activity in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria". Proc. Natl. Acad. Sci. 80:5430 (1983)
5. Williams, W. J. and et al
HEMATOLOGY
3a. edición
ed. Mc Graw-Hill Book Co.
U.S.A. (1983)

HIERRO SERICO

Objetivos:

1. Analizar el metabolismo del hierro en el cuerpo humano, así como la importancia clínica de su determinación.
2. Explicar las posibles causas que originan la deficiencia de éste.

Generalidades: El hierro es un elemento esencial en muchos de los procesos fisiológicos del cuerpo. Se combina con protoporfirina para formar el grupo hem y con diversas proteínas para originar enzimas importantes como catalasa, citocromo y peroxidasa.

La cantidad de hierro absorbida después de la ingestión depende de factores como cantidad y tipo de hierro presente en el intestino, presencia o ausencia de alimento en el tubo digestivo, índole de alimento, estado del hierro almacenado en el cuerpo, actividad de la médula ósea, secreciones del páncreas y función de la mucosidad intestinal.(1)

Aunque el hierro probablemente puede ser absorbido de cualquier parte del tubo digestivo, desde estómago a colon, la absorción es máxima en el duodeno y disminuye progresivamente en las partes más distales del intestino. Debido a que la capacidad del cuerpo para excretar hierro es muy limitada, su absorción en el intestino debe ser controlada para que no se acumule en los tejidos y no alcance niveles tóxicos.

Cuando abandona las células de la mucosa, el hierro en forma férrica es transportado hacia el plasma unido a una B-1-globulina que ha recibido diferentes nombres: transferrina, siderofilina, proteína fijadora del hierro o globulina fijadora del metal. Cada molécula de transferrina se combina con dos iones férricos.(2)

La transferrina no solo transporta hierro en el plasma; también interviene en la transferencia de hierro desde el plasma a los eritrocitos que se están desarrollando, desempeña un papel importante en la utilización de hierro por los normoblastos y reticulocitos en desarrollo, proceso que incluye la fijación de la molécula de transferrina a la membrana celular.

Cualquier cantidad de hierro residual es retenida dentro de la célula donde se combina con la apoferritina para formar ferritina. Si la cantidad de apoferritina es insuficiente el hierro se deposita como pequeños - gránulos de óxido conocidos como hemosiderina. Aproximadamente el 25% de hierro en el cuerpo se almacena en forma de ferritina y hemosiderina. (4)

Importancia de la determinación sérica de hierro: (4)

ALTERACIONES	HIERRO EN SUERO
Hemocromatosis	Elevado
Anemia sideroblástica hereditaria	Elevado
Anemia sideroblástica adquirida	Elevado
Anemias ferropénicas	Disminuido
Infecciones agudas	Disminuido
Síndrome nefrótico (pérdida de siderofilina)	Disminuido

Fundamento: La determinación de hierro sérico se determina separándolo de la transferrina por la adición de una solución amortiguadora a pH 1.9 y reducido simultáneamente a la forma ferrosa por el ácido ascórbico del - amortiguador. El hierro libre reacciona con la batofenantrolina sulfonata da dando una coloración que es proporcional a su concentración. (5)

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Solución de batofenatrolina sulfonada al 0.64%

Solución amortiguadora de glicina-HCL pH 1.9

Solución de ácido ascórbico al 0.5%

Solución de ácido ascórbico al 0.5% en solución amortiguadora de glicina HCL pH 1.9 : Solución de trabajo

Solución de cloruro de sodio al 0.85%

Solución de hierro 150 ug/dl

Material:

Tubos de ensaye de 13 X 100 mm

Pipetas serológicas de 0.1 ml

Pipetas serológicas de 1.0 ml

Pipetas serológicas de 5.0 ml

Celdas

Gradilla para tubos

Material biológico:

Sangre venosa con anticoagulante.

Equipo:

Espectrofotómetro

Agitador para tubos de ensaye

METODOLOGIA

Método de Breale, Broston y Taylor modificado por Loria.

1. Preparar 3 tubos de ensaye de 13 X 100 mm de acuerdo a la siguiente tabla. Realizar el problema por duplicado.

	BLANCO	ESTANDAR	PROBLEMA
Suero	-	-	0.5 ml
Solución salina	0.5 ml	-	-
Solución de hierro 150 $\mu\text{g}/\text{dl}$	-	0.5 ml	-
Solución de trabajo	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

Mezclar vigorosamente y dejar en reposo mínimo 20 minutos. Leer E1 (extinción) a una longitud de onda de 530 nm.

Solución de batofenantrolina sulfonatada.	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
---	---------	---------	---------

Mezclar inmediatamente. Dejar reposar de 30 a 90 minutos. Leer E2 a una longitud de onda de 530 nm. (5)

E1 = extinción 1

E2 = extinción 2

Cálculos:

Calcular la concentración de hierro presente en el suero del paciente, empleando la siguiente fórmula:

Hierro sérico = $\frac{E2 - E1 \text{ del problema}}{E2 - E1 \text{ del estándar}} \times \text{Conc. estándar}$

VALORES DE REFERENCIA:

De 65 - 175 ug/dl.

BIBLIOGRAFIA

1. Balcells, A.G.
LA CLINICA Y EL LABORATORIO
11ava. edición
Ed. Marín, S.A.
México (1978)
2. Beale, R.N., Bostrom, J.O. and Taylor,
R.F. "Improved rapid methods for the
determination of iron content and binding
capacity of serum". J. clin. pathol.
15:156 (1962).
3. Cartwright, G.E.
EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO HEMATOLOGICO
4a. edición
Ed. Científico Médico
España (1973).
4. Cook, J.D. "Clinical evaluation of iron deficiency"
Semin. Hematologo, 19:6, (1982).

5. Loria, A., Monge, B. "Técnicas de dosificaciones séricas de hierro y de capacidad de fijación de hierro". Rev. Inv. Clin. 20:429 (1969).

CAPACIDAD DE FIJACION DE HIERRO

Objetivo:

1. Realizar la técnica de capacidad de fijación de hierro.
2. Evaluar su utilidad.

Generalidades: El hierro es transportado por una proteína específica del plasma, la proteína fijadora de hierro o transferrina ("siderofilina"). La transferrina hace las veces de proteína de transporte porque intercambia átomos de Fe con los tejidos, sin asimilarse así misma en cantidades apreciables. El hierro no fijado a la transferrina se deposita sobre todo en el hígado. En condiciones normales, solo alrededor de la tercera parte de la transferrina se satura con hierro.

La capacidad total del plasma para fijar hierro (C.T.F.H.) es la suma del nivel sérico de hierro y de la cantidad de hierro que puede añadirse al suero antes de que se sature su capacidad de fijación.(2) La capacidad total de fijación de hierro (C.T.F.H.) en el adulto normal es de 300 a 360 mg/dl.

El siguiente cuadro muestra algunas alteraciones del organismo en las que se encuentra alterada la concentración de Fe y la C.T.F.H.

ALTERACIONES	C.T.F.H.	Fe
Enfermedades hepáticas agudas	Normal o Aumentada	Aumentada
Pérdida aguda o crónica de sangre	Aumentada	Disminuída
Infecciones agudas o crónicas	Disminuída	
Neoplasias malignas	Disminuída	
Anemia hemolítica	Disminuída	Disminuída
Anemia perniciosa	Disminuída	
Artritis reumatoide	Disminuída	

Capacidad total de fijación de hierro = Hierro en el suero + Capacidad libre de fijación de hierro.

FUNDAMENTO: Se satura totalmente la transferrina por la adición de una solución de hierro y el hierro libre se precipita por la adición de $Mg CO_3$. El suero del sobrenadante se trata de forma habitual para determinar el hierro total unido a la transferrina después de saturación.(3)

TECNICA

REACTIVO Y MATERIAL

Reactivos:

Los mismos que para hierro sérico.
 Solución de hierro 300 mg/dl
 Solución de hierro 150 mg/dl
 Carbonato de magnesio en polvo.

Material:

El mismo que para hierro sérico.

Material biológico:

Sangre venosa con anticoagulante.

Equipo:

El mismo que para hierro sérico
 Centrífuga.

METODOLOGIA

Método de Beale, Broston y Taylor, modificado por Loria.

1. Preparar tubos de ensaye de 13X100 mm de acuerdo al siguiente cuadro:

	TUBO 1	TUBO 2
Suero	1 ml	1 ml
Solución de hierro 600 mg/dl	1 ml	1 ml

Dejar reposar 20 minutos

Carbonato de magnesio en polvo	100 mg	100 mg
--------------------------------	--------	--------

Mezclar vigorosamente durante 1-2 minutos. Después centrifugar a 3000 rpm durante 30 minutos. Tomar del sobrenadante 0.5 ml de cada uno de los tubos y procesarlos de la misma forma que para hierro sérico. Se puede emplear como estándar la solución de hierro de - 150 ó 300 ug/dl. (3)

Cálculos:

$$\text{Capacidad libre de combinación} = \frac{E2 - E1 \text{ del problema}}{E2 - E1 \text{ del estándar}} \times \text{conc. estándar} \times 2$$

$$\% \text{ de saturación} = \frac{\text{Fe}}{\text{Capacidad libre de combinación}} \times 100$$

VALORES DE REFERENCIA:

Capacidad libre de combinación

Hombres 200 - 300 ug/dl

Mujeres 150 - 250 ug/dl

Capacidad total de combinación

Hombres 300 - 400 ug/dl

Mujeres 250 - 350 ug/dl

% de saturación 20 - 55

BIBLIOGRAFIA

1. Beale, R.N., Bostrom, J. O. and Taylor, R.F. "Improved rapid methods for the determination of iron content and binding capacity of serum". J. Clin. pathol. 15:156. (1962).
2. Dacie, J.V.
PRACTICAL HAEMATOLOGY
5a. edición
Ed. Churchill Livingstone
London (1975)
3. Lorla, A., Monge, B. "Técnicas de dosificaciones séricas de hierro y de capacidad de fijación de hierro". Rev. Inv. clín. 20:429, (1968).

INVESTIGACION DE CELULAS L.E.

Objetivo:

1. Explicar el mecanismo de producción de células L.E. y su importancia.
2. Señalar ventajas y limitaciones del método.

Generalidades: Clasicamente se ha definido al Lupus eritematoso sistémico como un padecimiento de causa desconocida en la que juega el papel principal el mecanismo inmune. En esta compleja enfermedad existen fases en que los pacientes producen tan sólo algunos de entre la enorme variedad de autoanticuerpos frente a diversos tipos de células hemáticas, frente a factores de la coagulación y frente a componentes intracelulares (p. ej., mitocondrias, componentes nucleares, etc.) Los agregados Ac-Ag producidos son captados por los granulocitos que adoptan un aspecto característico (con una gran masa amorfa en el centro de la célula, que desplaza al núcleo multilobulado hacia la periferia), dando origen a las llamadas células L.E. La mayoría de las veces, los granulocitos que se convierten en células L.E. son neutrófilos.(1)

Para distinguir una célula L.E. real de un neutrófilo que por azar fagocitó un núcleo, es por el aspecto amorfo "a través de vidrio esmerilado" con el que la célula L.E. se observa en las preparaciones. En extendidos sanguíneos teñidos con los colorantes de Romanowsky, las células L.E. aparecen como neutrófilos con un citoplasma grande, esférico que se tiñe de color púrpura.(3)

Fundamento: Desfibrinar la muestra de sangre, separar la capa de leucocitos y por medio de un frotis teñido con colorante de Wright buscar la presencia de células L.E.

TECNICA

MATERIAL Y REACTIVOS

Material:

Tubos de ensaye de 13 X 100 mm
Tubos de Wintrobe (para hematocrito)
Pipetas Pasteur con bulbo
Vasos de precipitados de 100 ml
Portaobjetos limpios y desengrasados
Varilla de vidrio
Aplicadores de madera
Gasa

Material biológico:

Sangre venosa

Equipo:

Microscopio
Centrifuga
Baño de incubación a 37°C

Reactivos:

Solución colorante de Wright

PROCEDIMIENTO

1. Extraer aproximadamente 5 ml de sangre del paciente, colocarlo en un tubo de ensaye de 13 X 100 mm y ponerlo en baño incub. a 37°C durante 2 horas.

2. Centrifugar a 2,000 rpm durante 5 minutos. Decantar el suero y desecarlo. Si el coágulo se encuentra adherido a las paredes del tubo, desprenderlo con un aplicador de madera.
3. Desmenuzar y macerar completamente el coágulo con una espátula o una varilla de vidrio.
4. Colarlo a través de gasa recogiendo el colado en un vaso de precipitados de 100 ml.
5. Transferir con pipeta Pasteur, la sangre desfibrinada a un tubo de hematocrito y centrifugarlo a 1,000 rpm durante 10 minutos.
6. Decantar el suero sobrenadante.
7. Tomar la capa de leucocitos con una pipeta Pasteur y con ella hacer varios frotis. Teñirlos con solución colorante de Wright.
8. Observar el microscopio buscando las células L.E.

VALORES DE REFERENCIA

No deben encontrarse células L.E.

BIBLIOGRAFIA

1. Gradwohl's, R.
CLINICAL LABORATORY METHODS AND DIAGNOSIS
7a. edición, Vol. I
Ed. C.V. Mosby Co.
U.S.A. (1970)
2. Lee, S. L., and Sanders, M. "A disorder of blood coagulation in systemic lupus erythematosus".
Journal of Clinical Investigation, 34, 1814, (1955)

3. Miale, J.V.

LABORATORY MEDICINE HEMATOLOGY

4a. edición

Ed. C.V. Mosby Co.

St. Louis (1972).

TINCIÓN DE SIDEROBLASTOS Y SIDEROCITOS

Objetivo:

1. Establecer la diferencia entre sideroblastos y los siderocitos.
2. Evaluar la importancia clínica de la reacción tintórea con azul de Prusia.

Generalidades: Los sideroblastos (normoblastos) son los precursores de los eritrocitos y presentan gránulos de hierro, que reflejan tanto el valor del aporte de hierro como el estado de síntesis de hemoglobina. El número de sideroblastos depende del nivel de hierro presente en el suero. Si este nivel es normal, del 20 al 40% de todos los normoblastos son sideroblastos. Su número se incrementa en anemias hemolíticas, anemia perniciosa y hemocromatosis. (1,2)

Los siderocitos son eritrocitos que contienen finas inclusiones de hierro no unido a la hemoglobina. Al realizar una tinción de Wright, los gránulos de hierro presentes en los eritrocitos se parecen a los observados en la basofilia difusa, por lo que se hace la tinción con azul Prusia. La cantidad de siderocitos se incrementa en anemias hemolíticas; severos envenenamientos, después de esplenectomía, en anemias caracterizadas por la síntesis anormal de grupo hemo. (1,2)

Fundamento: Las inclusiones de hierro que contienen los sideroblastos y los siderocitos son demostradas por la reacción tintórea con azul Prusia, observándose granulaciones de color azul.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

- Solución de ferrocianuro de potasio
- Solución colorante de Pappenheim

Material:

Portaobjetos con extendidos sanguíneos o preparaciones de médula ósea.

Equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

METODOLOGIA

1. Teñir un extendido sanguíneo o de médula ósea con la técnica de Pappenheim.

2. Cubrir la preparación previamente teñida con solución de ferrocianuro de potasio durante 3 ó 4 minutos. Lavar con agua destilada y secar al aire.

3. Observar al microscopio en inmersión. Contar los siderocitos que se presenten por cada 1000 eritrocitos.

4. Si se usó una preparación de médula ósea contar los sideroblastos presentes en 100 normoblastos, observar la abundancia de los gránulos de hierro.

VALORES DE REFERENCIA:

Siderocitos: en sangre periférica 0-3 por 1000

Sideroblastos: en médula ósea 20-40%

BIBLIOGRAFIA

1. Gradwohl's, R.
CLINICAL LABORATORY METHODS AND DIAGNOSIS
7a. edición. Vol. I
Ed. C.V. Mosby Co.
U.S.A. (1970)

2. Miale, J.V.
LABORATORY MEDICINE HEMATOLOGY
4a. edición
Ed. C.V. Mosby Co.
St. Louis (1972)

3. Mills, H. and Lucia, S.P. "Familial
hypochromic anemia associated with
postsplenectomy erythrocytic inclusion
bodies". Blood 4: 891 (1949)

CAPITULO IV

HEMOSTASIA

HEMOSTASIA

La hemostasia es el proceso en virtud del cual la sangre líquida se transforma en coágulo sólido. Después que un vaso comienza a sangrar, se ponen en marcha fenómenos físicos y químicos, que en términos de dos a seis minutos originan la formación de un coágulo, el cual - ocluye la solución de continuidad del vaso e impide la pérdida ulterior de sangre. **DIAGRAMA 3**

La hemostasia requiere de interacción de:

- 1o. Componente vascular
- 2o. Componente celular o plaquetario
- 3o. Mecanismo de coagulación de la sangre
- 4o. Componente hemodinámico
- 5o. Componente anticoagulante
- 6o. Mecanismo fibrinolítico

La lesión a una pared vascular va seguida de vasoconstricción - refleja inmediata y temporal. Las plaquetas son atraídas hacia la zona lesionada y forman un tapón en pocos segundos. La fase inicial de la hemostasia va seguida de la formación de un coágulo de fibrina que cierra eficazmente el vaso y facilita la reparación. El coágulo de - fibrina sufre disolución después que la reparación del vaso se ha completado.(2)

Las plaquetas desempeñan una función crítica en la hemostasia - que consiste en: 1 mantenimiento continuo de la integridad vascular; 2 paro inicial del sangrado por formación de tapón plaquetario; 3 estabilización del tapón hemostático por la contribución de un fosfolí

vido al proceso de formación de fibrina. Con sus propiedades de sello y procoagulantes, la plaqueta presenta una unidad hemostática completa como implica su nombre funcionalmente más apropiado de trombocito.(3)

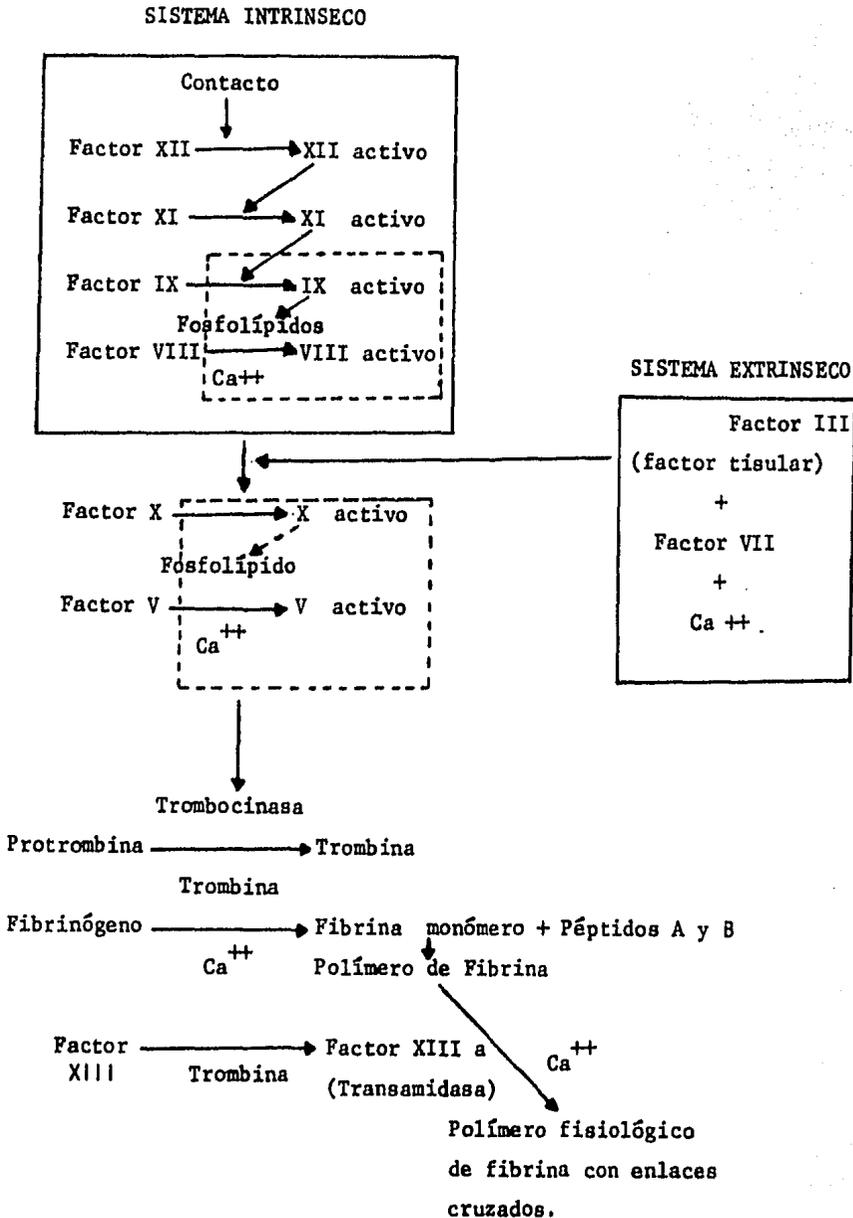
Los primeros conceptos sobre la coagulación de la sangre visualizaron la interacción de cuatro factores, una trombocinasa derivada del tejido que activaba una proenzima circulante, la protrombina, en la presencia de calcio a la enzima proteolítica trombina, la cual, a su vez, transformaba el substrato circulante fibrinógeno en fibrina polimerizada.⁽²⁾ En la investigación del mecanismo de la activación de la protrombina, se descubrieron otros factores de la coagulación. Con el fin de evitar confusión de terminología, el Comité Internacional para Nomenclatura de Factores de Coagulación de la Sangre ha establecido nomenclatura de estos factores y los sinónimos más frecuentemente utilizados son los siguientes:

COMITE	SINONIMOS
Factor I	Fibrinógeno
Factor II	Protrombina
Factor III	Tromboplastina tisular Trombocinasa Activador extrínseco de protrombina
Factor IV	Calcio
Factor V	Factor lábil Proacelarina Globulina aceleradora plasmática Cofactor de Tromboplastina
Factor VI	No asignado (producto intermedio)
Factor VII	Factor estable Proconvertina SPCA (Acelerador sérico de la conversión de la Protrombina) Co-Tromboplastina Autoprotrombina I
Factor VIII	Factor antihemofílico A (AHF) Tromboplastinógeno Cofactor plaquetario I Factor Tromboplástico A del plasma
Factor IX	Factor antihemofílico B (BHF)

COMITE	SINONIMOS
	Componente de la tromboplastina Plasmática (PTC)
	Factor Christmas
	Cofactor Plaquetario II
	Autoprotrombina II
Factor X	Factor Stuart-Prower
Factor XI	Antecedente de la Tromboplastina Plasmática (PTA)
	Factor antihemofílico C
Factor XII	Factor de Hageman
	Factor de contacto
Factor XIII	Factor Estabilizante de la Fibrina (FSF)
	Fibrinasa

DIAGRAMA 3

Esquema de la cascada enzimática:



En el laboratorio clínico existen pruebas que investigan cada uno de los componentes del proceso de la hemostasia. Algunos muy conocidos se practican de rutina, otros requieren experiencia para su realización.

