



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "CUAUTITLAN"

**"MANUAL DE QUIMICA CLINICA PARA EL
LABORATORIO DE A.B.C.I."**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
VIRGINIA BENITEZ SOLIS

Bajo la Dirección del Profesor: Q.F.B. Ramón Cedejas Ramírez

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx. Mayo, de 1985

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.

LISTA DE ABREVIATURAS:

A.B.C. I	Análisis Bioquímicos Clínicos
Q.F.B.	Químico Farmacéutico Biólogo
I.M.S.S.	Instituto Mexicano del Seguro Social
E.G.O.	Examen general de orina
B.H.	Biometría hemática
Q.S.	Química sanguínea
Ht	Hematocrito
Hb	Hemoglobina
HbO ₂	Oxihemoglobina
G.R.	Glóbulo rojo, Eritrocito ó Hematíe
G.B.	Glóbulo blanco ó Leucocito
V.S.G.	Velocidad de sedimentación globular
V.C.M.	Volumen corpuscular medio
C.C.M.H.	Concentración corpuscular media de hemo- globina
H.C.M.	Hemoglobina corpuscular media
H.G.C.	Hormona gonadotrofina corfónica
T.G.P.	Transaminasa glutámico pirúvica
T.G.O.	Transaminasa glutámico oxalacética
D.H.L.	Deshidrogenasa láctica
F. Ac.	Fosfatasa ácida
F. Alc.	Fosfatasa alcalina
B.D.	Bilirrubina directa
B.I.	Bilirrubina indirecta
B.T.	Bilirrubina total
A.D.P.	Adenosín difosfato
A.T.P.	Adenosín trifosfato
E.D.T.A.	Sal disódica (etilén diamina)

H	Hidrógeno
K	Potasio
Na	Sodio
Mg	Magnesio
Ca	Calcio
Cl	Cloro
O ₂	Oxígeno
CO ₂	Dióxido de carbono
NH ₃	Amoníaco
HPO ₄	Fosfatos
SO ₄	Sulfatos
HCO ₃	Carbonatos
D.H.A.	Dihidroxiacetona.
S.R.E.	Sistema retículo endotelial
S.I.	Sistema intrínseco
S.E.	Sistema extrínseco
mm	milímetros
cm ³	centímetros cúbicos
gr	gramos
Kg	Kilogramos
ml	mililitros
Lt	litros
eq	equivalentes
mEq	miliequivalentes
mA	miliamperes
mg	miligramo
nm	nanómetros
' 6 min.	minutos
P.	Presión
r.p.m.	revoluciones por minuto
c.b.p.	cúanto baste para
M	Molar
N	Normal
D.O.	Densidad Optica

I N D I C E G E N E R A L

Prefacio _____	1
Objetivo _____	3
Introducción _____	3
 Capítulo I	
Examen General de Orina	
Antecedentes _____	7
Recolección de Muestras _____	12
Recomendaciones para las tomas de muestras _____	14
Técnicas _____	15
El sedimento urinario _____	23
Pruebas múltiples con tira de pa pel. _____	33
Proteína de Bence-Jones _____	34
Recuento de Addis _____	37
Cultivos de orina _____	39
Análisis de las gonatrofinas co- rónicas <u>humanas</u> _____	42
Técnica para determinar H.G.C. _____	46
 Capítulo II	
Electrolitos	
Antecedentes _____	52
Potasio _____	62
Sodio _____	63
Técnicas para determinarlos _____	64
Magnesio _____	68
Técnica para determinarlo _____	69

Calcio _____	71
Técnica para determinarlo _____	72
Cloro _____	75
Técnica para determinarlo _____	76

Capítulo III

Biometría Hemática	
Antecedentes _____	79
Serie Eritrocítica _____	84
Serie Granulocítica _____	86
Serie Linfocítica _____	90
Serie Monocítica _____	91
Serie Plasmocítica _____	93
Obtención de muestras de sangre _____	95
Anticoagulantes _____	98
La Hemoglobina _____	100
Técnicas _____	102
Material General _____	103
Cianometahemoglobina _____	104
Oxihemoglobina _____	105
Hematocrito _____	107
Cuenta de eritrocitos y leucocitos _____	110
Cuenta Diferencial _____	114
Velocidad de sedimentación globular _____	116
Valores corpusculares de los hematíes _____	119

Capítulo IV

Coagulación Sanguínea	
Antecedentes _____	121
Tiempo de Sangrado _____	127
Tiempo de Coagulación _____	128
Retracción del Coágulo _____	129
Conteo de Plaquetas _____	130