RECOMENDACIONES GENERALES PARA REALIZAR
LAS PRUEBAS DE EVALUACION DE LA HEMOSTASIA

La evaluación de laboratorio de la hemostasia tiene dos objetivos principales: (1) establecer la presencia o ausencia de un trastorno - hemorrágico y (2) hacer identificación diagnóstica específica de cualquier anomalía encontrada.(4)

1. El Material que se use en las pruebas de la evaluación de la - hemostasia debe estar limpio, seco y libre de cualquier traza de detergente, lavarse y enjuagarse debidamente con agua bides tilada y emplearla solamente para estas pruebas.
2. El anticoagulante que se emplea debe ser el adecuado, o sea, - solución de citrato de sodio al 3.8% empleándolo en una proporción de una parte de anticoagulante para nueve partes de sangre.
3. No usar reactivos con fecha de caducidad vencida. Evitar la - contaminación de los reactivos con los que se esté trabajando. Y que éstos se encuentren mantenidos en las condiciones de temp. durante su almacenaje.
4. Al realizar las pruebas de coagulación, los reactivos empleados así como las mezclas de ellos deben incubarse a la temperatura mencionada en cada técnica, sin sobrepasarla, ya que se trabaja con un sistema enzimático. También debe tomarse el tiempo de incubación debidamente.

5. Efectuar cada prueba por duplicado, para tener una mayor confiabilidad en los resultados.
6. Para cada determinación, realizar una prueba control, empleando para ello plasma humano normal fresco o un plasma liofilizado.
7. La sangre debe ser mezclada con el anticoagulante por inversión suave del tubo inmediatamente, no debe agitarse.
8. La muestra deberá procesarse máximo después de dos horas de haberla tomado, en caso de no ser así deberá refrigerarse y trabajarla en el transcurso de la mañana.

DERIVADOS SANGUINEOS USADOS EN LOS
PROCESOS DE LA COAGULACION

Plasma normal adsorto.

- 1o. Se mezclan 4.5 ml de sangre venosa y 0.5 ml de oxalato de sodio 0.1 M. Separar el plasma centrifugando a 1,000 rpm durante 10 min. y se procede a su adsorción según el siguiente procedimiento.
- 2o. Mezclar el plasma con BaSO_4 en la proporción de 100 mg de éste por cada ml del plasma.
- 3o. Incubar a 37°C en baño María durante 15 min., mezclar cada 5 mín., por lo menos, con agitación suave.
- 4o. Centrifugar el tubo a 3,000 rpm por 15 min.
- 5o. Separar el plasma con una pipeta Pasteur. Guardarlo en refrigeración. En el momento de usarse se diluye 1:5 con solución salina isotónica.

Plasma normal envejecido.

- 1o. Colectar plasma como se menciona en el punto 1, para el plasma normal adsorto.
- 2o. Incubar el plasma anterior a 37°C durante 24 horas.

Plasma rico en plaquetas.

- 1o. Obtener 9 ml de sangre venosa por medio ya sea, de una jeringa siliconizada o bien dejar fluir la sangre a través de la aguja directamente a un tubo de centrifuga que contenga 1 ml de solución de citrato de sodio al 3.8%. Mezclar por inversión del tubo.
- 2o. Centrifugar el tubo a 1,000 rpm durante 5 minutos.
- 3o. Separar el sobrenadante que es el plasma rico en plaquetas. Guardar en refrigeración.

Plasma pobre en plaquetas.

- 1o. Colectar la muestra de sangre como para obtener plasma rico en plaquetas.
- 2o. Centrifugar el tubo a 3,000 rpm durante 30 minutos.
- 3o. Separar el sobrenadante que es el plasma pobre en plaquetas. Se guarda en refrigeración.

BIBLIOGRAFIA

1. Dacie, J.V., Lewis, S. M.
PRACTICAL HAEMATOLOGY
5a. edición
Ed. Churchill Livingstone
London (1975)

2. Leavell, B.S.
HEMATOLOGIA CLINICA
4a. edición
Ed. Interamericana
México (1977)

3. Todd, C.J. and et al.
CLINICAL DIAGNOSIS AND MANAGEMENT
6a. edición
Ed. W.B. Saunders Co.
U.S.A. (1979)

4. Wintrobe, M.M.
CLINICAL HEMATOLOGY
8a. edición
Ed. Lea and Febiger
Philadelphia (1984)

TIEMPO DE SANGRADO

Objetivo:

- 1: Realizar dos determinaciones de tiempo de sangrado y deducir sus fundamentos.
2. Evaluar la importancia de esta determinación así como sus ventajas y limitaciones.

Generalidades: Antes de analizar la prueba del tiempo de sangrado, deben obtenerse detalladamente datos personales y familiares del paciente, incluyendo los breves episodios de sangría que se le hayan presentado en el curso de su vida, así como alergias, anomalías en la función hepática, etc.

Ya que esta prueba nos da información de la función hemostática global de las plaquetas *In vivo* por la determinación de la duración del sangrado de una incisión estándar en la piel mientras se mantiene aumentada la presión venosa, es particularmente útil en la evaluación generalizada de pacientes con trombocitopenia debido a su capacidad para discriminar entre las plaquetas con función normal y las que tienen función disminuida o aumentada.

Tiempos de sangrado prolongados reflejan función plaquetaria alterada, como la que se asocia con la ingestión de ácido acetilsalicílico, uremia, enfermedad de von Willebrand u otros trastornos de la función plaquetaria (intrínseca o extrínseca), insuficiencia del factor VII, Trombocitopenia de Glanzmann. Por lo contrario, los tiempos de sangrado más cortos que los previstos en plaquetas normales son - debido a eficiencia hemostática aumentada de plaquetas jóvenes, asociada con trastornos de destrucción de la plaqueta como en la púrpura trombocitopénica inmunitaria o en la recuperación de la médula o sea después de quimioterapia. (4)

El tiempo de sangrado representa una prueba sencilla y útil (aunque algo imprecisa) de la eficacia de las funciones capilares y plaquetarias. Es preferible el método de Ivy al de Duke, pues las condiciones son más constantes. Un tiempo de sangría normal no excluye la propensión a sangrar; si se sospecha que existe un trastorno hemorrágico debe repetirse la prueba en otra parte del cuerpo. (1)

Fundamento: La determinación del tiempo de sangrado mide la capacidad de pequeños vasos sanguíneos de controlar el sangrado después de una lesión, número de plaquetas, así como la capacidad de éstas para la formación del tapón plaquetario, y defectos en los factores de la coagulación.

TECNICA

Métodos de:

- a.- Duke
- b.- Ivy

Reactivos y Material

Reactivos:

Solución de alcohol etílico al 70%

Equipo:

Baumanómetro
Cronómetro

Material:

Lancetas estériles
Torundas de algodón
Papel filtro

METODOLOGIA**A. Método de Duke**

1. Dar masaje suave al lóbulo de la oreja, limpiarlo con una torunda de algodón impregnada con alcohol y dejarlo evaporar. También puede hacerse con la yema del dedo.

2. Con una lanceta estéril hacer una punción de 2-3 mm de profundidad (con un movimiento rápido) en el borde inferior del lóbulo de la oreja o en la yema del dedo. En el momento en que aparece la gota de sangre se marca el tiempo en el cronómetro.

3. Cada 15 seg. se aplica cuidadosamente sobre la gota de sangre - el borde de un papel filtro, sin tocar la herida.

4. Parar el cronómetro en el momento en que el papel filtro ya no se manche de sangre.

NOTA: No abarcar venas visibles ni lesiones cutáneas. Hay que recordar - que ciertos factores locales (presencia de hematomas, etc.) pueden hacer variar el tiempo de sangrado, por lo que es recomendable hacer la prueba en ambas orejas.

VALORES DE REFERENCIA

De 1 a 3 minutos.

b. Método de Ivy

1. En el brazo del paciente se coloca el baumanómetro a una presión de 40mm de Hg., la cual se mantiene durante toda la prueba.

2. En el antebrazo del paciente se busca un área vascular, se limpia con una torunda con alcohol y con una lanceta estéril, se efectúa una punción de 2-3 cm de profundidad (con un movimiento rápido), evitando las venas visibles o lesiones cutáneas. En el momento en que aparece la gota de sangre se marca el tiempo en el cronómetro.

3. Cada 30 segundos secar la gota con un papel filtro, procurando no tocar la piel.

4. En el momento en que el papel ya no se mancha o se mancha con suero, parar el cronómetro.

5. Efectuar la prueba por duplicado haciendo la segunda punción a una distancia de mas o menos 5 cm. de la primera.

VALORES DE REFERENCIA

De 2 a 6 minutos.

BIBLIOGRAFIA

1. Ivy, A. C., Nelson, D. and Bucher, G.
"The standardization of certain factors in the cutaneous venostasis bleeding time technique". J. Lab. Clin. Med. 26:1812 (1940).
2. Kumar, R., Ansell, J.E., Canoso, R. T. and Deykin, D. "Clinical Trial of a new bleeding device". Am. J. Clin. Pathol. 70:642 (1978).

3. Mielke, J. Ch., Kenshiro, M. M.,
Weiner, I. A., and Rapaport, J. M.
"The standardized normal Ivy bleeding
time and its prolongation by aspirin".
Blood, Vol. 34 No. 2 (1969).

4. Todd, C. J. and et al
CLINICAL DIAGNOSIS AND MANAGEMENT
6a. edición
Ed. W. B. Saunders Co.
U.S.A. (1979).

TIEMPO DE COAGULACION

Objetivo:

1. Realizar la técnica de tiempo de coagulación.
2. Establecer la importancia de la prueba tiempo de coagulación en el diagnóstico clínico.

Generalidades: En el proceso de la coagulación de la sangre intervienen interacciones complejas entre sistemas enzimáticos (que incluyen varias proteínas lábiles), proteínas plasmáticas, iones y lípidos, por lo que la muestra de sangre se recogerá en condiciones inmejorables sin traumatismos y en el tiempo mínimo. (3)

La prueba de la coagulación sanguínea es específica que mide la eficacia global de la misma, o sea, mide la eficiencia de las tres etapas de la coagulación intrínseca: formación del activador de la protrombina, formación de la protrombina y formación de la fibrina.

Se considera una prueba de poca sensibilidad en la que anomalías moderadas de la primera etapa de la coagulación sanguínea no son detectadas. (1)

Fundamento: El tiempo de coagulación nos da un índice aproximado de la eficacia global del sistema intrínseco de la coagulación. La sangre total formará un coágulo firme, cuando se extrae del sistema vascular y se expone a una superficie extraña.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Solución de alcohol etílico al 70%

Material:

Tubos de ensaye de 13 X 100 mm

Gradilla

Lancetas estériles

Capilares de algodón

Material biológicos:

Sangre venosa; sangre capilar

Equipo:

Baño de incubación a 37°C

Cronómetro

METODOLOGIA

I. Método de Lee y White

- 1o. Colocar 2 tubos de ensaye de 13 X 100 mm limpios en un baño a 37°C, poner 2 ml. de sangre obtenida por punción en cada tubo previamente etiquetado con 1 y 2.
- 2o. El cronómetro es puesto en marcha tan pronto como la sangre penetra en la jeringa.
- 3o. Se inspecciona el tubo número 1 cada 5 segundos con agitación suave y el tubo número 2 cada 30 segundos, con el fin de determinar el tiempo de coagulación.

Esta observación se empieza a realizar a partir del tercer minuto de incubación de los tubos con la muestra.

40. En el momento en que se invierten los tubos en un ángulo de 90° sin que exista flujo de sangre se toma el tiempo. Se saca el promedio del tiempo de los dos tubos para obtener el tiempo de coagulación.

VALORES DE REFERENCIA:

De 5 a 10 minutos.

II. Método empleando sangre capilar.

10. Puncionar con una lanceta estéril (de un solo movimiento) la yema de un dedo previamente asepticada.
20. Poner en marcha el cronómetro.
30. Desechar la primera gota que fluya y llenar un capilar cuidando que no queden burbujas de aire.
40. Cuando el cronómetro marque tres minutos, proceder a romper pedazo a pedazo el capilar. En el momento en que se observe el hilo de fibrina parar el cronómetro.

VALORES DE REFERENCIA

De 3 a 5 minutos.

BIBLIOGRAFIA

1. Margoulies, H. and Baker, N. W.
"The coagulation time of blood in
silicone tubes". Am. J. Med. Sc.
218:42 (1949).

2. Tietz
QUIMICA CLINICA MODERNA
1a. edición
Ed. Interamericana
México (1972).

3. Tocantis, L., Kazal, L.
COAGULACION DE LA SANGRE, HEMORRAGIA
Y TROMBOSIS
Ed. Científico-Médico
México (1972).

RETRACCION DEL COAGULO

Objetivo:

1. Realizar la técnica de la retracción del coágulo y evaluar sus ventajas y limitaciones.
2. Establecer la importancia de la prueba de la retracción del coágulo.

Generalidades: Cuando se permite coagular la sangre total y se le observa durante cierto tiempo, se verá que el coágulo disminuye de tamaño y que sale de él un suero transparente. Este fenómeno se denomina retracción del coágulo y es una de las funciones de las plaquetas y también depende del número de éstas. Según se cree este proceso se debe a una desintegración parcial del coágulo de fibrina y depende de las plaquetas funcionales íntegras que estén presentes durante la formación del coágulo. Este fenómeno es esencial en la formación de un firme tapón hemostático. (3)

La retracción del coágulo puede ser influenciada por una concentración baja de fibrinógeno, por una conversión deficitaria del fibrinógeno o por una actividad fibrinolítica excesiva. Una rápida sedimentación de los hematíes durante la retracción del coágulo, puede ser el primer indicio de la coagulación intravascular diseminada. (2)

Fundamento: Cuando se deja coagular espontáneamente la sangre total, el coágulo inicial se compone de todos los elementos sanguíneos. Con el transcurso del tiempo el coágulo reduce su masa y exprime suero líquido del mismo coágulo. Esto es debido a la acción de las plaquetas sobre la red de fibrina.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Material:

Tubos de centrifuga graduados
Espirai de alambre

Materiai biológico:

Sangre venosa

Equipo:

Centrifuga
Baño de incubación a 37°C

METODOLOGIA

1. En un tubo de centrifuga graduado, limpio y sin rayaduras colocar 5 ml de sangre recientemente tomada por punción venosa.
2. Inmediatamente después, insertar hasta el fondo del tubo una espiral de alambre. Poner el tubo en baño de agua a 37°C por una hora.
3. Levantar suavemente la espiral separando el coágulo del suero, dejarlo escurrir 1 a 2 minutos.
4. Lea el volumen de suero remanente en el tubo aproximadamente a décimo de ml.

Ejemplo:

Glóbulos rojos + suero libre	5.0
Suero libre	3.2
Paquete	1.8
Total	8.2

Ahora sí el hematocrito del paciente es 44 lo restamos de 100 y tenemos 0.56, cifra que multiplicada por total nos dá 4.592.

La cantidad de suero libre la dividimos entre esta cifra y el resultado lo multiplicamos por 100 obteniendo así el % de retracción.

$$\frac{3.2}{4.592} \times 100 = 0.696 \quad (100)$$

= 69.6 % de retracción

VALORES DE REFERENCIA

De 40 a 94% de retracción.

BIBLIOGRAFIA

1. Dacie, J. V., Lewis, S. M.
PRACTICAL HAEMATOLOGY
5a. edición
Ed. Churchill Livingstone
London (1975).
2. Tocantís, L., Kazal, L.
COAGULACION DE LA SANGRE, HEMORRAGIA
Y TROMBOSIS
Ed. Científico-Médico
México (1972).

3. Todd, C. J. and et al
CLINICAL DIAGNOSIS AND MANAGEMENT
6a. edición
Ed. W. B. Saunders Co.
U.S.A. (1979).

FRAGILIDAD CAPILAR

Objetivo:

1. Realizar la técnica de fragilidad capilar y deducir su fundamento.
2. Evaluar la importancia clínica de esta técnica, así como sus limitaciones.

Generalidades: La fragilidad vascular se puede estudiar aumentando la presión sanguínea intracapilar por obstrucción del retorno venoso o disminuyendo la presión extracapilar. La fragilidad capilar depende del estado de elasticidad de la pared capilar y de la función - plaquetaria. (3)

Con frecuencia se encuentra aumentando la fragilidad capilar en trombocitopenias, tromboastenia de Glarizmann, enfermedad de Von - Willebrand, diabetes mellitus, hipertensión, artritis reumatoide, dig proteinemias, en regímenes nutricionales mal balanceados, etc.

La mayoría de las alteraciones anteriores, puede corregirse la alteración de la pared celular con tratamientos prolongados con vitamina C. (2)

Fundamento: Se aplica una presión positiva en el antebrazo del - paciente, la cual ocasiona la salida de algunos eritrocitos traducido clínicamente por la aparición de petequias; esta prueba nos permite - valorar la cantidad y calidad de las plaquetas, pudiendo detectar ade más la fragilidad capilar.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Equipo:

Baumanómetro
Cronometro

METODOLOGIA

1o. Inspeccionar la piel de la mitad superior interna del antebrazo del paciente en busca de petequias, si las hay, marcarlas con un punto de tinta. Buscar un área de 7 a 10 cm y trazar un círculo.

2o. Tomar la presión arterial.

3o. Inflar el manguito del baumanómetro y aplicar una presión intermedia entre las presiones diastólica y sistólica, por ejemplo 90 mm de Hg. Sostener dicha presión de 3 a 5 minutos.

4o. Se retira el baumanómetro y se espera a que el brazo se descongestione (de 5 a 15 minutos).

5o. Contar el número de petequias que hayan aparecido en un área circular de 5 cm de diámetro. Dicha área debe escogerse preferentemente por abajo del pliegue del codo y libre de la zona de presión del manguito del baumanómetro.

6o. Ocasionalmente sucede que no aparecen petequias en el círculo - pero se encuentran en toda la superficie del antebrazo, pliegue del codo y mano. En este caso se da la prueba como positiva, pero sin mencionar el número de petequias, interpretando la intensidad de la respuesta con cruces de + a +++.

VALORES DE REFERENCIA

10 Petequias : Normal
10 a 20 petequias : Dudosa
más de 20 petequias : Anormal

BIBLIOGRAFIA

1. Kramar, J. "The determination and evaluation of capillary resistance-A review of methodology".
Blood, 20, 83 (1962).
2. Miale, J. V.
LABORATORY MEDICINE HEMATOLOGY
4a. edición
Ed. C. V. Mosby Co.
St. Louis (1972).
3. Wintrobe, M. M.
CLINICAL HEMATOLOGY
7a. edición
Ed. Lea and Febiger
Philadelphia (1974).
4. Wild, F. and Newlands, M.J.
"Sources of platelet factor for the thromboplastin generation test".

5. Williams, W.J. and et al
HEMATOLOGY
3a. edición
ed. Mc Graw-Hill Book Co.
U.S.A. (1983).

Objetivo:

1. Realizar la técnica de la adhesividad plaquetaria y deducir sus fundamentos.
2. Evaluar las condiciones que se deben seguir y reconocer la utilidad, ventajas y limitaciones del método.

Generalidades: Las plaquetas tienen tres funciones principales en la hemostasia: la agregación y formación de un tapón hemostático, la actividad trombolástica y la retracción del coágulo.

Las plaquetas circulan en el torrente circulatorio como cuerpos desunidos, pero durante el proceso de la coagulación se agrupan entre sí, para formar grandes masas. Las plaquetas, como el fibrinógeno tienen la propiedad inherente de la autoagregación. En el medio ambiente de la sangre circulante, las plaquetas están separadas por fuerzas que se repelen. Cuando la sangre se extravasa o hay una lesión de la pared vascular, este medio ambiente se altera y las plaquetas se agregan entre sí o se adhieren a la pared alterada. (3)

In vitro las plaquetas se adhieren al vidrio; se han creado una serie de métodos para estimar cuantitativamente este fenómeno. La adhesión de las plaquetas al vidrio es diferente a su adhesión a la colágena. Las plaquetas de pacientes con tromboastenia, por ejemplo; no se adhieren al vidrio pero se adhieren normalmente a la colágena. Las pruebas in vitro son útiles en clínica y han demostrado una disminución de la adhesión al vidrio de las plaquetas de pacientes con enfermedad de von Willebrand, trombopatía, insuficiencia renal crónica y afibrinogenemia. Se ha comprobado plenamente que el ADP influye o desempeña un papel fundamental en la adhesividad de las plaquetas. El difosfato de adenosina (ADP) parece proporcionar una base común para la acción de diversas sustancias que se sabe provocan aglutinación de plaquetas. La acción del ADP necesita Ca^{++} y posiblemente un cofactor proteínico. La supresión de Ca^{++} o de ADP origina dispersión de las plaquetas. (2) DIAGRAMA 4.

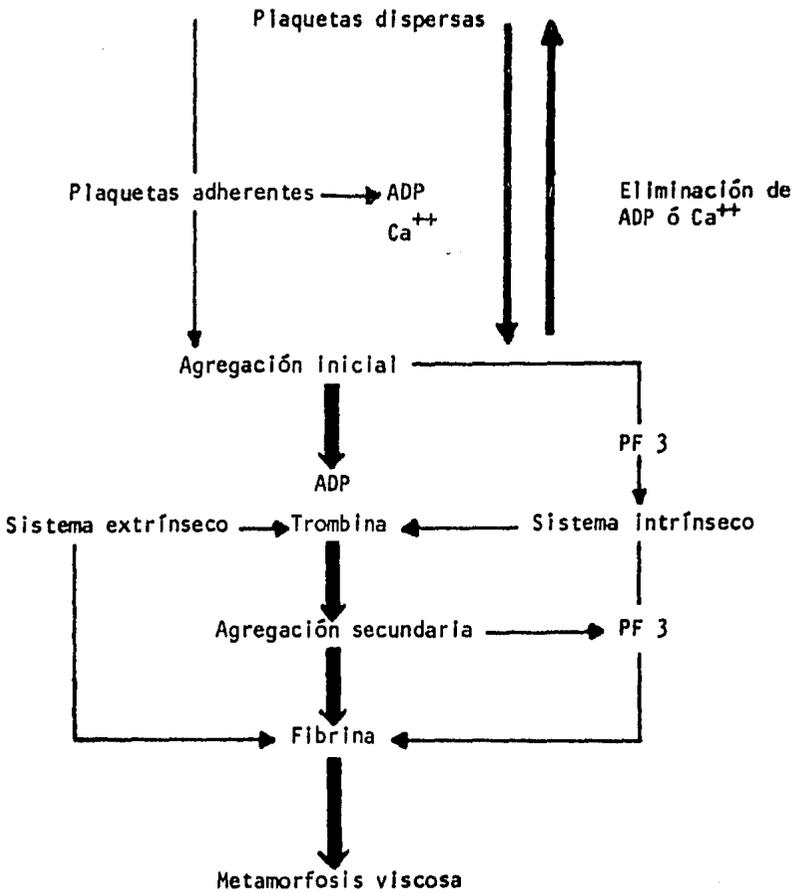


DIAGRAMA 4: FENOMENO DE LA ADHESIVIDAD PLAQUETARIA
IN VITRO

Fundamento: Al lesionarse un vaso sanguíneo, se expone el llamado cemento intercelular, constituido básicamente por colágena y elastina en cuyas moléculas se localiza un radical $+NH_3$ con carga electropositiva que ejercerá una atracción importante sobre las plaquetas, éstas se unen al endotelio vascular.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Líquido diluyente para plaquetas
Solución de alcohol etílico al 70%

Material:

Pipetas de Thoma para glóbulos rojos
Cámara de Neubauer con cubrehematímetro
Caja de Petri
Lancetas estériles
Torundas de algodón

Equipo:

Agitador para pipetas de Thoma
Microscopio
Cronómetro

METODOLOGIA

1. Aseptizar con una torunda alcoholada el pulpejo del dedo o el lóbulo de la oreja.

2. Con una lanceta estéril, hacer una punción de 2-3 mm de profundidad (con un movimiento rápido). En el momento de aparecer la gota de sangre, - marcar el tiempo en el cronómetro.

3. No hacer presión; la sangre debe escurrir libremente. Llenar la pipeta de Thoma hasta la marca de 1, completar hasta la marca 101 con el líquido diluyente de plaquetas. Esta misma operación se repite en intervalos de 30 segundos hasta que la sangre deje de fluir.

4. Se cuentan las plaquetas con el método habitual (descrito anteriormente), se divide entre el número de cuentas y el resultado se resta del número de la cuenta venosa y se efectúa una regla de tres.

A continuación se enuncia un ejemplo de esta determinación:

Suponiendo que se hayan hecho 5 tomas con los siguientes resultados de cada una.

a)	230,000	plaquetas/mm ³	de sangre
b)	177,000		
c)	222,000		
d)	142,000		
e)	200,000		
	<hr/>		
Total	971,000		

Si dividimos el total 971,000 entre el número de cuentas que es 5, tenemos: 194,200. Suponiendo que el número de plaquetas de la cuenta venosa haya sido 285,000 plaquetas / mm³ de sangre, la cual tomamos como 100%, le restamos 194,200 por lo que queda 90,800, efectuando la regla de tres nos queda:

$$\begin{array}{r} 285,000 \text{ plaquetas / mm}^3 \text{ ————— } 100\% \\ 90,800 \text{ plaquetas / mm}^3 \text{ ————— } X \end{array}$$

X = 32% de adhesividad.

VALORES DE REFERENCIA

De 20 a 40% de adhesividad.

BIBLIOGRAFIA

1. Hartmann, R. C.
"Tests of platelet adhesiveness and their clinical significance". Semin. Hemat 5:60 (1968).

2. Salzman, E. W.
"Measurement of platelet adhesiveness: A sample in vitro technique demonstrating an abnormality in von Willebrand's disease". J. Lab. Clin. Med. 62:724 (1963).

3. Williams, W. J. and et al
HEMATOLOGY
3a. edición
Ed. Mc Graw-Hill Book Co.
U.S.A. (1983).

PLASMA RECALCIFICADO

Objetivo:

1. Realizar la técnica de plasma recalcificado.
2. Evaluar las ventajas y limitaciones del método.

Generalidades: En esta prueba se involucra todo el proceso de la coagulación sanguínea, así mide todos los factores de la coagulación que son determinados en el tiempo de coagulación. Sin embargo, el error de esta prueba es menor que el de la determinación del tiempo de coagulación.(3)

Fundamento: En esta prueba, el calcio que fué quitado de la muestra de sangre por acción del anticoagulante, es reemplazada por la adición de la solución de cloruro de calcio, determinándose el tiempo de coagulación.(2)

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Solución de cloruro de calcio 0.0125 M
Solución de citrato de sodio al 3.8%

Material:

Tubos de ensaye de 13 X 100 mm
Tubos de ensaye de 10 X 75 mm (nuevos)
Pipetas serológicas de 0.2 ml
Pipetas Pasteur con bulbo.

Material biológico:

Sangre venosa

Equipo

Baño de incubación a 37°C
Cronómetro

METODOLOGIA

1o. Colectar en un tubo de ensaye de 13 X 100 mm la muestra de sangre del paciente, mezclando 9 partes de sangre venosa con una parte de solución de citrato de sodio al 3.8%.

2o. Centrifugar la sangre a 2,000 rpm durante 5 minutos.

3o. Transferir el plasma a un tubo de ensaye de 10 X 75 mm, limpio y colocarlo en baño incub. a 37°C.

4o. Adicionar a un tubo de ensaye de 10 X 75 mm 0.1 ml del plasma problema e incubarlo a 37°C

5o. Agregar 0.2 ml de solución de cloruro de calcio 0.0125 M y simultáneamente echar a andar el cronómetro.

6o. Agitar suavemente el tubo e incubar 60 segundos después de los cuales empezar a ver la formación de coágulo cada 15 segundos.

7o. La observación debe hacerse con mucha rapidez metiendo - y sacando el tubo del baño de agua.

8o. En el momento de la formación del coágulo apagar el cronómetro y anotar el tiempo.

9o. Efectuar la prueba por duplicado y correr un testigo usando solución salina en lugar de la solución de cloruro de calcio.

VALORES DE REFERENCIA

De 90 a 120 segundos.

BIBLIOGRAFIA

1. Caldwell. Am. J. M. Technol
23:277, (1957).

2. Miale, J. V.
LABORATORY MEDICINE HEMATOLOGY
4a. edición
Ed. C. V. Mosby CO.
St. Louis (1972).

3. Williams, W. J. and et al
HEMATOLOGY
3a. edición
Ed. Mc Graw-Hill Book Co.
U.S.A. (1983).

TIEMPO DE PROTROMBINA

Objetivo:

1. Realizar la técnica del tiempo de protrombina y deducir su fundamento.
2. Señalar las aplicaciones de la técnica sobre el fenómeno de coagulación.

Generalidades: La protrombina tiene un peso molecular aproximado de 75,000. En su molécula se han identificado 18 aminoácidos y hemisamina. El ácido glutámico, el aspártico y la arginina constituyen aproximadamente el 33 por ciento del nitrógeno proteínico. En la electroforesis, la protrombina se comporta como una globulina alfa-1. Se forma en el hígado y su producción requiere un suministro adecuado de vitamina K.

Algunas investigaciones recientes indican que la activación de la proenzima protrombina (factor II) por el factor Xa y los iones Ca^{++} supone el desdoblamiento de la protrombina en dos fracciones. Una de estas fracciones tiene un peso molecular de aproximadamente 37,000 y se llama intermediario 2. El factor Xa y los iones Ca^{++} transforman el intermediario 2 en trombina. Esta reacción se acelera en presencia de fosfolípidos y de factor V. (3)

En ausencia de vitamina K puede encontrarse en el plasma una molécula de protrombina inmunológicamente similar a la protrombina normal, pero cuya transformación en trombina es mucho más lenta que en condiciones normales. Hay pruebas en el sentido de que se requiere vitamina K para la unión con algún grupo prostético distinto de un carbohidrato y que contiene los focos de fijación destinados al Ca^{++} . (1)

La administración de medicamentos anticoagulantes puede producir iguales efectos que la deficiencia de vitamina K. Las enfermedades hepáticas graves también puede tener por consecuencia un tiempo de protrombina anormal. (1)

Fundamento: El tiempo de protrombina es el tiempo de coagulación obtenido cuando son adicionados tromboplastina comercial y calcio a un plasma citratado, bajo condiciones estandarizadas, esto actúa sobre la protrombina (factor II) activándola y transformándola en trombina. (2)

Esta prueba mide principalmente el estado de la segunda fase de la coagulación sanguínea.

El siguiente cuadro muestra las fases de coagulación, **DIAGRAMA 3**

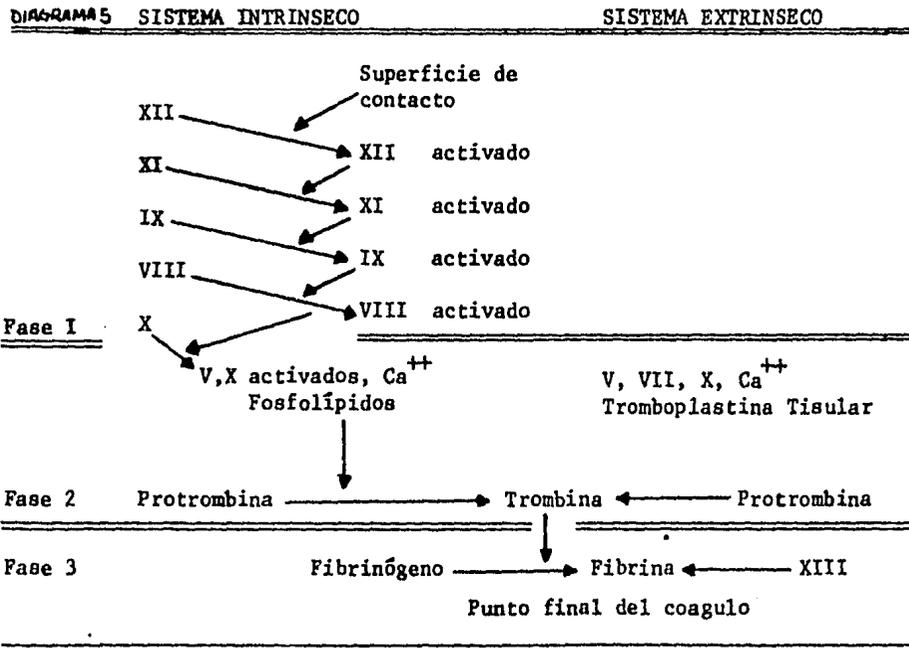
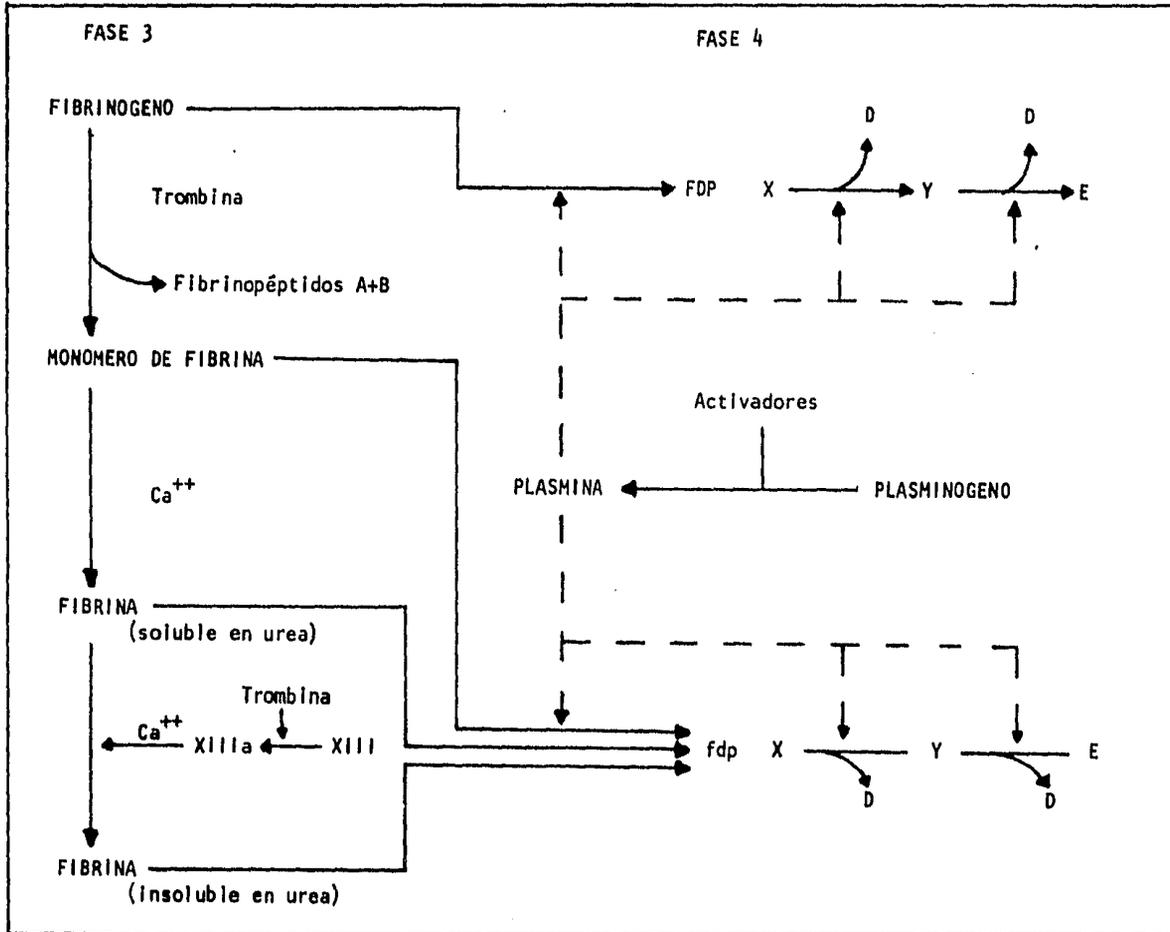


DIAGRAMA 3 FIBRINO (GENO) LISIS



TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Reactivo de Tromboplastina activada, comercial

Solución de cloruro de calcio 0.02 M

Solución de citrato de sodio al 3.8%

Material:

Tubos de ensaye de 13 X 100 mm

Tubos de ensaye de 10 X 75 mm

Pipetas serológicas de 1 ml

Pipetas Pasteur con bulbo

Material biológico:

Sangre venosa adicionada de citrato de sodio al 3.8%
(en una proporción de 9 partes de sangre y 1 parte de
citrato de sodio al 3.8%).

Equipo:

Baño de incubación a 37°C

Centrífuga

Cronómetro

METODOLOGIA

1o. Colectar en un tubo de ensaye de 13 X 100 mm la muestra de sangre venosa del paciente, mezclando 9 partes de sangre con 1 parte de citrato de sodio al 3.8%.

2o. Centrifugar la sangre a 2,000 rpm durante 5 minutos.

3o. Transferir el plasma a un tubo de ensaye de 10 X 75 mm. - limpio y colocarlo en baño maría a 37°C (o en el refrigerador si no va a ser analizado inmediatamente).

4o. Poner en un tubo de ensaye de 10 X 75 mm la cantidad de solución de Ca Cl_2 0.02 M suficiente para el número de pruebas a efectuar y colóquelo en baño maría a 37°C.

5o. En un tubo de ensaye de 10 X 75 mm poner 0.1 ml de la trombo plastina activada y mantenerlo en baño de incub. a 37°C

6o. Añadir al tubo anterior 0.1 ml de plasma del paciente manteniéndolo en baño de incub. a 37°C.

7o. Adicionar 0.1 ml de solución de Ca Cl_2 0.02 M a la mezcla - de plasma-tromboplastina, simultáneamente poner en marcha el cronómetro.

8o. Agitar suavemente el tubo y esperar de 5 a 6 segundos dentro del baño de incub. a 37°C.

9o. Sacar el tubo del baño e inclinarlo suavemente 1 ó 2 veces - hasta observar la aparición del primer filamento de fibrina, que es el punto final. Parar el cronómetro y anotar el tiempo.

VALORES DE REFERENCIA

Tiempo de Protrombina de 10 a 15 segundos.

BIBLIOGRAFIA

1. Biggs, R.
HUMAN BLOOD COAGULATION, HAEMOSTASIS
AND THROMBOSIS
Ed. Blackwell Scientific Pub.
Great Britain (1972).
2. Biggs, R. "Report on the standarizaci3n
of the one stage prothrombin time for the
control of anticoagulant therapy".
Diath. Haem. Supl. 17:303-327 (1965).
3. Gradwohl's, R.
CLINICAL LABORATORY METHODS AND DIAGNOSIS
7a. edici3n. Vol. I
Ed. C. V. Mosby Co.
U.S.A. (1970).
4. Loeliger, B.A. Meuwisse-Braun, J. B.
"Laboratory Control of oral anticoagulants.
Definition of therapeutic range in termes
of different thromboplastin preparations".
Tromb. Diath. Haem. 23, 3, 569 (1970).

TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL

Objetivo:

1. Analizar el mecanismo de acción de este factor dentro del fenómeno de la coagulación.
2. Familiarizarse con las precauciones que requiere esta técnica y todas las de coagulación.

Generalidades: En un estudio sobre el efecto del factor antihemofílico en las pruebas de coagulación de una fase, Longdell, Wagner y Brinkhous (1953) demostraron que había dos tipos de actividad trombo-plastínica. Confirmaron la observación de Mills de que los preparados de cefalina cruda no coagulan el plasma hemofílico tan pronto como el plasma normal. Cuando las tromboplastinas hísticas activas fueron diluídas o fraccionadas, tenían estos preparados una actividad semejante a la de la cefalina cruda. Basándose en estos hallazgos, los preparados de tromboplastina pueden describirse como completos o parciales. Las tromboplastinas completas son capaces de producir una coagulación tan rápida en el plasma hemofílico como en el normal, mientras que con la parcial el plasma hemofílico coagula menos rápidamente que el plasma normal. Esta diferencia parece ser una cuestión de grado más que de composición química, puesto que la simple dilución cambia una tromboplastina completa en una parcial. Si se entiende bien la diferencia entre la tromboplastina completa y la parcial, se entenderá mucho mejor el complejo mecanismo de la coagulación. (3)

Al parecer, las plaquetas son la fuente de tromboplastina durante la coagulación de la sangre total. Las suspensiones de plaquetas se comportan como tromboplastinas parciales cuando se emplean en las pruebas de coagulación de una fase. (1,4)

Fundamento: El tiempo de tromboplastina parcial mide la actividad intrínseca de la coagulación del plasma. El tiempo requerido para que el plasma recalcificado coagule después de la incubación con fosfolípidos plaquetario (cefalina) y un activador del factor de contacto (caolina) es una medida de intensidad con la cual se forma trombina a través de la vía intrínseca de la coagulación.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Tromboplastina parcial líquida activada, comercial.
Solución de cloruro de calcio 0.02 M
Solución de citrato de sodio al 3.8%

Material:

Tubos de ensaye de 13 X 100 mm
Tubos de ensaye de 10 X 75 mm
Pipetas serológicas de 1 ml
Pipetas Pasteur con bulbo
Gradilla para tubos

Material biológico:

Sangre venosa adicionada de citrato de sodio al 3.8%
(en una proporción de 9 partes de sangre y 1 parte de citrato de sodio).