Tiempo de Protrombina _____	132
Tiempo de Trombina Parcial _____	136
Tiempo de Trombina _____	138

Capitulo V

Química Sanguínea

Antecedentes _____	141
Filtrado libre de proteínas _____	167
Procedimientos _____	168
Glucosa _____	170
Urea _____	179
Acido Urico _____	182
Creatinina _____	184
Proteínas totales y fracciones	
A/G _____	186
Seroalbúmina _____	187
Colesterol _____	188
Cefalíncolesterol _____	191
Timol _____	192
Bilirrubinas _____	194
Creatinfosfocinasa _____	196
Transaminasa Glutámico Oxalacética _____	198
Transaminasa Glutámico Pirúvica _____	201
Deshidrogenasa Láctica _____	203
Fosfatasa Alcalina _____	205
Fosfatasa Acida _____	208
Fracción Prostática de la F.A c. _____	210
Amilasa _____	214
Lipasa _____	216

Capitulo VI

Grupos Sanguíneos

Antecedentes _____	218A
Transfusiones _____	218B
Técnica en placa para determinación de Grupo Sanguíneo y Rh _____	221
Prueba de Coombs directo _____	223
Pruebas cruzadas _____	224

Bibliografía General _____	228
----------------------------	-----

INDICE DE LAS ILUSTRACIONES:

Irrigación de la nefrona	11
El sedimento urinario	27 - 32
Gráficas de la H.G.C.	43, 44
La cuba electrolítica	55
Distribución electrolítica	59
Límites del pH en el organismo	60
Serie Hematopoyésis	82
Secuencia de la maduración:	
Del eritrocito	87
Serie granulocítica	89
Serie linfocítica y	
serie monocítica	90
Tipos de leucocitos	92
Sangre normal	94
Estructura de la hemoglobina	101
Placa para lectura del hematocrito	109
Cuadro de Newbauer	111, 112
Pipetas Pasteur y tubos Wintrobe	117
Cascáda de la coagulación	122
Sistemas extrínseco e intrínseco de la	
coagulación sanguínea	124
Mecanismo intracelular de la glucosa	144
Metabolismo de la glucosa en Diabetes ...	145
Ciclo de Cori	147
Metabolismo de las proteínas	149
Ciclo de la Ornitina	150
Coolesterol: estructura, transporte y	
distribución	152
Papel central del hígado	153
Estructura de la Bilirrubina	156
Metabolismo de la Bilirrubina	158
Valores diagnósticos de las determina-	
ciones enzimáticas	162, 163
Curva de tolerancia a la glucosa	177

" MANUAL DE QUIMICA CLINICA PARA EL LABORATORIO
DE A. B. C. I "

PREFACIO

El principal enfoque que se le dá a este trabajo, es la elaboración de un manual, en el que se concentren datos útiles para el estudiante de Análisis Bioquímicos Clínicos I; en el cual, encontrará, una introducción al laboratorio clínico, su trabajo, la importancia general del puesto que tendrá como futuro profesional y la responsabilidad ante él. El laboratorio clínico requiere de una buena administración que implica la correcta coordinación de elementos humanos y materiales con el propósito de lograr un buen funcionamiento para que el trabajo sea preciso, rápido y económico.

En la estructura de un laboratorio, abundan los elementos y formas que lo hacen complejo. Así, podemos encontrar laboratorios particulares (grandes o pequeños), y laboratorios de tipo oficial.

Un laboratorio clínico es el sitio donde se procesan las muestras biológicas (sangre, orina, heces fecales, etc.) que se envían para un estudio clínico específico.

Por ello, deberá tener áreas bien definidas como Microbiología, Química Clínica Y Morfofisiología.

En éste trabajo de tesis se hizo una selección de técnicas de rutina (o mas comunmente utilizadas), tratando de usar reactivos mas económicos y siguiendo procedimientos no muy complicados, aparte de tomar como base al Manual de procedimientos clínicos del I.M.S.S. editado por el Dr. Castelazo, 1974. Esto fué porque por lo general los egresados de la carrera de Q.F.B. pretenden ir a trabajar a los laboratorios de las clínicas del I.M.S.S. y porque la mayoría de las técnicas de rutina en los laboratorios clínicos particulares son tomadas del Manual del I.M.S.S. o son la base de

los procedimientos que ellos utilizan.

En este trabajo se reunirán informaciones didácticas y experimentales para un mejor aprendizaje teórico-práctico en la materia de Análisis Bioquímicos Clínicos I, puesto que va a ser la base fundamental de su trabajo futuro. Se tratará de informar las diversas técnicas, material necesario, preparación de los reactivos, métodos de trabajo y la teoría básica de técnicas y aparatos con los que deberá de irse familiarizando.