Equipo:

Baño de incubación a 37°C
Centrífuga
Cronómetro

METODOLOGIA

1o. Colectar en un tubo de ensaye de 13 X 100 mm la muestra de sangre del paciente, mezclando 9 partes de sangre venosa con una parte de solución de citrato de sodio al 3.8%.

2o. Centrifugar la sangre a 2,000 rpm durante 5 minutos.

3o. Transferir el plasma a un tubo de ensaye de 10 X 75 mm. limpio y colocarlo en baño incub. a 37°C (o en el refrigerador si no va a ser analizado inmediatamente).

4o. Adicionar a un tubo de ensaye de 10 X 75 mm 0.1 ml de trombo plastina activada líquida e incubarlo a 37°C en baño maría durante 2 minutos.

5o. Transcurridos los 2 minutos agregar 0.1 ml del plasma del paciente, mezclar perfectamente e incubar a 37°C en baño maría por 2 minutos.

6o. A los 2 minutos agregar 0.1 ml de cloruro de calcio 0.02 M (que se encuentra en baño de agua a 37°C) y simultáneamente echar a andar el cronómetro. A los 20 segundos observar cuidadosamente el tubo, haciendo resbalar el contenido por la pared, hasta la aparición de los primeros hilos de fibrina. En este momento parar el cronómetro.

La observación debe hacerse con mucha rapidez metiendo y sacando el tubo del baño de agua.

VALORES DE REFERENCIA

Tiempo de tromboplastina parcial activada: de 10 a 45 segundos.

BIBLIOGRAFIA

1. Gurewich, V.
DISSEMINATED INTRAVASCULAR COAGULATION
Dade monograph
U.S.A. (1978).
2. Proctor, R. R. and Rapaport, S. I.
"The partial thromboplastin time with
Kaolin". Am. J. Clin. Path. 36:212-219
(1961).
3. Todd, C. J. and et al.
CLINICAL DIAGNOSIS AND MANAGEMENT
6a. edición
Ed. W. B. Saunders Co.
U.S.A. (1979).
4. Vollmer, K.
COAGULATION PROCEDURES
Dade monograph
U.S.A. (1976).

TIEMPO DE TROMBINA

Objetivo:

1. Realizar la técnica de tiempo de trombina, valorar sus limitaciones.
2. Evaluar la importancia de esta determinación a nivel clínico.

Generalidades: La trombina es la enzima activa que transforma - el fibrinógeno en fibrina. Esta globulina tiene un peso molecular - de aproximadamente 33,700 Daltons. Consta de dos cadenas de longitud desigual por un puente disulfuro. La cadena A de la trombina contiene 49 residuos de aminoácidos y no posee carbohidratos. La cadena B tiene 225 residuos y deriva de la terminal C de la protrombina y contiene el centro activo de la enzima (residuo de serina). (1)

La trombina es una enzima altamente específica para el fibrinógeno, actúa sobre él energicamente, transformándolo en fibrina, sin importar la temperatura ni si existe o no cloruro de calcio en el sistema; no se encuentra en la sangre circulante. (2) El tiempo de trombina se alarga cuando el fibrinógeno se encuentra disminuido o cuando existen agentes antitrombóticos, tales como la heparina o los productos de degradación, del sistema fibrinógeno-fibrina. (4)

Fundamento: La trombina es el coagulante natural del fibrinógeno. El tiempo de trombinamida mide la intensidad de conversión de fibrinógeno - en fibrina en el plasma en presencia de determinadas cantidades de - trombina.

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Trombina humana, comercial.
Solución de cloruro de sodio al 0.85%
Solución de citrato de sodio al 3.8%

Material:

Tubos de ensaye de 13 X 100 mm
Tubos de ensaye de 12 X 75 mm
Pipetas serológicas de 1 ml
Pipetas Pasteur con bulbo

Material Biológico:

Sangre venosa adicionada de citrato de sodio al 3.8%
(en una proporción de 9 partes de sangre y 1 parte -
de citrato de sodio).

Equipo:

Baño de incubación a 37°C
Centrífuga
Cronómetro

METODOLOGIA

10. Realizar los pasos 1, 2 y 3 de la técnica anterior.
20. Diluir una ampollita de trombina 1:10 con solución salina de tal manera que con un plasma normal nos de un tiempo de trombina de 18 a 23 segundos. Si al agregarle la solución ésta fué en exceso, entonces hay que añadir más trombina; y si por el contrario

no fue suficiente solución salina y por lo tanto los tiempos con cortos, entonces hay que agregar más solución salina.

3o. En un tubo de 10 X 75 mm poner 0.1 ml del reactivo de trombina diluida. Agregar 0.2 ml del plasma citratado y simultáneamente poner en marcha el cronómetro.

4o. Al momento de agregar el plasma, agitar el tubo suavemente y observar la aparición de fibrina.

5o. En este momento parar el cronómetro y se deja reposar el tubo por un minuto; al cabo del cual se observa la integridad del coágulo.

6o. Efectuar la prueba por duplicado.

VALORES DE REFERENCIA

Tiempo de trombina de 18 a 23 segundos

Coágulo firme a los 60 segundos.

BIBLIOGRAFIA

1. Biggs, R.
HUMAN BLOOD COAGULATION, HAEMOSTASIS AND
THROMBOSIS
Ed. Blackwell Scientific Pub.
Great Britain (1972).
2. Henry, B., Soloway, B. M. Cornet,
Donahoo S. P. "Differentiation of bleeding
diathesis which occur following protamina
correction of heparin anticoagulation"
Am. Clin. Path. 60:2, 188-191 (1973).

3. Tocantis, L., Kazal, L.

COAGULACION DE LA SANGRE, HEMORRAGIA
Y TROMBOSIS

Ed. Científico-Médico
México (1972).

4. Wintrobe, M.M.

CLINICAL HEMATOLOGY

7a. edición

Ed. Lea and Febiger
Philadelphia (1974).

FIBRINOGENO

Objetivo:

1. Analizar la importancia de este factor dentro del mecanismo de la coagulación.
2. Establecer la importancia clínica de esta determinación, así como sus limitaciones.

Generalidades: El fibrinógeno es una proteína del plasma con un peso molecular de alrededor de 340,000. Pertenecce a las proteínas fibrosas, es producida por el hígado y en enfermedades hepáticas graves puede disminuir ligeramente su concentración en el plasma. El fibrinógeno es menos soluble que la mayoría de las otras proteínas plasmáticas. En todos los fibrinógenos estudiados hay un residuo de tirosina. (1)

El fibrinógeno se transforma en fibrina mediante la acción de la trombina. Según Laki (1965), la trombina se escinde en cuatro enlaces peptídicos a partir de cada molécula de fibrinógeno y se liberan cuatro péptidos, que son de dos tipos, el fibrinopéptido A y el fibrinopéptido B. Parece ser que la presencia de estos péptidos en la molécula de fibrinógeno inhibe la polimerización porque actúan como fuerzas que se repelen. Después de la suelta de los cuatro péptidos, la agregación de las moléculas de fibrina tiene lugar espontáneamente. (2,3)

Fundamento: En esta técnica se efectúa una medición de la tasa de conversión del fibrinógeno bajo la influencia de un exceso de trombina. Como el fibrinógeno está autolimitado bajo estas condiciones, el tiempo de coagulación puede utilizarse como una medida de la concentración de fibrinógeno. (4)

REACTIVOS Y MATERIAL**Reactivos:**

Reactivo de Trombina, comercial
Reactivo de referencia de fibrinógeno
Sol. amortiguadora de Veronal de Owren pH 7.35
Solución de citrato de sodio al 3.8%

Material:

Tubos de ensaye de 13X100 mm
Pipetas serológicas de 1 ml

Material biológico:

4.5 ml de sangre venosa con 0.5 ml de solución
de citrato de sodio al 3.8%

Equipo:

Fibrómetro
Fibrotups
Fibrotips
Pipeta automática
Baño de incubación a 37°C
Centrífuga

METODOLOGIA

1. Mezclar nueve partes de sangre del paciente (coleccionada recientemente) con una parte de solución de citrato de sodio al 3.8%.
2. Mezclar y centrifugar inmediatamente por 5 minutos a 3,000 rpm. Separar el plasma y colocarlo en un tubo de ensaye de 13X100 mm.
3. Hacer una dilución 1:10 del plasma citratado con el buffer de veronal de Owren.

4. Incubar 0.2 ml de la dilución anterior a 37°C durante 2 minutos. Realizar la prueba por duplicado.

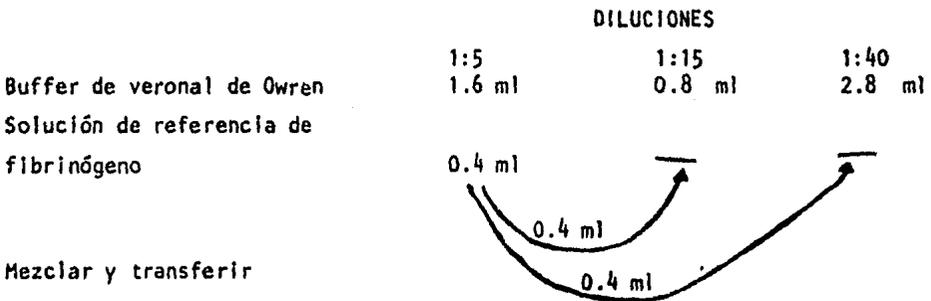
5. Adicionar 0.1 ml del reactivo de trombina al mismo tiempo en que se pone en marcha el cronómetro.

6. Determinar el tiempo de coagulación. Sacar la media de los valores obtenidos e interpolarlos en la curva de calibración para obtener el valor del fibrinógeno en mg/dl.

CURVA DE CALIBRACION

7. Reconstituir el reactivo de referencia de fibrinógeno con 1.0 ml de agua destilada. Mezclar perfectamente. Hacer lo mismo con el reactivo de trombina.

8. Preparar las siguientes diluciones con la solución de referencia de fibrinógeno, 1:5, 1:15, 1:40 siguiendo las indicaciones posteriores.



9. Correr por duplicado la determinación de cada dilución. Incubar 0.2 ml de cada dilución a 37°C por 2 minutos. Adicionar 0.1 ml del reactivo de trombina.

10. Determinar el tiempo de coagulación.

11. Promediar los tiempos de coagulación obtenidos para cada dilución y trazar la curva de calibración.

VALORES DE REFERENCIA

150 - 450 mg/dl

BIBLIOGRAFIA

1. Dacie, J. V., Lewis, S. M.
PRACTICAL HAEMATOLOGY
5a. edición
Ed. Churchill Livingstone
London (1975).
2. Kennedy, J.
FIBRINOGEN, FIBRIN AND FIBRINOLYSIS
Dade monograph
U.S.A. (1974).
3. Vollmer, K.
COAGULATION PROCEDURES
Dade monograph
U.S.A. (1976).
4. Willoughby, M. L. M.
"A puerperal haemorrhagic state due
to a heparin like anticoagulant".
J. Clin. Path. 16:108 (1963).

GENERACION DE TROMBOPLASTINA

Objetivo:

1. Describir la importancia de fraccionar la sangre en la prueba de generación de Tromboplastina.
2. Señalar la aplicación clínica de esta determinación, así como las ventajas de la técnica y limitaciones.

Generalidades: Esta prueba estudia las diferentes fracciones - que intervienen en la generación de la tromboplastina. Para ello - se fracciona la sangre en 3 partes: plaquetas, plasma y suero, cada una de ellas contiene diferentes fracciones. En caso de que el resultado sea normal es posible sustituir consecutivamente cada una de las fracciones por reactivos normales o de enfermos con deficiencias conocidas y determinar de esa manera en que fracción está la anomalía y cual es el factor deficiente. (2)

Al fraccionar la sangre como a continuación se menciona, tenemos que en el suero se encuentran los factores XII y XI (o más correctamente "productos de activación") y los factores IX y X. El plasma - adsorto contiene los factores VIII y V. (1,2)

Esta prueba es importante en la diagnosis de la hemofilia y la deficiencia del factor Christmas.

Fundamento: La tromboplastina se genera incubando las tres fracciones antes dichas en presencia de cloruro de calcio. Su potencia - se mide tomando alícuotas seriadas y virtiéndolas sobre un substrato (plasma normal) anotando el tiempo en que tarda en coagular éste.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Solución de cloruro de calcio al 0.02 M
Solución de citrato de sodio al 3.8%
Solución de cloruro de sodio al 0.85%
Solución de oxalato de sodio 0.1 M
Sulfato de bario en polvo

Material:

Tubos de ensaye de 13 X 100 mm
Pipetas serológicas de 1 ml
Pipetas Pasteur con bulbo
Tubos de hemólisis
Aplicadores de madera
Perlitas de vidrio

Material biológico:

Sangre venosa

Equipo:

Baño de incubación a 37°C
Centrífuga
Cronómetro

METODOLOGIA

Para efectuar esta prueba se fracciona la sangre en 3 partes: plaquetas, plasma y suero, ya que cada una contiene diferentes factores.

Preparación de las diferentes fracciones.

PLAQUETAS:

Todo el material que intervenga en la preparación de esta fracción debe ser siliconizado.

1o. Obtener 9 ml de la muestra de sangre venosa por medio, ya sea de una jeringa siliconizada o bien, dejar fluír la sangre a través de la aguja directamente a un tubo de ensaye de 13 X 100 mm. Se mezcla por inversión del tubo.

2o. Centrifugar el tubo a 1,000 rpm durante 10 minutos. Separar el plasma teniendo cuidado en medir la cantidad exacta de éste.

3o. El plasma que se separó se centrifuga nuevamente, esta vez a 3,000 rpm durante 15 minutos y se separa el plasma sobrenadante en un tubo que se marca como sustrato (que es plasma normal pobre en plaquetas) Se guarda en el refrigerador y se saca hasta el momento en que se va a usar.

4o. Las plaquetas quedaron en el fondo del tubo y tienen que ser lavadas 3 veces con solución salina isotónica, centrifugando a 3,000 rpm en cada ocasión. Es conveniente romper las agrupaciones de plaquetas con un aplicador de madera a fin de que se laven bien.

5o. Se resuspenden las plaquetas en un volumen de solución salina isotónica igual a 1/3 del volumen original del plasma.

SUERO:

1o. Poner 3 ml de la muestra de sangre en un tubo de hemólisis que tenga en el fondo 3 perlitas de vidrio y se deja coagular.

2o. Incubar durante 2 horas a 37°C.

3o. Centrifugar el tubo a 3,000 rpm durante 5 minutos.

4o. Separar el suero con una pipeta Pasteur y diluir éste 1:10 con solución salina isotónica.

PLASMA:

Se mezclan 4.5 ml de sangre venosa y 0.5 ml de oxalato de sodio 0.1 M. Separar el plasma centrifugando a 1,000 rpm por 10 minutos y se procede a su adsorción según el siguiente procedimiento:

1o. Mezclar el plasma con BaSO_4 en la proporción 100 mg de éste por cada ml de plasma.

2o. Incubar a 37°C en baño incub. durante 15 minutos mezclando cada 5 minutos por lo menos, con agitación suave.

3o. Centrifugar el tubo a 3,000 rpm por 15 minutos.

4o. Separar el plasma con una pipeta Pasteur. Guardarlo en refrigeración. En el momento de usarse se diluye 1:5 con solución salina isotónica.

PRUEBA DE LA GENERACION DE TROMBOPLASTINA

1o. Poner un tubo de ensaye de 13 X 100 mm en baño maría a 37°C y adicionarle: 0.3 ml de plaquetas, 0.3 ml de plasma adsorto diluido, 0.3 ml de suero diluido y 1.5 ml de solución de cloruro de calcio 0.02 M. Al adicionar este último reactivo se echa a andar simultáneamente el cronómetro. Mezclar. (Mezcla incubadora).

2o. A los 4 minutos tomar 0.2 ml de la mezcla y pasarlas rápidamente a un tubo que contiene 0.1 ml del substrato (dicho tubo debe haber estado en baño incub. por lo menos 1 minuto antes). Mezclar por 2 ó 3 segundos.

3o. Medir el tiempo que tarde un coagulador el substrato a partir del momento en que se le añadió la alícuota de la mezcla incubadora.

4o. Los pasos 2 y 3 repetirlos cada minuto hasta el séptimo minuto.

Nota:

La prueba puede suspenderse en el momento en que el problema de un tiempo de coagulación igual al normal. A los 4 minutos el tiempo de coagulación debe ser alrededor de 10 a 12 segundos. Si los resultados son anormales, se procede a hacer nuevas muestras incubadoras sustituyendo cada una de las fracciones hasta obtener una generación de tromboplastina normal.

Deberá correrse un testigo a partir de reactivos obtenidos de una persona normal.

BIBLIOGRAFIA

1. Biggs, R., and Douglas, A.S.
"The thromboplastin generation test".
Journal of Clinical Pathology, 6, 23
(1953).
2. Bosch, N. B., Curiel, D.
TECNICAS DE HEMOSTASIA Y TROMBOSIS
Grupo CLAHT
Buenos Aires (1975).
3. Newlands, M. J. and Wild, F.
"Sources of platelet factor for
the thromboplastin generation test."
Nature (London), 176, 885 (1955).

Objetivo:

1. Realizar las técnicas gel de etanol, sulfato de protamina y lisis de euglobulinas.
2. Señalar las aplicaciones clínicas de las técnicas gel de etanol, sulfato de protamina y lisis de euglobulinas.

Generalidades: El sistema fibrinolítico sirve para suprimir la fibrina superflua después de que se ha completado la reparación de un vaso, y para proteger el cuerpo de una formación excesiva de fibrina. La plasmina es la enzima a la cual corresponde la digestión de la fibrina. El sistema implica la activación de activadores hísticos de una proenzima plasmática, el plasminógeno, que forma plasmina, una proteasa específica que digiere los polímeros de fibrina estabilizada.

El plasminógeno es una proteína (beta globulina) con un peso molecular de aproximadamente 90,000. Puede encontrarse en tejidos, fluidos del cuerpo especialmente el plasma.

Productos relacionados con el fibrinógeno y la fibrina están presentes generalmente durante los procesos tromboembólicos, tales como la coagulación intravascular generalizada. Existen dos estados que se presentan durante los episodios trombóticos originando diferentes variantes en la molécula del fibrinógeno. Durante el episodio trombótico está presente el monómero de fibrina. Cuando se convierte en fibrina polímera, ello es la materia de fibrina insoluble, que estamos acostumbrados a ver como punto final de reacción en las pruebas de coagulación. En un episodio trombótico existe el monómero de fibrina que se convierte en polímero. Al mismo tiempo, el mecanismo de defensa del organismo "ataca" a la fibrina polimerizada que está cubriendo la pared del vaso e intenta lisarlo (disolver). La fibrina lisa da forma productos de desintegración o degradación. Dependiendo de la extensión de la lisis, estos pueden ser fragmentos de gran peso molecular -- (X e Y) o si se produce mayor lisis, fragmentos de pequeño peso molecular -- (E y D). (4)

Algunas pruebas son sensibles a los monómeros de fibrina; algunos a los productos X e Y, de gran peso molecular; y otros a los productos D y E, de - pequeño peso molecular. Pruebas como la del gel de etanol y la del sulfato - de protamina, son principalmente sensibles a los monómeros de fibrina. (1,2)

PRUEBA GEL DE ETANOL

Fundamento: El alcohol en concentraciones adecuadas causa la ruptura o la disociación de los complejos solubles que los monómeros de fibrina - han formado con el fibrinógeno y los productos afines de desintegración.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Solución de alcohol etílico al 50% (96% en agua destilada).

Material:

Tubos de ensaye de 10X75 mm
Pipetas serológicas de 0.2 ml

Material biológico:

Plasma pobre en plaquetas

Equipo:

Baño de incubación a 37°C

METODOLOGIA

1. En un tubo de ensaye de 10 X 75 mm depositar 0.5 ml de plasma pobre en plaquetas.
2. Incubar el tubo en baño incub. a 20°C durante 3 minutos (a fin de obtener un equilibrio de la temperatura).

3. Se añaden 0.15 ml de una solución de etanol al 50% con una pipeta de 0.2 ml. Agitar el tubo inmediatamente a fin de asegurar una mezcla rápida y suficiente y se deja reposar en incubación

4. Exactamente 10 minutos después se inclina el tubo hasta posición horizontal y se inclina el contenido.

5. Los resultados se valoran de la siguiente forma:

- a) Los plasmas que presenten un gel son considerados positivos.
- b) Los plasmas que presenten mallas de fibrina son dudosos.
- c) Los plasmas que presenten gránulos escasos o totalmente claros son considerados negativos.

VALORES DE REFERENCIA

No debe aparecer gel.

LISIS DE EUGLOBULINAS

Fundamento: En la fracción euglobulina del plasma se encuentra el fibrinógeno, plasminógeno y fibrinolisin. Las fibrinolisin de glóbulos rojos destruidos, aceleran la lisis pero se encuentra en cantidad muy constante en cambio existe más variaciones en la fibrinolisin plasmática.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Solución de cloruro de calcio 0.05 M

Solución de ácido acético al 1%

Solución amortiguadora de veronal (Owren_Koller) pH 7.4

Material:

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm

Matraces erlenmeyer de 50 ml

Pipetas serológicas de 1 ml

Pipetas serológicas de 5 ml

Pipetas serológicas de 10 ml

Hisopos

Material biológico:

4.5 ml de sangre venosa más 0.5 ml de citrato de sodio al 3.8 %

Plasma pobre en plaquetas

METODOLOGIA

1. Colocar en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, 19 ml de agua destilada, 1 ml de plasma pobre en plaquetas (del paciente), 0.35 ml de solución de ácido acético al 1%, gota a gota y agitando.

2. Dejar reposar 10 minutos a 4°C

3. Después del reposo agitar el contenido del matraz y repartirlo en 4 tubos de 13 X 100 mm en parte iguales, (5 ml cada uno).

4. Centrifugar los tubos a 3,500 rpm durante 5 minutos.

5. Tirar el sobrante y secar el precipitado cuidadosamente empleando para ello hisopos.

6. Redisolver el precipitado con 1.0 ml de buffer de veronal a pH 7.4 y colocarlo en baño incub. a 37°C. Agregar 2 gotas de cloruro de calcio 0.05 M para coagular. (El tiempo que tarde en coagular debe ser 1 minuto 45 segundos a 2 minutos).

7. Buscar la lisis del coágulo en las 2 primeras horas interpretando el resultado como sigue:

- + Coágulo presente y poco líquido
- + + Coágulo sobrenadando
- + + + Pocas redes de fibrina
- + + + + Coágulo totalmente disuelto.

VALORES DE REFERENCIA

El coágulo debe mantenerse firme por lo menos durante dos horas.

PRUEBA DE SULFATO DE PROTAMINA

Fundamento: El sulfato de protamina en concentraciones adecuadas causa la ruptura de los complejos solubles de monómeros de fibrina y/o de los complejos solubles de fragmentos X (PDF).

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Solución de sulfato de protamina pH 6.5

Solución amortiguadora tris pH 6.5

Material:

Tubos de ensaye de 10 X 75 mm

Pipetas serológicas de 1 ml

Material biológico:

Plasma rico en plaquetas

Equipo:

Baño de incubación a 37°C

METODOLOGIA

1. Efectuar diluciones del sulfato de protamina con amortiguador tris 1:5, 1:10, 1:20, 1:40.

2. Colocar en tubos de ensaye de 10 X 75 mm, 0.2 ml de cada una de las diluciones anteriores.

3. El plasma rico en plaquetas del problema se centrifuga a obtener plasma pobre en plaquetas, se coloca en un tubo limpio y se incuban 5 minutos a 37°C.

4. Transcurrido este tiempo, colocar 0.2 ml de este plasma en cada uno de los tubos que contienen las diluciones de sulfato de protamina.

5. Se tapan los tubos y se colocan a 37°C durante 30 minutos.

6. Se agitan suavemente los tubos, después de la incubación y se leen interpretando los resultados como sigue:

- g = gelación
- rf = red de fibrina
- + = precipitado fino
- + = precipitado grueso
- = solución clara

VALORES DE REFERENCIA

Solución clara.

BIBLIOGRAFIA

1. Bergna, L.J.
TECNICA DE HEMOSTASIA Y TROMBOSIS
Grupo CLAHT
Buenos Aires (1975).
2. Niewiarowski, S., Gurewich, V.
"Laboratory identification of intravascular
coagulation: the serial dilution protamine
sulfato test for the detection of fibrin
monomer and fibrin degradation products".
J. Lab. Clin. Med. 77:665 (1971).
3. Thomas, D.P., Niewirowski, S., Myers, A. R.,
Bloch, K. J. "A comparative study of four
methods for detecting fibrinogen degradation
products in patients with various diseases".
New England Journal of Medicine, 283, 663
(1970).
4. Vollmer, K.
COAGULATION PROCEDURES
Dade monograph
U.S.A. (1976).

FACTOR V

Objetivo:

1. Analizar la importancia clínica de la deficiencia del factor V.
2. Explicar las posibles causas que ocasionan esta deficiencia.

Generalidades: El Factor V tiene un peso molecular de aproximadamente 290,000. Electroforéticamente emigra entre las globulinas B y gamma en papel filtro. Posiblemente se produce en el hígado. (1)

Como el Factor X, el Factor V actúa como cofactor, junto con fosfolípido y Ca^{++} para formar el principio activo que convierte la protrombina. El Factor V aislado no puede activar una cantidad importante de protrombina. Como el Factor V es esencial para la primera fase de la coagulación sanguínea, su deficiencia origina producción inadecuada de la actividad tromboplastínica. (3)

El Factor V, también llamado "Factor lábil" es consumido durante el proceso de coagulación, por lo que está presente en plasma citratado fresco, pero no en suero o plasma envejecido. No es afectada por la administración de dicumarol o vitamina K pero es disminuido en enfermedad del hígado. (2)

La deficiencia del Factor V puede ser congénita o adquirida. La primera es transmitida por un gen recesivo autosómico. La deficiencia adquirida puede ocurrir cuando se presenten enfermedades del hígado de (hepatitis, etc.), en síndrome de desfibrinación, en carcinoma de la próstata, en síndrome de mal absorción, etc. (2)

Cuando la concentración del Factor V sea inferior al 30% de la concentración normal, se presentarán hemorragias anormales.

Fundamento: La valoración cuantitativa del Factor V está basada en la capacidad del plasma en cuestión para corregir un plasma deficiente en Factor V. Debe prepararse una curva de actividades del plasma normal. Al preparar esta curva, el plasma normal diluido al 10% se considera en este sistema de ensayo como del 100% en actividad de Factor V.

TECNICA

MATERIAL Y REACTIVOS

Reactivos:

Tromboplastina activada, comercial
 Solución de cloruro de calcio 0.02 M
 Solución amortiguadora de Owren Veronal pH 7.35
 Solución de citrato de sodio al 3.8%
 Plasma deficiente en el Factor V.

Material:

Tubos de ensayo de 13X100 mm
 Tubos de ensayo de 10X75 mm
 Pipetas serológicas de 0.2 ml
 Pipetas serológicas de 1 ml
 Pipetas Pasteur con bulbo

Material Biológico:

Sangre venosa citratada
 Plasma normal: un pool de plasma normal citratado, fresco

Equipo:

Baño de incubación a 37°C
 Cronómetro
 Centrífuga

PROCEDIMIENTO

1. Colección del Plasma problema

1o. Mezclar 9 partes de la muestra de sangre con una parte de la solución de citrato de sodio al 3.8%.

2. Mezclar perfectamente y centrifugar a 3,000 rpm durante 5 minutos.

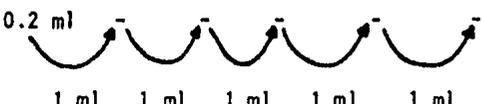
3. Utilizando una pipeta Pasteur separar el plasma y sino se usa en las dos horas siguientes de obtenerlo, guardarlo en el refrigerador.

II. Curva

1. Preparar un pool de plasma normal citratado colectado recientemente y usarlo como plasma normal.

2. Rotular 6 tubos de ensaye de 13X100 mm del número 1 al 6 y hacer una serie de diluciones como se indica a continuación.

Tubos	1	2	3	4	5	6
Sol. amortiguadora de Owren Veronal	1.8 ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Plasma normal	0.2 ml					
Mezclar y Transferir		1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Dilución	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
% de factor V presente	100	50	25	12.5	6.25	3.12



3. Poner el reactivo de tromboplastina y la solución de cloruro de calcio 0.02 M en baño incub.a 37°C. Preparar una mezcla de estos dos reactivos en una preparación de 0.75 ml cada uno y dejarla incubando.

4. En un tubo de ensaye de 13X100 mm adicionar 0.1 ml del plasma deficiente en el factor V, 0.1 ml de la dilución 1:10 del plasma normal. - Mezclar e incubar a 37°C por uno o dos minutos.

5. Al tubo anterior adicionarle 0.2 ml de la mezcla cloruro de calcio tromboplastina pre incubada y poner en marcha el cronómetro simultáneamente, volver a poner el tubo en el baño a 37°C por 10 segundos aproximadamente. El coágulo se forma en 18 - 25 segundos en plasma normal.

6. Repetir los pasos 4 y 5 para cada dilución del plasma normal. Es recomendable procesar por duplicado cada dilución. Los resultados no deben tener una diferencia mayor al 5%.

7. Graficar los resultados en papel logarítmico, poniendo el % de dilución en las abscisas y el tiempo en segundos en las ordenadas. Enlazar - los puntos en línea recta.

8. Con la muestra de sangre del paciente obtener el plasma y hacer una dilución 1:10 con solución amortiguadora de Owren Veronal. Procesarla - como las diluciones anteriores del pool de plasma normal citratado.

9. El resultado del problema se interpola en la gráfica para obtener el % de factor V presente.

BIBLIOGRAFIA

1. Dacie, J.V., Lewis, S. M.
PRACTICAL HAEMATOLOGY
5a. edición
Ed. Churchill Livingstone
London (1975).

2. Mammen, E. F. "Factor V deficiency"
Semin. Thromb. Hemost. 9:17 (1983)

3. Miale, J.V.
LABORATORY MEDICINE HEMATOLOGY
4a. edición
Ed. C. V. Mosby Co.
St. Louis (1972)

4. Ozoylu, S. "Combined congenital deficiency
of factor V and factor VIII. "
Acta Haematol. 70:207 (1983)

5. Vollmer, K.
COAGULATION PROCEDURES
Dade monograph
U.S.A. (1976)

INVESTIGACION DE INHIBIDORES E INACTIVADORES: UTILIZANDO
EL TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADO.

Objetivo:

1. Aplicar la técnica de tiempo de tromboplastina parcial activada para demostrar la acción de inhibidores de la coagulación en una muestra problema.
2. Describir ventajas y limitaciones del método.

Generalidades: En la sangre normal existen inhibidores que al aumentar o disminuir producen ciertas patologías. Los inhibidores son agrupados en dos clases: inactivadores e inhibidores que actúan a nivel de reacciones - entre factores de la coagulación. (1)

Por desconocer realmente la acción de ellos todos se agrupan bajo el - término de Inhibidores y se dividen en:

- 1) Anticoagulantes
- 2) Inhibidores naturales contra factores activados
- 3) Inhibidores irreversibles que destruyen a factores de la coagulación en su estado natural
- 4) Inhibidores reversibles que aparecen en - enfermedades autoinmunes.

Regularmente se desarrollan inhibidores en: disproteinemias, mieloma, - artritis reumatoide, nefritis, lupus eritematoso diseminado agudo, coagulopatías por consumo con aumento de la actividad fibrinolítica, etc.

Se han descrito inhibidores contra los factores VIII, IX y X y con menor frecuencia V, VII, XI, XIII. (1,2)

Si existe alguna alteración en las pruebas siguientes TP, TTP, TT y la falta de corrección de las mismas, con mezcla de plasma normal en partes iguales con la del paciente pone en evidencia la presencia de un inhibidor.

Fundamento: Se demuestra la presencia de inhibidores de la coagulación realizando la prueba de tiempo de tromboplastina parcial activada y obteniendo tiempos prolongados en plasma normal cuando se le añaden cantidades variables de plasma del paciente.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

- Solución de citrato de sodio al 3.8%
- Solución de cloruro de calcio 0.02
- Tromboplastina parcial activada líquida, comercial.

Material:

- Tubos de ensaye de 13X100 mm
- Tubos de ensaye de 10X75 mm
- Tubos de centrifuga graduados
- Pipetas serológicas de 0.1 ml
- Pipetas serológicas de 1.0 ml
- Pipetas Pasterur con bulbo
- Gradillas para tubos

Material Biológico:

- Sangre venosa adicionada de sol. de citrato de sodio al 3.8%
(en una proporción de 9 partes de sangre y 1 parte de citrato de sodio)

Equipo:

- Baño de incubación a 37°C
- Centrifuga clínica
- Cronómetro

METODOLOGIA

1. Colectar en un tubo de centrifuga graduada la muestra de sangre del paciente, mezclando 9 partes de sangre con 1 parte de citrato de sodio al 3,8%.

2. Centrifugar la sangre a 2,000 rpm durante 5 minutos.

3. Transferir el plasma a un tubo de ensaye de 10X75 mm limpio y colocarlo en baño de agua a 37°C.

4. Preparar un pool de plasma normal citratado, colectado recientemente y usarlo como plasma normal.

5. Numerar 5 tubos de ensaye de 10X75 mm (numerándolos del 1 al 5) y procesar como sigue:

TUBO	I	II	III	IV	V
Plasma Problema	0.0	0.1 ml	0.2 ml	0.5 ml	1.0 ml
Plasma normal	1.0 ml	0.9 ml	0.8 ml	0.5 ml	0.0

6. Realizar un tiempo de tromboplastina parcial para cada tubo.

7. Si hay corrección de los tiempos de tromboplastina parcial desde el segundo tubo, quiere decir que hay deficiencia de algún factor de la primera fase de la coagulación y tenemos que seguir realizando los TTP a los siguientes tubos para ver que tan importante es.

8. En caso de no prolongarlos TTP se interpretará como presencia de un inhibidor y habrá que ver si éste es termolábil o no, incubando las mezclas a 37°C durante 1 hora y realizando posteriormente los TTP para cada tubo.

NOTA: Para saber si hay un inhibidor contra la segunda fase de la coagulación, se hace lo mismo, solo que realizando TP.

BIBLIOGRAFIA

1. Dacie, J.V., Lewis, S. M.
PRACTICAL HAEMATOLOGY
5a. edición
Ed. Churchill Livingstone
London (1975).
2. Pavlosky, M.
TECNICAS DE HEMOSTASIA Y TROMBOSIS
Gpo. Cooperativo Latino-Americano
de Hemostasia (CLAHT)
Buenos Aires (1975).
3. Robinson, J.A., Aggeler, P., Mc
Nicol, G. and Douglas, A.S. Brit
J. Haemat., 13:510 (1967).
4. Vila, B.M., Ordi, R.J., Villardel,
T.M. "Presencia simultánea de In-
hibidores de los factores V y VII o
anticoagulantes antiprotrombinasa"
Med. Clin. (Barc.) 81:368 (1983).

C A P I T U L O V

I N V E S T I G A C I O N D E L A

C O M P A T I B I L I D A D

S A N G U I N E A

DETERMINACION DE LOS GRUPOS DEL SISTEMA ABO

Objetivo:

1. Realizar las técnicas de tipificación de los grupos sanguíneos.
2. Establecer la importancia de la tipificación de los grupos sanguíneos.

Generalidades: Actualmente las transfusiones sanguíneas se basan en los resultados que obtuvo Landstainer de los estudios siguientes: colectó varias muestras de sangre de diferentes individuos, separó los eritrocitos del suero de cada muestra y mezcló globulos rojos de una persona con suero de otra.(1) En algunos casos la mezcla de eritrocitos con suero formaba una suspensión uniforme; en otros, los eritrocitos-suero formaban grumos (aglutinación) y en otros pocos se presentaban hemólisis. En este último caso se inactivó el complemento del suero calentando a 56°C evitándose así la hemólisis y apreciándose la aglutinación. Con lo anterior, Landstainer explicó los diversos resultados postulando la existencia de dos características que estaban presentes o ausentes en las células de un individuo (aglutinógenos A y B) así como la existencia de dos anticuerpos correspondientes (anti A y anti B; isohemaglutininas) en el suero, que podían estar presentes o ausentes. De acuerdo a todo esto tenemos que las isohemaglutininas anti-A aglutinan o hemolizan eritrocitos que contienen el aglutinógeno A y similarmente la isohemaglutinina anti-B aglutina o hemoliza eritrocitos que contienen el aglutinógeno B. (3)

Se demostró la existencia de varios subgrupos de A. Los más importantes son los subgrupos A1 y A2. Por lo tanto existen subgrupos A1, A2, A1B y A2B. Los sueros anti-A aglutinan más intensamente los eritrocitos del subgrupo A1 que los del A2. Por lo tanto, quizá pasen inadvertidos en el momento de establecer el tipo sanguíneo del paciente, los glóbulos rojos con antígeno A2, salvo si se utiliza un suero anti-A capaz de reaccionar intensamente con glóbulos A2.(4)

GRUPOS SANGUINEOS A B O

NOMBRE GRUPO SANGUINEO	ANTIGENOS SOBRE EL GLO- BULO ROJO (AGLUTINOGENOS)	ANTICUERPOS EN EL SUE- RO (AGLUTININAS)
O	ninguno	anti-A y anti-B
A	A	anti-B
B	B	anti-A
AB	A y B	ninguno

La determinación del grupo sanguíneo a que pertenece el sujeto está indicada, ante la inminencia de una transfusión sanguínea, para evitar accidentes inmediatos, además se usa corrientemente en los análisis genéticos, en los casos de exclusión de paternidad y en los análisis antropológicos de las poblaciones humanas. (2)

El grupo sanguíneo de una persona es el mismo durante toda la vida pero las aglutininas no existen en el momento del nacimiento, sino que aparecen entre los 3 y los 5 meses de edad. (4)

La tipificación sanguínea se efectúa mediante las reacciones de aglutinación. Existen en el comercio sueros tipificantes perfectamente estandarizados tanto anti-A como anti-B, siempre es muy recomendable utilizar al realizar la prueba, también el suero anti-AB, especialmente para detectar las variantes débiles de los grupos A y B, las cuales pasarían desapercibidas sin el empleo de este suero, así mismo nos sirve para identificar plenamente al grupo 0.

Fundamento: Los antígenos A y B presentes en los eritrocitos reaccionan específicamente con los anticuerpos presentes en el suero tipificante y - esta reacción se pone de manifiesto por la aglutinación de los eritrocitos.

TECNICA

METODO EN PLACA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Solución de EDTA al 10% (sol. disódica)
 Solución de cloruro de sodio al 0.85%
 Sueros comerciales anti-A, anti-B, anti-AB

Material:

Tubos de ensayo de 13X100 mm
 Pipeta Pasteur con bulbo
 Placas excavadas limpias y desengrasadas
 Aplicadores de Plástico
 Gradillas para tubos

Material Biológico

Sangre venosa con anticoagulante o sangre capilar.

METODOLOGIA

1. La muestra de la sangre puede tomarse por punción de la yema de un dedo o bien del lóbulo de la oreja, pero es más conveniente emplear sangre venosa tomada con un anticoagulante porque de esta manera en caso de duda se pueden checar los resultados fácilmente.

2. En una placa excavada seca y limpia, marcar tres excavaciones y colocar una gota de suero anti-A, anti-B y anti-AB respectivamente.

3. Añadir una gota de sangre en cada una de las gotas de suero (procurando que sea el mismo volumen que la gota de los sueros anti).

Si se trabaja con sangre venosa se debe preparar una suspensión de eritrocitos al 5% (previamente lavados) en solución salina fisiológica. Con cualquiera estas dos técnicas la concentración final de glóbulos rojos en la mezcla debe ser de aproximadamente el 2%. Si se pone un exceso de eritrocitos los resultados pueden falsearse.

4. Mezclar perfectamente empleando para ello los aplicadores de plástico, girar la placa y observar la aglutinación macroscópicamente. No debe colocarse la placa sobre una fuente luminosa porque al calentamiento puede dispersar o debilitar la aglutinación.

5. La reacción de aglutinación se presentará en unos cuantos segundos. Las lecturas deberán hacerse antes de que se seque la muestra (aproximadamente 2 minutos).

METODO EN TUBO**TECNICA****REACTIVOS Y MATERIAL****Reactivos:**

Solución de EDTA al 10% (sol. disódica)
Solución de cloruro de sodio al 0.85%
Sueros comerciales anti-A, anti-B, anti-AB

Material:

Tubos de ensaye de 12X75 mm
Tubos para centrífuga de 10 ml
Pipeta Pasteur con bulbo
Gradilla para tubos

Material biológico:

Sangre venosa con anticoagulante

Equipo:

Centrífuga

METODOLOGIA

1. Centrifugar la sangre venosa con anticoagulante y separar los glóbulos rojos, lavarlos una vez con solución salina isotónica y preparar una suspensión de glóbulos rojos al 2% con esta solución.

2. Tomar tres tubos de ensaye de 12X75 mm y colocar una gota de suero anti-A, anti-B, anti-AB respectivamente. Los tubos deben estar previamente marcados.

3. Adicionar una gota de la suspensión de glóbulos rojos al 2% a cada uno de los tubos. Mezclar perfecta y cuidadosamente mediante movimientos de rotación.

4. Centrifugar a 1,000 rpm durante 1 minuto o a 3,400 rpm por 30 segundos.

5. Agitar suavemente y observar si hay aglutinación.

6. Comparar el cuadro siguiente con los resultados obtenidos para determinar el grupo sanguíneo del paciente.

SUERO ANTI-A	SUERO ANTI-B	SUERO ANTI-AB	GPO. SANGUINEO
-	-	-	O
+	-	+	A
-	+	+	B
+	+	+	AB

Para tener resultados confiables, debe realizarse la prueba sérica de confirmación, sobre todo en aquellos casos en que la aglutinación no es franca.

**METODO INVERSO PARA LA DETERMINACION DE GRUPOS SANGUINEOS
(DETERMINACION SERICA O DE CONFIRMACION)**

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Suspensión de eritrocitos tipo A al 2% en solución salina isotónica

Suspensión de eritrocitos tipo B al 2% en solución salina isotónica

Material:

Tubos de ensaye de 12X75 mm

Pipetas Pasteur con bulbos

Gradillas para tubos

Material Biológico:

Sangre venosa con o sin anticoagulante.

Equipo:

Centrífuga

METODOLOGIA

1. Centrifugar la sangre problema y poner una gota de suero o plasma (se puede utilizar cualquiera de los dos) en dos tubos. Marcar un tubo con A y el otro con B.
2. Adicionar a cada tubo una gota de la suspensión de glóbulos rojos al 2% correspondiente de acuerdo a la marca del tubo. Mezclar cuidadosamente y perfectamente, dejar reposar 5-15 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar los tubos a 1,000 rpm durante 1 minuto o a 3,400 durante 30 segundos.

4. Después de centrifugar, agitar suavemente los tubos y observar si hay hemólisis o aglutinación. Si se observa aglutinación comparar los resultados con el siguiente cuadro y determinar el grupo sanguíneo de la muestra problema.

Eritrocitos del Grupo A	Eritrocitos del Grupo B	El suero proviene de sangre grupo
+	+	O
-	+	A
+	-	B
-	-	AB

En caso de observar hemólisis, deberá calentarse el suero a 56°C durante 10 minutos y con este suero realizar de nuevo la prueba, ya sin la intervención de las hemolisinas, las cuales enmascaran la reacción de aglutinación.

BIBLIOGRAFIA

1. Dood, E. B., Lincoln, J.P.
 INMUNOLOGIA DE LOS GRUPOS SANGUINEOS
 1a. edición
 Ed. El Manual Moderno
 México (1976)
2. Medina, A.R.
 INMUNOHEMATOLOGIA APLICADA AL BANCO DE SANGRE
 1a. edición
 Ed. Sociedad Mexicana de Hematología
 México (1979)

3. Race, R.R., Sanger, R.
BLOOD GROUPS IN MAN
6a. edición
Ed. Blackwell Scientific Pub.
Great Britain (1975)

4. Zmijewski, C.M.
INMUNOHEMATOLOGIA
1a. edición
Ed. Prentice Hall Inc.
U.S.A. (1978)

DETERMINACION DEL FACTOR Rh

Objetivo:

1. Realizar dos determinaciones del factor Rh.
2. Señalar las aplicaciones de las técnicas y evaluar las ventajas y limitaciones de las mismas.

Generalidades: Al igual que ocurrió con el sistema ABO, el sistema Rh se descubrió durante el estudio de los antígenos eritrocitarios. Landsteiner y Weiner (1941) Inyectaron hematíes del mono Rhesus (*Macaca Rhesus*) - en conejos y cobayos, con el fin de estudiar las relaciones inmunológicas entre el hombre y los primates. Además de los esperados hemoanticuerpos - para los hematíes de Rhesus, el suero de los conejos tratado de esta forma aglutinaba aproximadamente un 85% de los hematíes humanos (Rh^+), pero no - los del 15% restante (Rh^-). (1)

El factor Rh es un aglutinógeno presente en los glóbulos rojos de la mayoría de los individuos, su importancia radica en que cuando a un individuo que no posee este aglutinógeno le son inyectados glóbulos rojos que lo contienen reacciona frente a esta sustancia para él extraña formando anticuerpos capaces de reaccionar con los glóbulos rojos que contienen este factor, lisándolos y aglutinándolos, como este fenómeno ocurre tanto in vitro como in vivo puede dar como consecuencia una severa reacción postransfusional - aún con desenlace fatal, así mismo puede presentarse este fenómeno en mujeres que carecen del factor Rh y que al concebir un hijo que ha heredado el factor Rh del padre reaccionan frente al factor Rh del hijo formando anticuerpos que van a reaccionar con los glóbulos rojos del hijo, destruyéndolos y dando lugar a un fenómeno de eritroblastosis fetal.(2)

De acuerdo a estos estudios, se llegó al descubrimiento de que los Ac. anti-Rh humanos son a menudo de tipo "incompleto" (que al unirse con el Ag son incapaces de producir aglutinación, o sea, inhiben la aglutinación): estos Ac se combinan de forma específica con las células Rh^+ sin producir aglutinación. Como sea que estos Ac no aglutinantes son de tipo IgG, pueden

cruzar la placenta; y en último término, dan lugar a la destrucción de los hematíes fetales. (1)

Las investigaciones dirigidas a la detección de Ac anti-Rh en los procesos hemolíticos constituyen la vía principal para el desarrollo de una serie de ingeniosos métodos utilizados para la detección de Ac incompletos. Aunque al principio se supuso que estos Ac eran univalentes, casi con toda seguridad se trata de moléculas bivalentes, ya que en, ciertas circunstancias son capaces de aglutinar los hematíes; por ejemplo, cuando: 1) las reacciones se llevan a cabo en presencia de una elevada concentración de proteínas, como en un 30% de albúmina sérica, ó 2) los hematíes son previamente tratados con enzimas proteolíticas, como la tripsina y la ficina. (3)

El estudio de numerosos casos de incompatibilidad fetomaterna han permitido obtener una gran variedad de sueros anti-Rh, de los que, en la actualidad existen 27 tipos distintos, cada uno de los cuales corresponde a un determinante aloantigénico específico.

Fundamento: El aglutinógeno Rh presente en los eritrocitos reacciona específicamente con un suero anti-Rh, esta reacción se manifiesta mediante una aglutinación macroscópica de los eritrocitos

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10% (sol. disódica)

Solución de cloruro de sodio al 0.85%

Albúmina bovina al 22%

Suero comercial anti-Rh (anti D)

Material:

Tubos de ensaye de 13X100 mm
Tubos de ensaye de 10X75 mm
Pipetas Pasteur con bulbo
Placas excavadas limpias y desengrasadas
Aplicadores de plástico
Gradillas para tubos

Material Biológico:

Sangre capilar o sangre venosa con anticoagulante

Equipo:

Baño de incubación a 37°C
Centrífuga

METODOLOGIA

1. Si se trabaja con sangre venosa con anticoagulante, preparar una suspensión de glóbulos rojos al 5% en solución salina isotónica.
2. Colocar una gota de sangre capilar o una gota de la suspensión de eritrocitos al 5% en solución salina, en dos excavaciones de la placa, - previamente identificadas.
3. Depositar en la primera excavación una gota de suero anti-Rh.
4. Añadir a la segunda excavación una gota de albúmina bovina al 22%.
5. Mezclar cuidadosa y perfectamente utilizando para ello aplicadores de plástico. Dar a la placa movimiento de rotación suavemente.

6. Observar si se produce aglutinación macroscópica, la cual debe aparecer en 30 segundos y completarse en dos minutos, después de transcurrido este tiempo ya no debe observarse pues pueden aparecer acúmulos de eritrocitos que son debidos a la desecación de la gota y de ninguna manera son debidos a una reacción de aglutinación.

Comparar los resultados obtenidos con el siguiente cuadro:

Suero anti-Rh	Albúmina bovina al 22%	Factor Rh
Aglutinación +	Aglutinación -	+
Aglutinación -	Aglutinación -	-

En los casos en que la reacción sea débilmente positiva o dudosa y aún negativa, deberá procederse a ensayar con suero específico para las variantes del factor Rh.

VARIANTES DEBILES DE Rh
DETECCION DE SANGRE D^u

Los glóbulos rojos D^u generalmente presentan reacciones negativas con sueros típicadores anti-Rh (anti D). Sin embargo, después de exponerlos a un suero anti-Rh (anti D), dan reacción positiva de Coombs.

Fundamento: Ver prueba indirecta de Coombs.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10% (sal disódica)
Solución de cloruro de sodio al 0.85%
Suero comercial anti-Rh (anti-D)
Suero de Coombs

Material:

Tubos de ensaye de 13X100 mm
Tubos de ensaye de 10X75 mm
Pipetas Pasteur con bulbo
Aplicadores de Plástico
Gradillas para tubos

Material Biológico:

Sangre venosa con anticoagulante

Equipo:

Baño de incubación a 37°C
Centrífuga

METODOLOGIA

1. Preparar una suspensión de glóbulos rojos al 2% del problema, lavados previamente en solución salina.
2. Poner en un tubo de ensaye de 10X75 mm 2 gotas de la suspensión - de glóbulos rojos.
3. Añadir una gota de suero humano anti-Rh (anti D) y mezclar bien.
4. Incubar el tubo a 37°C en baño maría por 15 minutos.
5. Lavar tres veces los eritrocitos con solución salina y luego de - escurrir bien en el último lavado resuspenderlos en la solución salina - remanente.
6. Agregar dos gotas del suero de Coombs. Mezclar bien y centrifugar a 1,000 rpm durante un minuto o a 3,000 rpm durante 20 segundos.
7. Desprender suavemente los glóbulos sedimentados y observar si hay aglutinación macroscópica.
8. Es conveniente hacer los siguientes controles junto con la prueba:
 - a) Control Negativo: Preparar una suspensión de glóbulos rojos Rh negativos al 2%, lavados previamente en solución salina. Continuar con las mismas indicaciones dadas para los eritrocitos problema.
 - b) Control Positivo: El mismo procedimiento anterior, pero utilizando eritrocitos Rh positivo.

9. Si no se presenta aglutinación en los eritrocitos problema se consideran Rh negativos. La aglutinación indica la presencia del factor D^u.

NOTA: Es imprescindible hacer una prueba directa de Coombs a la sangre que se somete a la detección del factor D^u para eliminar la posibilidad de que los eritrocitos problema se encuentren cubiertos previamente con anticuerpos específicos. En caso de que la prueba de Coombs directa sea positiva con los eritrocitos del paciente, la aglutinación encontrada en la detección del factor D^u se invalida y deberá considerarse como Rh negativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Bellanti, J.A.
INMUNOLOGIA II
1a. edición
Ed. Interamericana
México (1980)
2. Oski, F.A., Naiman, J.L.
HEMATOLOGY PROBLEMS IN THE NEWBORN
2a. edición
Ed. W. B. Saunders Co.
U.S.A. (1975)
3. Rose, R. N., Bigazzi, E.P.
METHODS, IN IMMUNODIAGNOSIS
1a. edición
Ed. John Wiley & Sons
U.S.A. (1973).

Objetivo:

1. Efectuar la determinación de las pruebas cruzadas, en medio salino, en medio con elevado contenido proteico y tratamiento con enzimas, señalando ventajas y limitaciones de cada una.
2. Establecer la importancia de las pruebas cruzadas mayor y menor en la compatibilidad sanguínea.

Generalidades: El principal objetivo del análisis de grupos sanguíneos en un banco de sangre, está dirigido a obtener sangres compatibles para pacientes que requieren una transfusión. (5)

Existen dos tipos de pruebas cruzadas, que han sido designadas como mayor y menor, de acuerdo a su importancia. En la prueba mayor se hace reaccionar el suero del receptor con los eritrocitos del donador, o donadores. En la prueba menor se hace reaccionar el suero del donador con eritrocitos del receptor. Cuando las sangres del donador y del receptor son compatibles, ambas pruebas dan un resultado negativo, observándose que ambos individuos tienen el mismo grupo sanguíneo. En caso de que el donador y el receptor - sean de diferente grupos sanguíneos, pero compatibles, la prueba cruzada mayor será negativa y la menor positiva. La prueba mayor nunca debe omitirse, porque es decisiva para la seguridad del receptor. (4,3)

Es recomendable utilizar varios métodos de pruebas cruzadas, para reducir los posibles peligros y facilitar la interpretación. Una prueba cruzada completa debe incluir las siguientes pruebas, para descubrir tanto los anticuerpos completos como los incompletos y los atípicos. (2)

1. La prueba en tubo con solución salina a temperatura ambiente, para detectar aglutininas incompletas o bivalentes, como son los anti-A, anti-B y las aglutininas frías.

2. La prueba anterior, pero incubando a 37°C, diseñada para localizar aglutininas calientes, como son los del sistema Rh.

3. La prueba en un medio con elevado contenido protéico (usando albúmina), para detectar anticuerpos incompletos del sistema Rh. En esta técnica se puede producir el fenómeno de prozona, que se evita empleando una centrifugación inmediata. La actividad de algunas aglutininas (por ejemplo anti-A y anti-B), puede ser suprimida en un medio con albúmina.

4. Las técnicas de tratamiento de eritrocitos con enzimas tales como papaína, ficina y bromelina, que son extremadamente sensibles para la localización de varios anticuerpos, como son los anti-Rh, anti-Kell, anti-Kidd y otros.

5. La prueba de la antiglobulina de Coombs indirecta, en solución salina para detectar la mezcla de anticuerpos salinos e incompletos presentes en el suero y la prueba directa para demostrar anticuerpos fijados a los eritrocitos "in vivo", como ocurre en niños con eritroblastosis fetal, o en pacientes con anemia hemolítica adquirida. (2)

Fundamento: El suero del paciente que requiere una transfusión se prueba contra eritrocitos provenientes del donador en la prueba mayor, mientras que en la prueba menor, los eritrocitos del paciente se prueban con suero del donador; ambas pruebas se realizan en medio salino y en un medio con elevado contenido protéico, con objeto de detectar tanto anticuerpos completos como anticuerpos incompletos. La presencia de aglutinación o hemólisis en la reacción, indica que existe incompatibilidad de grupos sanguíneos entre el paciente y el donador estudiados.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10% (sal disódica)
Solución de cloruro de sodio al 0.85%
Albúmina bovina al 30% o al 22%

Material:

Tubos de ensaye de 13 X 100 mm
Tubos de ensaye de 10 X 75 mm
Pipetas Pasteur con bulbo
Aplicadores de madera
Gradilla para tubos

Material Biológico:

Sangre venosa del receptor con anticoagulante
Sangre venosa del donador con anticoagulante.

Equipo:

Baño de incubación a 37°C
Centrífuga

PRUEBAS CRUZADAS EN MEDIO SALINO
METODOLOGIA

1. Ya obtenidas las muestras de sangre con anticoagulante, tanto del receptor como del donador, se colocan en tubos de ensaye de 13X100 mm, se centrifugan y se separa el plasma colocándolo en tubos de 10X75 mm debidamente etiquetados para su identificación.
2. Lavar los eritrocitos con solución de NaCl al 0.85% y preparar con ellos suspensiones al 4-5% en solución salina isotónica.
3. Para efectuar la "prueba mayor", marcar con un tubo de 10X75 mm con "SR/ED" (suero del receptor / eritrocitos del donador); depositar en él una gota del suero del receptor y añadir una gota de la suspensión de eritrocitos del donador.
4. Para la "prueba menor" marcar otro tubo de 10X75 mm con "SD/ER" (suero del donador / eritrocitos de receptor); depositar en él una gota del suero del donador y añadir una gota de la suspensión de eritrocitos del receptor.
5. Mezclar el contenido de cada tubo y centrifugar inmediatamente a 1,000 rpm durante un minuto, o a 3,400 rpm durante 30 segundos.
6. Remover suavemente los eritrocitos del sedimento y observar si se ha producido la aglutinación macroscópica.
7. Si la prueba mayor muestra aglutinación, las sangres son incompatibles; en caso de obtener resultados negativos o dudosos incubar de 50 a 60 minutos en baño maría a 37°C y realizar la prueba de Coombs con los eritrocitos. Esta prueba se describe mas adelante.

PRUEBAS CRUZADAS EN MEDIO CON ELEVADO
CONTENIDO PROTEICO

METODOLOGIA

1. Marcar dos tubos de ensaye de 10X75 mm con "albúmina" y "sin albúmina" y depositar en cada uno de ellos dos gota del suero del receptor.
2. Añadir a cada tubo, mediante un aplicador de madera o con una pipeta Pasteur, una pequeña cantidad de sangre total del donador, suficiente para dar una concentración final en la mezcla de aproximadamente 2-4% de eritrocitos.
3. Agregar al tubo marcado con albúmina, dos gotas de albúmina bovina al 30%.
4. Mezclar perfectamente el contenido de los tubos e inmediatamente centrifugar a 1,000 rpm durante 1 minuto, o a 3,400 rpm por 30 segundos.
5. Remover suavemente el sedimento de eritrocitos y observar si ha ocurrido aglutinación macroscópica. Si la reacción es positiva, las sangres son incompatibles por la presencia de anticuerpos incompletos; en caso de obtener una aglutinación dudosa o negativa, resuspender los eritrocitos e incubar los tubos durante 10 minutos en baño de Incub. a 37°C.

PRUEBAS CRUZADAS UTILIZANDO ERITROCITOS TRATADOS
CON BROMELINA Y FICINA

Fundamento: El tratamiento de los eritrocitos con enzimas tales como la ficina o bromelina, reducen las cargas de la superficie de la membrana por acción sobre el ácido N-acetil neuramínico (ácido siálico), permitiendo así una reacción antígeno-anticuerpo. Así también, algunos antígenos celulares pueden ser más accesibles a los anticuerpos del suero si el ácido siálico se elimina antes.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10% (sal disódica)
Solución de cloruro de sodio al 0.85%
Solución de Bromelina
Solución de Ficina

Material:

Tubos de ensaye de 13X100 mm
Tubos de ensaye de 10X75 mm
Pipetas Pasteur con bulbo
Aplicadores de madera
Gradillas para tubos

Material Biológico:

Sangre venosa del receptor con anticoagulante
Sangre venosa del donador con anticoagulante

Equipo:

Baño de incubación a 37°C
Centrífuga

METODOLOGIA

1. Detección de anticuerpos séricos:

1. Ya obtenidas las muestras de sangre con anticoagulante, tanto del receptor como del donador, se colocan en tubos de ensaye de 13X100 mm, se centrifugan y se separa el plasma colocándolo en tubos de 10X75 mm.

2. Lavar los eritrocitos con solución salina isotónica y preparar con ellos suspensiones al 4-5% en solución salina.

3. Colocar en un tubo de 10X75 mm 2 gotas del suero del receptor, 1 gota de la suspensión de eritrocitos al 4-5% del donador y 1 gota de la solución de bromelina.

4. Mezclar suavemente y dejar reposar 15 minutos a temperatura ambiente.

5. Pasado el tiempo de reposo, centrifugar a 1,000 rpm durante 1 minuto o a 3,400 durante 30 segundos.

6. Remover suavemente los eritrocitos del sedimento y observar si se ha producido la aglutinación macroscópica y nos indica la presencia de anticuerpos en el suero del receptor contra los eritrocitos del donador por lo tanto las sangres son incompatibles.

7. Repetir la prueba utilizando suero del donador y eritrocitos del receptor.

II. Detección de autoanticuerpos:

1. Con la muestra de sangre que se va a estudiar, preparar una suspensión de eritrocitos al 2% en su propio suero.

2. Colocar en un tubo de 10X75 mm 2 gotas de la anterior suspensión de eritrocitos y 1 gota de la solución de bromelina.

3. Mezclar suave y perfectamente y dejar en reposo el tubo durante 15 minutos a temperatura ambiente.

4. Posteriormente centrifugar a 1,000 rpm durante 1 minuto o a 3,400 rpm por 30 segundos.

5. Remover suavemente los eritrocitos del sedimento y observar si se ha producido aglutinación macroscópica, lo que indica la presencia de autoanticuerpos en la sangre que se está estudiando.

III. Pruebas cruzadas con solución de ficina:

1. Preparar suspensiones al 3% de eritrocitos en solución salina tanto de la muestra de sangre del receptor como del donador.

2. Colocar en un tubo de 10X75 mm una gota de solución de ficina, una gota de la suspensión al 3% en solución salina de eritrocitos lavados, del donador.

3. Mezclar perfectamente e incubar en baño maría a 37°C durante 15 minutos.

5. Después de la incubación, lavar la mezcla con solución salina isotónica y resuspender los eritrocitos en una gota de solución salina y adicionar una gota del suero del receptor.

5. Mezclar y centrifugar a 1,000 rpm durante 1 minuto o a 3,400 rpm durante 30 segundos.

6. Remover suavemente los eritrocitos del sedimento y observar si se ha producido aglutinación macroscópica lo que indica la incompatibilidad de las muestras de sangre.

7. Repetir la prueba utilizando suero del donador y eritrocitos del receptor.

PRUEBA DE LA ANTIGLOBULINA DE
COOMBS

Objetivo:

1. Realizar las pruebas directa e indirecta de Coombs y establecer las ventajas y limitaciones de ambas pruebas.
2. Evaluar la importancia de la prueba de Coombs en la detección del factor Rh.

Generalidades: En algunos sueros en que es notorio el fenómeno de zona, cierta proporción del total de anticuerpos reacciona, al parecer, con los antígenos correspondientes de una forma anómala: el anticuerpo unido - no solo es incapaz de producir la aglutinación, sino que la inhibe en forma activa, como se muestra mezclando las partículas a una dilución de anti suero que de otra forma implicaría una reacción de aglutinación rápida. Es estas moléculas de Ac inhibitorias se denominan anticuerpos "incompletos" o "bloqueantes". Coombs ideó un método ingenioso para detectar los anticuerpos bloqueantes o incompletos, llamado prueba de Coombs o de antiglobulina. Se basa en el hecho de que la molécula de anticuerpo se une simultáneamente a un antígeno situado sobre la superficie del hematíe, como el Ac, está constituido por gamma globulina humana, si a los eritrocitos recubiertos - por él, les adicionamos un suero anti-gamma globulina humana, el eritrocito actuará únicamente como soporte mecánico y se llevará a cabo la aglutinación porque reaccionará la gama globulina que lo recubre y el suero anti-gama globulina humana. El suero anti-gama globulina humana usado en esta - prueba se prepara inyectando globulina humana en conejos y recibe el nombre de antiglobulina de Coombs. (1,2)

Los eritrocitos que se están estudiando con esta prueba deben ser lavados cuidadosamente para evitar que cualquier traza de suero del paciente pudiera neutralizar a la anti-globulina de Coombs dando por lo tanto reacciones negativas.

La prueba de Coombs puede efectuarse de dos formas: la prueba directa y la prueba indirecta. La primera se emplea para detectar los anticuerpos incompletos adheridos a los eritrocitos "in vivo" como ocurre en niños con eritroblastosis fetal o en pacientes con anemia hemolítica adquirida. La prueba indirecta se utiliza para detectar los anticuerpos incompletos presentes en el suero del paciente y en consecuencia, es útil para estudiar - las reacciones hemolíticas dentro de un mismo grupo; este tipo de reacciones se lleva a cabo en las mujeres Rh (-), embarazadas cuando el padre es Rh (+) y existe la posibilidad de que ocurra la sensibilización de la madre. (2,4)

Además de su utilidad en el estudio de los anticuerpos anti-Rh, la - prueba de Coombs sirve para demostrar los sistemas de grupos sanguíneos - Kell, Kidd y Duffy y es importante en el estudio de las anemias hemolíticas, en la neumonía atípica primaria, en algunos casos de favismo y hasta en la anemia hemolítica bacteriana y en la producida por drogas, siempre que la - sangre se examine en el momento de acceso hemolítico. (1)

PRUEBA DE COOMBS DIRECTA

Fundamento: Para poner en evidencia la existencia de anticuerpos adheridos a los glóbulos rojos, sólo es necesario agregar a la suspensión de eritrocitos lavados la anti-globulina de Coombs y ocurre la aglutinación.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

- Anticoagulante EDTA al 10% (sal disódica)
- Solución de cloruro de sodio al 0.85%
- Suero de Coombs

Material:

Tubos de ensaye de 13X100 mm
Tubos de ensaye de 10X75 mm
Pipetas Pasteur con bulbo
Gradilla para tubos

Material Biológico:

Sangre venosa con anticoagulante

Equipo:

Centrífuga
Baño de incubación a 37°C

METODOLOGIA

1. Lavar 4 veces (por lo menos) los eritrocitos del paciente con solución salina isotónica para eliminar cualquier traza de suero que pudiera interferir en la prueba y dar resultados falsos negativos. Preparar una suspensión de estos eritrocitos al 2% en solución salina isotónica.

2. Depositar en un tubo de 10X75 mm una gota de la suspensión anterior y una gota del suero de Coombs (antiglobulina humana).

3. Mezclar cuidadosa y perfectamente el contenido del tubo y centrifugar inmediatamente a 1,000 rpm durante 1 minuto o bien a 3,400 rpm durante 30 segundos.

4. Observar si se produjo aglutinación removiendo suavemente el contenido del tubo.

5. Es muy conveniente hacer la reacción al mismo tiempo con testigos constituidos por:

a) Una gota de eritrocitos del paciente, lavados y ajustados al 2%, que se mezclará con una gota del suero de Coombs; servirá para detectar una aglutinación inespecífica.

b) Una gota de eritrocitos normales, lavados y ajustados al 2%, que se mezclará con una gota de suero de Coombs; servirá como testigo negativo.

c) Una gota de eritrocitos sensibilizados que servirá como testigo positivo. Este testigo puede prepararse añadiendo a una gota de una suspensión de eritrocitos Rh (+), lavados y ajustados al 2%, una gota de suero anti-Rh, diluido 1:16 e incubado a 37°C durante 15 minutos; centrifugar y lavar cuatro veces con solución salina isotónica y preparar una suspensión al 2%. Una gota de esta suspensión, se mezcla con una gota de suero de Coombs.

6. La aglutinación de los eritrocitos del paciente, indica que es tán recubiertos de anticuerpos.

PRUEBA DE COOMBS INDIRECTA

Fundamento: Para detectar los anticuerpos incompletos presentes en el suero del paciente, se hace reaccionar este suero con glóbulos rojos conocidos, los cuales son lavados posteriormente y se les adiciona el suero de Coombs, que reaccionará con los anticuerpos adsorbidos a los eritrocitos - dando la aglutinación.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10% (sal disódica)
Solución de cloruro de sodio al 0.85%
Suero de Coombs

Material:

Tubos de ensaye de 13X100 mm
Tubos de ensaye de 10X75 mm
Pipetas Pasteur con bulbo
Gradillas para tubos

Material Biológico:

Sangre venosa con anticoagulante

Equipo:

Baño de incubación a 37°C
Centrífuga

METODOLOGIA

1. Para esta prueba se utilizan glóbulos rojos conteniendo el aglutinógeno cuyos anticuerpos se vayan a investigar. Preparar una suspensión de estos eritrocitos, al 2% en solución salina isotónica.

Para realizar la prueba mayor (pruebas cruzadas empleando antiglobulina de Coombs), se utilizarán los eritrocitos del donador, preparando una suspensión al 2%.

2. En un tubo de ensaye de 10X75 mm adicionar 3 gotas de la suspensión anterior.

3. Adicionar 3 gotas del suero problema (en el que se están investigando los anticuerpos, suero del paciente). Para la prueba cruzada mayor usar el suero del receptor. Mezclar perfecta y cuidadosamente y centrifugar a 1,000 rpm durante un minuto o bien a 3,400 rpm durante 30 segundos.

La centrifugación inmediata puede poner de manifiesto a los anticuerpos que de otra manera producirían fenómeno de zona.

4. Remover suavemente el contenido del tubo y observar si hay aglutinación, lo que indicaría la presencia de anticuerpos completos. Si la reacción de aglutinación es negativa, débil o dudosa, incubar el tubo a 37°C de 30 a 60 minutos.

5. Centrifugar a 1,000 rpm durante un minuto, o bien, a 3,400 rpm durante 30 segundos.

6. Remover suavemente el contenido del tubo, si hay aglutinación indicar la presencia de anticuerpos completos. Si no existe aglutinación o es dudosa lavar los eritrocitos, mínimo 4 veces con solución salina isotónica; escurrir la mayor cantidad posible de solución salina del último lavado y resuspender los glóbulos rojos en la gota que quede.

7. Adicionar una gota del suero de Coombs. Centrifugar a 1,000 rpm durante un minuto o bien a 3,400 rpm durante 30 segundos.

8. Remover suavemente el contenido del tubo y observar si hay aglutinación.

En las pruebas de compatibilidad sanguínea, es necesario incluir un testigo con los eritrocitos del receptor y el suero del mismo, para detectar aglutininas inespecíficas.

9. La aglutinación de los eritrocitos en la prueba indica la presencia de anticuerpos incompletos en el suero del paciente.

BIBLIOGRAFIA

1. Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A. Lachmann, P.J.
CLINICAL ASPECTS OF IMMUNOLOGY
3a. edición
Ed. Blackwell Scientific Pub.
Great Britain (1975)
2. Haesler, W.E. Jr.
IMMUNOHEMATOLOGY
Medical Technology Series
Ed. Lea and Febiger
Philadelphia (1972)
3. Humphrey, H.J., White, R.G.
IMMUNOLOGY FOR STUDENTS OF MEDICINE
1a. edición
Ed. Blackwell Scientific Pub.
Great Britain (1971)

4. Lee, G.B.
LO ESENCIAL DE LA INMUNOLOGIA
2a. edición
Ed. El Manual Moderno
México (1975).

5. Linares, G.J.
INMUNOLOGIA BASICA APLICADA EN EL
BANCO DE SANGRE
2a. edición
Ed. Litotoec, C.A.
Caracas (1970)

Objetivo:

1. Realizar la técnica de la titulación de hemolisinas y aglutininas en un suero problema.
2. Interpretar los resultados obtenidos y establecer su utilidad.

Generalidades: Los antígenos de los hematíes son estructuras químicas que proporcionan propiedades específicas a su superficie y que hasta ahora sólo pueden detectarse por la reactividad de los hematíes con anticuerpos que corresponden a estos antígenos (anticuerpos homólogos). La mayoría de estas reacciones antígeno-anticuerpo implican la aglutinación de los eritrocitos, por eso, los anticuerpos se suelen denominar hemaglutininas y los antígenos, hemaglutinógenos.(2)

Se suele distinguir entre las aglutininas "naturales" y las "inmunes"; las primeras se refieren a las aglutininas que se presentan sin causa conocida, como en la transfusión sanguínea o en la inyección de otras sustancias antigénicas que provoquen la formación de anticuerpos. Las isoaglutininas inmunes resultan de una inmunización deliberada o no (isoimmunización), tal como puede producirse por la transfusión de sangre o por la entrada de hematíes fetales en la circulación materna. Algunos hemoanticuerpos en presencia de complemento hemolizan los glóbulos rojos y por tanto se llaman hemolisinas. En la mayoría de los casos, las hemolisinas se producen después de una inmunización conocida con hemoantígeno. (2,3)

GRUPO	HEMOLISINAS Y AGLUTININAS	
O	Anti A	Anti B
A	-	Anti B
B	Anti A	-
AB	-	-

Fundamento: Las hemolisinas al estar en presencia del antígeno que estimuló su formación y del complemento desencadenan una reacción que causa la lisis de los eritrocitos. Este fenómeno es el resultado de la acción enzimática del complemento, el cual es activado por la unión del antígeno y del anticuerpo específico; el complemento activado va a producir cambios en la permeabilidad de la membrana del eritrocito y al cambiar las propiedades osmóticas de ésta, penetran los líquidos y se produce el estallamiento de los eritrocitos (hemólisis).

REACTIVOS Y MATERIAL**Reactivos:**

Solución de cloruro de sodio al 0.85%
Suspensión de glóbulos rojos (A, B ó AB) al 4% en
solución salina
Suero problema (A, B ó O)

Material:

Tubos de ensaye de 13X100 mm
Tubos de ensaye de 10X75 mm
Pipetas Pasteur con bulbo
Pipetas graduadas de 1 ml
Pipetas graduadas de 0.1 ml
Gradillas para tubos

Equipo:

Baño de incubación a 37°C
Centrífuga

METODOLOGIA

1. Rotular once tubos de ensaye de 10X75 mm con las diluciones 1:1, 1:2, ... , hasta 1:1024.
2. Del tubo No. 2 en adelante adicionarles 0.1 ml de solución salina isotónica.
3. Poner 0.1 ml del suero con los anticuerpos por titular en los tubos 1 y 2.

4. Mezclar con la misma pipeta de 0.1 ml el suero con la solución salina cuidando de no formar espuma. Del tubo No. 2, transferir 0.1 ml de esta mezcla al tubo No. 3, mezclar y transferir 0.1 ml al tubo No. 4 y así sucesivamente hasta el tubo No. 11 del cual después de mezclar se desecha 0.1 ml.

5. Se agrega a cada tubo 2 gotas de la suspensión de eritrocitos al 4%. El grupo de los eritrocitos dependerá del anticuerpo en titulación.

6. Incubar los tubos en baño maría a 37°C durante una hora.

7. Centrifugar los tubos a 3,500 rpm durante 15 segundos.

8. Observar si se produjo aglutinación y/o hemólisis. Reportar el título de la dilución en la cual todavía se presenta hemólisis.

VALORES DE REFERENCIA

No debe presentarse hemólisis en diluciones mayores a 1:64.

BIBLIOGRAFIA

1. Dacie, J. V., Lewis, S.M.
PRACTICAL HAEMATOLOGY
5a. edición.
Ed. Churchill Livingstone.
London (1975).
2. Davis, B.D. y col.
TRATADO DE MICROBIOLOGIA (con inclusión
de Inmunología y Genética Gral.)
2a. edición
Ed. Salvat
España (1978).

3. Todd, C. J., Sanford, H.S.

CLINICAL DIAGNOSIS AND MANAGEMENT

6a. edición

Ed. W. B. Saunders Co.

U.S.A. (1979).

CAPITULO VI
CITOQUIMICA

Objetivo:

1. Aplicar técnicas de tinción para la diferenciación de algunos tipos de leucemias.

2. Señalar la importancia clínica de dichas técnicas.

Generalidades: Considerando a las leucemias como "padecimiento" proliferativo maligno de la médula ósea hematopoyética, cualquiera de las células que normalmente se originan en ella pueden en un momento dado dar un cuadro leucémico; es decir, la aparición de formas inmaduras que normalmente no es tan en la sangre circulante, como consecuencia de un aumento de éstas en la médula ósea. (1,2)

De acuerdo a un criterio puramente morfológico las leucemias inicialmente se clasifican en: agudas cuando tienen más del 10% de blastos en la sangre periférica y/o médula ósea; crónica cuando tienen menos del 10% de blastos en la sangre periférica y/o la médula ósea.

Los procedimientos de coloración citoquímica han sido bien establecidos como auxiliares en la identificación de los diversos tipos celulares de leucemia aguda, así como para la demostración de deficiencias enzimáticas en la leucemia granulocítica crónica. (3)

Fundamento: La demostración de ciertas enzimas y constituyentes químicos de las células que los caracterizan, se ponen en evidencia con diversas reacciones.

Clasificación citomorfológica de las Leucemias por el comité
Franco Americano Británico (FAB)

	AGUDAS	CRONICAS
Linfoblásticas	L1 L2 L3	Linfocítica
Mieloblástica	M1 Mieloblástica M2 Mieloblástica con maduración M3 Promielocítica M4 Mielomonoblástica M5 Monoblástica M6 Eritroleucemia	Mielocítica o Granulocítica

REACCION DE SUDAN NEGRO B

Fundamento: El Sudañ Negro B tiñe diversos lípidos incluyendo grasas neutras y en particular fosfolípidos. Los vapores de formaldehído fijan las grasas y fosfolípidos los que al contactar con el colorante, toman un color azul-negro que contrasta con el colorante de Wright usado para la contratinción. (3)

REACTIVOS Y MATERIAL**Reactivos:**

Sol. de formaldehído al 37%
Sol. de Sudán Negro B. Sol. de trabajo
Sol. Amortiguadora (fenol-etanol-fosfatos)
Colorante de Wright

Material:

Portaobjetos con extensiones sanguíneas o de médula ósea,
Soporte de vidrio para portaobjetos
Vasos de Coplin
Cajas Petri
Papel secante

Equipo:

Microscopio
Aceite de inmersión

METODOLOGIA

1. Fijar las preparaciones con vapores de sol. de formaldehído al 37% durante 10 min. Esto se hace poniendo las extensiones secas en una caja de Petri cerrada que contenga una pequeña cantidad de formol al 37%. Se ponen los portaobjetos sobre unos puentes de vidrio para impedir su contacto directo con la sol. de formol.

2. En un vaso de Coplin que contiene la sol. de trabajo de Sudán Negro B, sumergir las preparaciones fijadas durante 60 min.

3. Lavar con etanol al 70% por 2-3 min. Lavar con agua corriente durante 30 seg.
4. Contrateñir con colorante de Wright.
5. Sacar al aire y examinar el microscopio.

NOTA: No montar con resina sintética pues generalmente está rebajada con xilol, solvente de las grasas.

INTERPRETACION: Esta reacción es de gran utilidad y especificidad en la identificación de la leucemia aguda mieloblástica. En forma típica los elementos granulocitarios, desde mieloblastos hasta polisegmentados (incluyendo basófilos y eosinófilos presentan granulación gruesa color azul-negro en su citoplasma. Esta granulación es más importante constituyendo la positividad de esta reacción. Desafortunadamente un 10% de estas leucemias dan reacción positiva. Los monocitos pueden ser débilmente positivos y en forma de granulación fina

REACCION DE PAS-SCHIFF

Fundamento: El ácido peryódico reacciona con los grupos glicol 1 y 2 que existen en cada residuo de glucosa, lo que constituye la molécula de glucógeno, transformando las cadenas polisacáridas en cadenas polialdehídicas que reaccionan con el reactivo de Schiff (leucofucsina) para formar un complejo color púrpura que puede ser identificado fácilmente por microscopía de luz. El metabisulfito de sodio elimina el exceso del reactivo de Schiff y favorece la coloración adventicia por oxidación al aire de la leucofucsina absorbida. La hematoxilina se usa para teñir el resto de la célula, lo que facilita su identificación. (3,4)

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIALReactivos:

Solución de formalina alcohólica
Solución de ácido peryódico
Reactivos de Schiff
Hematoxilina, comercial

Material:

Portaobjetos con extensiones sanguíneas o de médula ósea.
Soporte de vidrio para portaobjetos
Vasos de coplin
Papel secante

Equipo:

Microscopio
Aceite de inmersión

METODOLOGIA

1. Fijar la preparación con solución de formalina alcohólica durante 30 seg. Lavar con agua 15 min. corriente y secar.
2. Agregar a la preparación solución de ácido peryódico por 10 min. (PAS). Lavar con agua y secar.
3. Adicionar el reactivo de Schiff por 35 min. Lavar con agua 5 minutos y secar.

4. Agregar hematoxilina por 15 min. Lavar con agua corriente 5 min. secar y observar al microscopio por inmersión.

Interpretación:

Esta reacción pone de manifiesto glucógeno, glucoproteínas y algunos mucopolisacáridos. El glucógeno fijado en la célula se observa como un sedimento granuloso aterronado, localizándose exclusivamente en el citoplasma de las células; su concentración aumenta a medida que la célula madura. En la leucemia linfoblástica aguda los blastos presentan una importante cantidad de gránulos de color rojo (glucógeno), tamaño y forma irregulares en cuanto mayor sea la maduración de la célula. Los elementos mieloides y monocitoides adultos son positivos. Algunos monoblastos pueden presentar positividad a esta reacción. Es positiva franca en la eritroleucemia.

BIBLIOGRAFIA

1. Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel M. T., Flandrin, G. Brit. J. Haemat 33, 451-458 (1976).
2. Bennett, J. M., Catovsky, D. Daniel, M. T., Flandrin, G. Brit. J. Haemat. 47, 553-561 (1981)
3. Williams, W. J. and et al.
HEMATOLOGY
3a. edición
Ed. Mc Graw-Hill Book Co.
U.S.A. (1983)
4. Wislocki, G.B., Rheingold, J. M., and Dempsey, E. W. "The occurrence of the periodic acid Schiff reaction in various normal cells of blood and connective tissue". Blood 4: 562 (1949).

5. Golde, D.W., Machado, E.A. et. al.

"Proliferation and differentiation of human myeloid Leukemic cells in Immunodeficient mice: electron microscopy and cytochemistry".

Blood

63:1015 (1984)

CAPITULO VII
APENDICE

REACTIVOS

1. SOLUCION DE EDTA AL 10%

EDTA sal disódica	10.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

2. SOLUCION DE DRABKIN

Bicarbonato de sodio	1.00 g
Ferricianuro de potasio	0.20 g
Cianuro de potasio	0.05 g
Agua destilada c.b.p.	1000.00 ml
Saponina	

Solución diáfana de color amarillo pálido, estable en frasco ámbar a temperatura ambiente durante algunos meses.

3. SOLUCION DE HAYEM

Cloruro de mercurio	0.50 g
Cloruro de sodio	1.00 g
Sulfato de sodio anhidro	5.00 g
Agua destilada c.b.p.	100.00 ml

Disolver en el orden indicado. Estable por 2-3 semanas.

4. SOLUCION DE NUEVO AZUL DE METILENO AL 0.5%

Nuevo azul de metileno	0.50 g
Oxalato de potasio	1.40 g
Cloruro de sodio	0.80 g
Agua destilada c.b.p.	100.00 ml

Filtrar la solución antes de usarla.

5. SOLUCION DE AZUL DE CRESIL BRILLANTE AL 1%

Azul de cresil brillante	1.0 g
Solución salina al 0.85% c.b.p.	100.0 ml

6. SOLUCION DE TURK

Acido acético glacial	2.0 ml
Solución acuosa de violeta de genciana al 1%	1.0 ml
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

Filtrar la solución antes de usarla.

7. SOLUCION DE SULFATO DE MAGNESIO AL 14%

Sulfato de magnesio	14.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

8. SOLUCION DE ALCOHOL ETILICO AL 70%

Alcohol etílico absoluto	70.0 ml
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

9. SOLUCION DILUYENTE DE PLAQUETAS

Citrato de sodio	3.80 g
Formaldehído al 40%	0.20 ml
Azul de cresil brillante	0.10 g
Agua destilada c.b.p.	100.00 ml

Guardar la solución en refrigeración. Filtrar antes de usarla.

10. SOLUCION DE OXALATO DE AMONIO AL 1%

Oxalato de amonio	1.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

11. SOLUCION DE METABISULFITO DE SODIO AL 2%

Metabisulfito de sodio	2.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

Debe prepararse diariamente.

12. SOLUCION DE CLORURO DE SODIO AL 0.85%

Cloruro de sodio	0.85 g
Agua destilada c.b.p.	100.00 ml

13. SOLUCION DE CLORURO DE SODIO AL 1% AMORTIGUADA A pH 7.4 CON FOSFATOS

Cloruro de sodio	180.00 g
Fosfato disódico	27.31 g
Fosfato monosódico	4.86 g
Agua destilada c.b.p.	2000.00 ml

Solución de trabajo al 1% : diluir la solución 1:10 con solución salina isotónica.

14. SOLUCION DE CITRATO DE SODIO AL 3.8%

Citrato de sodio	3.80 g
Agua destilada c.b.p.	100.00 ml

15. SOLUCION DE CLORURO DE SODIO AL 0.9%

Cloruro de sodio	0.90 g
Agua destilada c.b.p.	100.00 ml

16. SOLUCION DE HIDROXIDO DE SODIO 0.083 N

Hidróxido de sodio	3.32 g
Agua destilada c.b.p.	1000.00 ml

17. SOLUCION DE SULFATO DE AMONIO SATURADA Y ACIDIFICADA CON HCl
REACTIVO PRECIPITANTE

Sulfato de amonio	350.0 g
Agua destilada	500.0 ml

Filtrar y diluir 400 ml del filtrado con 400 ml de agua destilada. Adicionar.

Acido clorhídrico 10 N (ajustar el pH a 7)

Este reactivo es estable indefinidamente en frasco de polietileno a temperatura ambiente.

18. SOLUCION DE EDTA AL 0.3%
- | | |
|-----------------------|-----------|
| EDTA sal disódica | 0.30 g |
| Agua destilada c.b.p. | 100.00 ml |
19. REACTIVO DE BENCIDINA
- | | |
|-----------------------|----------|
| Bencidina | 1.0 g |
| Acido acético glacial | 90.0 ml |
| Agua destilada c.b.p. | 100.0 ml |
20. SOLUCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO AL 1%
- | | |
|------------------------------|-----------|
| Peróxido de hidrógeno al 30% | 3.30 ml |
| Agua destilada c.b.p. | 100.00 ml |
21. SOLUCION DE ACIDO ACETICO AL 10%
- | | |
|-----------------------|----------|
| Acido acético glacial | 10.0 ml |
| Agua destilada c.b.p. | 100.0 ml |
22. SOLUCION AMORTIGUADORA TRIS-EDTA-AC. BORICO (TEB) pH 8.4
- | | |
|---|------------|
| Tris (hidroximetil) aminometano | 10.20 g |
| Acido etilendiaminotetracético sal disódica | 0.60 g |
| Acido bórico | 3.20 g |
| Agua destilada c.b.p. | 1000.00 ml |
23. REACTIVO HEMOLIZANTE (EDTA sal disódica cianuro de potasio)
- | | |
|-----------------------|-----------|
| EDTA sal disódica | 2.50 g |
| Cianuro de potasio | 0.05 g |
| Agua destilada c.b.p. | 100.00 ml |
24. SOLUCION COLORANTE DE PONCEAU S AL 0.5%
- | | |
|------------------------|-----------|
| Colorante de Ponceau S | 0.50 g |
| Acido tricloroacético | 5.00 g |
| Agua destilada c.b.p. | 100.00 ml |
25. SOLUCION DE ACIDO ACETICO AL 5%
- | | |
|-----------------------|----------|
| Acido acético glacial | 5.0 ml |
| Agua destilada c.b.p. | 100.0 ml |

26. SOLUCION METANOLICA DE ACIDO ACETICO AL 30%

Acido acético glacial	30.0 ml
Alcohol metílico absoluto	70.0 ml

27. SOLUCION ACUOSA DE CIANURO DE POTASIO AL 3%

Cianuro de potasio	3.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

28. SOLUCION DE BATOFENANTROLINA SULFONATADA AL 0.64%

Batofenantrolina	100.0 mg
Acido clorosulfónico libre de hierro	0.5 ml

Calentar por 30 segundos. Enfriar y agregar:

Agua desionizada	10.0 ml
------------------	---------

Calentar en baño de agua con agitación. Diluir 3 ml del reactivo a 100.0 ml con solución de acetato de sodio al 45%. Filtrar si es necesario. Guardar en fco. ámbar. Estable por varios meses.

29. SOLUCION AMORTIGUADORA DE GLICINA-HCl pH 1.9

Glicina	0.75 g
Agua destilada (libre de Fe)	30.00 ml
Ajustar el pH a 1.9 ± 0.02 con HCl 1N	
Agua destilada c.b.p.	50.00 ml

30. SOLUCION DE ACIDO ASCORBICO AL 0.5%

Acido ascórbico	50.0 mg
Agua destilada c.b.p. (libre de Fe)	10.0 ml

31. SOLUCION DE TRABAJO: AC. ASCORBICO AL 0.5% - AMORTIGUADOR GLICINA-HCl

1 volumen de amortiguador de glicina - HCl
2 volúmenes de sol. de ác. ascórbico al 0.5%

32. SOLUCION DE HIERRO 150 ug/dl

Hierro G.R.	150.0 mg
-------------	----------

Disolver en ácido sulfúrico 1.0N El H_2SO_4 deberá estar en exceso.

Agua destilada c.b.p. 1000.0 ml

33. SOLUCION DE HIERRO 300 ug/dl

Igual que la anterior, pero usando 300 mg de Hierro G.R.

34. SOLUCION DE SACAROSA

SACAROSA 486.00 g

Barbital de sodio 5.10 g

Agua destilada c.b.p. 1000.00 ml

Ajustar el pH a 7.3 - 7.4 con HCl

Esta solución es estable por varios meses a 4°C

Para la SOLUCION DE TRABAJO

Solución de Sacarosa 20.0 ml

Agua destilada c.b.p. 100.0 ml

35. SOLUCION DE HIDROXIDO DE AMONIO 0.01 M

Hidróxido de amonio 0.35 g

Agua destilada c.b.p. 1000.00 ml

36. SOLUCION DE CLORURO DE SODIO 0.15 M

Cloruro de sodio 8.70 g

Agua destilada c.b.p. 1000.00 ml

37. SOLUCION DE CLORURO DE MAGNESIO 0.05 M

Cloruro de magnesio 4.75 g

Agua destilada c.b.p. 1000.00 ml

38. SOLUCION DE ACIDO CLORHIDRICO 0.15 N

Acido clorhídrico 12.90 ml

Agua destilada c.b.p. 1000.00 ml

39. AZUL DE PRUSIA (SOLUCION DE FERROCIANURO DE POTASIO)

Ferrocianuro de potasio 1.0 g

Acido clorhídrico 1.0 ml

- | | |
|--|------------|
| Agua destilada (libre de Fe) c.b.p. | 100.0 ml |
| 40. SOLUCION DE OXALATO DE SODIO 0.1M | |
| Oxalato de sodio | 13.40 g |
| Agua destilada c.b.p. | 1000.00 ml |
| Guardar en refrigeración | |
| 41. SOLUCION DE CLORURO DE CALCIO 0.0125 M | |
| Cloruro de calcio | 1.38 g |
| Agua destilada c.b.p. | 1000.00 ml |
| 42. SOLUCION DE CLORURO DE CALCIO 0.02 M | |
| Cloruro de calcio | 2.22 g |
| Agua destilada c.b.p. | 1000.00 ml |
| 43. SOLUCION AMORTIGUADORA DE VERONAL DE OWREN pH 7.35 | |
| Dietil barbiturato de sodio | 11.75 g |
| Cloruro de sodio | 14.67 g |
| Disolver en agua destilada | 500.00 ml |
| Acido clorhídrico 0.1 N | 400.00 ml |
| Agua destilada c.b.p. | 2000.00 ml |
| 44. SOLUCION DE ALCOHOL ETILICO AL 50% | |
| Etanol absoluto | 52.0 ml |
| Agua destilada c.b.p. | 100.0 ml |
| 45. SOLUCION DE CLORURO DE CALCIO 0.05 M | |
| Cloruro de calcio | 5.55 g |
| Agua destilada c.b.p. | 1000.00 ml |
| 46. SOLUCION DE ACIDO ACETICO AL 1% | |
| Acido acético glacial | 1.0 ml |
| Agua destilada c.b.p. | 100.0 ml |
| 47. SOLUCION AMORTIGUADORA DE VERONAL (OWREN-KOLLER) pH 7.4 | |
| Igual que la solución 43, pero ajustando el pH a 7.4 con HCl 0.1 N | |

48. SOLUCION DE CLORHIDRATO DE PROTAMINA AL 1.4%

Clorhidrato de protamina	1,40 g
Esteres de p-oxibenzóicos	0.09
Agua destilada c.b.p.	100.00 ml

Nota: existe en el mercado ampollitas con 5 ml de esta sol.

49. SOLUCION AMORTIGUADORA TRIS pH 6.5

Tris (hidroxi metil) amino metano	1.514 g
Ajustar pH con HCl 1 N	
Solución salina c.b.p.	250.00 ml

50. SOLUCION DE SUDAN NEGRO B

Sudán negro B	0.30 g
Etanol absoluto c.b.p.	100.00 ml
Para la SOLUCION DE TRABAJO	
Solución de Sudán negro B	60.00 ml
Amortiguador (fenol-etanol-fosfatos)	40.00 ml

51. SOLUCION AMORTIGUADORA (fenol-etanol-fosfatos)

Fenol	16.00 g
Etanol	30.00 ml
Disolver y agregar	
Fosfato disódico	0.30 g
Agua destilada c.b.p.	100.00 ml

52. SOLUCION DE FORMALINA ALCOHOLICA -

Formaldehído al 37%	27.0 ml
Etanol absoluto	73.0 ml

53. SOLUCION DE ACIDO PERYODICO

Peryodato de potasio	0.69 g
Agua destilada c.b.p.	100.00 ml
Disolver por calentamiento y agregar:	
Acido nítrico conc.	0.30 ml

54. REACTIVO DE SCHIFF

Fucsina básica	1.50 g
Agua destilada	220.00 ml

Hervir y enfriar a 60°C, filtrar y agregar:

Metabisulfito de sodio	2.0 g
Acido clorhídrico	20.0 ml

Filtrar y guardar en la obscuridad a 4°C

55. SOLUCION ACUOSA DE VIOLETA DE GENCIANA AL 1%

Violeta de genciana	1.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

56. SOLUCION DE ACETATO DE SODIO AL 45%

Acetato de sodio	45.0 g
Agua destilada c.b.p.	100.0 ml

57. SOLUCION DE HCl 1 N

Acido clorhídrico	86.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

PARAMETRO	UNIDADES CONVENCIONALES	UNIDADES SI
	Porcentaje medio	
Cuenta de Leucocitos	4,000 - 11,000 /uI	4.5-11.0 x 10 ⁹ /l
Neutrófilos segmentados	56.0	1,800 - 7,000 /uI
Bandas	3.0	0 - 700 /uI
Eosinófilos	2.7	0 - 450 /uI
Basófilos	0.3	0 - 200 /uI
Linfocitos	34.0	1,000 - 4,800 /uI
Monocitos	4.0	0 - 800 /uI
<u>Hemoglobina</u>		
Hombres	13.5 - 18.0 g/dl	2.09-2.79 mmol/l
Mujeres	12.0 - 16.0 g/dl	1.86-2.48 mmol/l
<u>Cuenta de Eritrocitos</u>		
Hombres	4.9 - 5.9 x 10 ⁶ /uI	5.9-5.9 x 10 ¹² /l
Mujeres	3.9 - 4.9 x 10 ⁶ /uI	3.9-4.9 x 10 ¹² /l
<u>Hematocrito</u>		
Hombres	46 - 56 %	0.46 - 0.54
Mujeres	39 - 47 %	0.39 - 0.47
<u>Indices Eritrocíticos</u>		
Volumen corpuscular		
Medio (VCM)		
Hombres	89 - 101 u ³	89 - 101 fl
Mujeres	86 - 98 u ³	86 - 98 fl
Hemoglobina Corpuscular		
Media (HCM)		
Hombres	29 - 32 pg	0.45 - 0.49 fmoI
Mujeres	28 - 32 pg	0.43 - 0.49 fmoI

PARAMETRO	UNIDADES CONVENCIONALES	UNIDADES SI
Concentración corpuscular		
Media Hb (CCMH)		
Hombres	30 - 34 %	0.30 - 0.34
Mujeres	31.5 - 34.5 %	0.31 - 0.34
<u>Plaquetas</u>	150,000 - 4000.000 /ul	$0.15 - 0.40 \times 10^{12}/L$ (150-400 $\times 10^9 /L$)
Cuentas de Reticulocitos		
	0.5 - 1.5 %	0.005 - 0.015
	25,000-75,000 /ul	$25 - 75 \times 10^9/L$
Velocidad de Sedimentación de los Eritrocitos		
Hombres	4 mm límite 7	
Mujeres	10 mm límite 15	
Niños	5-10 mm límite 15	

PARAMETRO

Hemoglobina Fetal	0.5 - 1.7 %
Hb libre en Plasma	10 - 40 mg /dl
Hierro	
Hombres	90 - 140 ug/dl
Mujeres	89 - 120 ug/dl
Capacidad libre de combinación	
Hombres	200 - 300 ug/dl
Mujeres	150 - 250 ug/dl
Capacidad total de combinación	
Hombres	300 - 400 ug/dl
Mujeres	250 - 350 ug/dl
% de Saturación	25 - 45
Sideroblastos en médula ósea	20 - 40 %
Sideroblastos en sangre periférica	0 - 30 por 1000
Células L.E.	negativo
Células Drepanocíticas	negativo
Fragilidad Osmótica	0.20 97 - 100 % hem. 0.35 90 - 99 % 0.40 50 - 90 % 0.45 5 - 45 % 0.50 0 - 5 % 0.55 0
	50% Hemólisis 0-40 % NaCl

PARAMETRO

Tiempo de Sangrado	Método de Duke	1 a 3 min.
	Método de Ivy	2 a 6 min.
Tiempo de Coagulación	Método Lee y White	7 a 15 min.
	Método sangre capilar	3 a 5 min.
Plasma Recalcificado	90 a 120 seg.	
Retracción del Coágulo	40 a 94 %	
Fragilidad Capilar	Máximo 10 petequias	
Adhesividad Plaquetaria	20 a 40 % de adhesividad	
Tiempo de Protrombina	10 a 15 seg.	
Tiempo de Tromboplastina Parcial	25 a 35 seg.	
Tiempo de Trombina	18 a 23 seg.	
Fibrinógeno	150 a 400 mg/dl	
Gel de Etanol	No debe aparecer gel	
Sulfato de Protamina	Solución clara	
Lisis de Euglobulinas	Coágulo firme durante 2 hrs.	

BIBLIOGRAFIA

1. Ochoa, E.A.; Gallardo, Y.; Braniff, C.
VALORES NORMALES Y REFERENCIAS UTILES
SOBRE PRUEBAS DEL LABORATORIO CLINICO
México (1976).

2. Wintrobe, M.M.
CLINICAL HEMATOLOGY
8a. edición
Ed. Lea and Febiger
Philadelphia (1984).

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL MANUAL

ac	Acido
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ARN	Acido ribonucleico
CCMH	Concentración corpuscular media de hemoglobina
Células L.E.	Células de lupus eritematoso
Cianometa Hb	Cianometahemoglobina
C. T. F. H.	Capacidad total de fijación de hierro
Fe	Hierro
Hb	Hemoglobina
Hb-C	Hemoglobina C
Hb-E	Hemoglobina embrionaria
Hb-F	Hemoglobina fetal
Hb-S	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HPN	Hemoglobinuria paroxística nocturna
Ht	Hematocrito
IgG	Inmunoglobulina G
M	Solución molar
min.	Minutos
N	Solución normal
pdf	Productos de degradación de la fibrina
PDF	Productos de degradación del fibrinógeno
Rh (-)	Factor Rh negativo
Rh (+)	Factor Rh positivo
rpm	Revoluciones por minuto
seg.	Segundos
Sol.	Solución
TP	Tiempo de protrombina
TT	Tiempo de trombina
TTP	Tiempo de Tromboplastina parcial

VCM	Volumen corpuscular medio
VSE	Velocidad de sedimentación de los eritrocitos

UNIDADES METRICAS

Peso	g	Gramo		
	mg	Miligramo	=	10^{-3} gramo
	pg	Picogramo	=	10^{-12} gramo
Volumen	l	Litro		
	dl	Decilitro	=	10^{-1} litro
	ml	Mililitro	=	10^{-3} litro
	ul	Microlitro	=	10^{-6} litro
	fl	Femtolitro	=	10^{-15} litro
Concentración	mmol	Milimol	=	10^{-3} mol
	fmol	Fentomol	=	10^{-15} mol
Otras	u	micras		
	nm	Nanómetros		

TABLA DE TRANSMISION - EXTINCION

%T.	E	%T	E	%T	E	%T	E
1.0	2.000	26.0	.585	51.0	.292	76.0	.119
1.5	1.824	26.5	.577	51.5	.288	76.5	.116
2.0	1.699	27.0	.569	52.0	.284	77.0	.114
2.5	1.602	27.5	.561	52.5	.280	77.5	.111
3.0	1.523	28.0	.553	53.0	.276	78.0	.108
3.5	1.456	28.5	.545	53.5	.272	78.5	.105
4.0	1.398	29.0	.538	54.0	.268	79.0	.102
4.5	1.347	29.5	.530	54.5	.264	79.5	.100
5.0	1.301	30.0	.523	55.0	.260	80.0	.097
5.5	1.260	30.5	.516	55.5	.256	80.5	.094
6.0	1.222	31.0	.509	56.0	.252	81.0	.092
6.5	1.187	31.5	.502	56.5	.248	81.5	.089
7.0	1.155	32.0	.495	57.0	.244	82.0	.086
7.5	1.126	32.5	.488	57.5	.240	82.5	.084
8.0	1.097	33.0	.482	58.0	.237	83.0	.081
8.5	1.071	33.5	.475	58.5	.233	83.5	.078
9.0	1.046	34.0	.469	59.0	.229	84.0	.076
9.5	1.022	34.5	.462	59.5	.226	84.5	.073
10.0	1.000	35.0	.456	60.0	.222	85.0	.071
10.5	.979	35.5	.450	60.5	.218	85.5	.068
11.0	.959	36.0	.444	61.0	.215	86.0	.066
11.5	.939	36.5	.438	61.5	.211	86.5	.063
12.0	.921	37.0	.432	62.0	.208	87.0	.061
12.5	.903	37.5	.426	62.5	.204	87.5	.058
13.0	.886	38.0	.420	63.0	.201	88.0	.056
13.5	.870	38.5	.414	63.5	.197	88.5	.053
14.0	.854	39.0	.409	64.0	.194	89.0	.051
14.5	.838	39.5	.403	64.5	.191	89.5	.048
15.0	.824	40.0	.398	65.0	.187	90.0	.046
15.5	.810	40.5	.392	65.5	.184	90.5	.043
16.0	.796	41.0	.387	66.0	.181	91.0	.041
16.5	.782	41.5	.382	66.5	.177	91.5	.039
17.0	.770	42.0	.377	67.0	.174	92.0	.036
17.5	.757	42.5	.372	67.5	.171	92.5	.034
18.0	.745	43.0	.367	68.0	.168	93.0	.032
18.5	.733	43.5	.362	68.5	.164	93.5	.029
19.0	.721	44.0	.357	69.0	.161	94.0	.027
19.5	.710	44.5	.352	69.5	.158	94.5	.025
20.0	.699	45.0	.347	70.0	.155	95.0	.022
20.5	.688	45.5	.342	70.5	.152	95.5	.020
21.0	.678	46.0	.337	71.0	.149	96.0	.018
21.5	.668	46.5	.332	71.5	.146	96.5	.016
22.0	.658	47.0	.328	72.0	.143	97.0	.013
22.5	.648	47.5	.323	72.5	.140	97.5	.011
23.0	.638	48.0	.319	73.0	.139	98.0	.009
23.5	.629	48.5	.314	73.5	.134	98.5	.007
24.0	.620	49.0	.310	74.0	.131	99.0	.004
24.5	.611	49.5	.305	74.5	.128	99.5	.002
25.0	.602	50.0	.301	75.0	.125	100.0	.000
25.5	.594	50.5	.297	75.5	.122		

C O N C L U S I O N E S

Este trabajo representa una revisión exhaustiva de las técnicas existentes en la bibliografía y manuales citados, fueron seleccionadas de acuerdo a las siguientes características: sensibilidad, simplicidad y rapidez, por lo que sería recomendable su consulta y utilización por parte de alumnos que cursan la materia, técnicos laboratoristas, químicos y demás miembros del sector salud, lo que redundaría en una unificación de criterios en cuanto a metodología, valores de referencia, interpretación, etc.

En cuanto a su vigencia, esto es relativo ya que hay que considerar los nuevos avances en esta materia tomándolos en cuenta para la constante renovación de este tipo de trabajo.