Dedico en especial éste trabajo de tesis a mis colegas, los clínicos en ejercicio, con el deseo de facilitarles su trabajo.

Vicky B. Solís, 1985.

OBJETIVO

Uno de los principales problemas que se han presentado en la actualidad para el estudiante de Química Clínica, es el alto costo de libros y la gran cantidad de material publicado en revistas tanto semiespecializadas como especializadas; por lo que es difícil poder llegar a la totalidad de información en el lapso en que éste se encuentre como estudiante; por lo tanto en éste trabajo se trata de dar la información básica para que el alumno pueda efectuar sus prácticas de laboratorio, teniendo al alcance una guía de procedimientos y una buena relación bibliográfica de libros de consulta, revistas especializadas y datos importantes de las técnicas más utilizadas en el laboratorio de A.B.C. I, así como el material que le sea necesario cuando pretenda desarrollar su trabajo.

INTRODUCCION

Este trabajo se puede considerar como un instrumento de utilidad clínica inmediata, al servicio del médico, del especialista, del químico, del técnico y del estudiante. Existen muchos y buenos libros de técnicas de laboratorio para analistas pero carecen del "vademécum" que oriente al clínico en el momento de solicitar un examen complementario y para la lec-

tura e interpretación de los resultados. Tomando en cuenta que con solo los hallazgos de laboratorio no se edifica ningún diagnóstico, ya que se debe analizar en general la sintomatología o cuadro clínico del paciente. Además, según la técnica utilizada, los resultados a veces difieren de forma notable. Y por éste y otros motivos difícilmente son comparables las cifras registradas en el curso de la enfermedad en distintos laboratorios.

Se debe tomar en cuenta las causas de error que provienen de una precipitada idea o interpretación de los hallazgos por parte del clínico.

En primer lugar, porque el médico cree a menudo que los valores normales son cifras exactas, categóricamente hablando, siendo así que aquellas, aunque se refieran a constantes, varían dentro de límites a veces bastante amplios. Y por otra parte, el clínico debe hacer una relación comparativa de todas las posibles causas capaces de originar aquel trastorno bioquímico, serológico o citológico. (Pettra, 1971).

Por ésta razón, el médico debe solicitar en cada caso, aquellos análisis más apropiados para confirmar o rectificar su sospecha diagnóstica. El único medio para establecer un diagnóstico correcto es practicar una exploración del enfermo con un método perfecto. Sólo así -

se puede cubrir adecuadamente las cuatro etapas fundamentales del diagnóstico. Estas son:

ETAPA FUNCIONAL: indagando, ante todo el trastorno funcional;

ETAPA ANATOMICA: localizando el órgano enfermo;

ETAPA PATOGNOMONICA: precisando el mecanismo productor del trastorno; y

ETAPA ETIOLOGICA: al descubrir la causa específica de la enfermedad.

Para ello se emplean métodos de exploración como el interrogatorio, la exploración objetiva del enfermo y las exploraciones complementarias. A los primeros se les considera como fases del método clínico, y las segundas como métodos de análisis fisicoquímicos, aplicados unos directamente al enfermo, y otros a los humores o secreciones.

A éstos últimos se les acostumbra calificar como métodos de laboratorio.

Este examen elemental forma parte de la exploración de base, que se debe practicar a todo enfermo. Como todos los síntomas o signos de exploración, los datos de laboratorio tienen su jerarquía y es preciso situarles en el plano que les corresponde al hacer el razonamiento diagnóstico. Para ello, el médico necesita tener "sentido clínico", cosa que solo se puede adquirir con la expe

riencia propia.

Por eso se suele decir que el diagnóstico es una síntesis plena de sentido; esta síntesis, será tanto más perfecta entre más datos se hayan analizado para llevarla a cabo.

Entre éstos datos, los del laboratorio juegan un papel importante y es necesaria una adecuada ordenación de los mismos para su buena .. aplicación.

Se pretende que éste trabajo de tesis pueda ser de ayuda teórico-práctica para realizar las diversas técnicas rutinarias que se efectúan en un laboratorio clínico, así como para valorar realmente la importancia del trabajo profesional de un Q.F.B.

EXAMEN GENERAL DE ORINA.

EXAMEN GENERAL DE ORINA

Desde 1827 cuando Richard Bright, del Guy's Hospital, introdujo el análisis de orina como parte del examen médico rutinario del paciente, el análisis de orina ha alcanzado un gran desarrollo.

En nuestra época, Thomas Addis desarrolló los métodos cuantitativos para el estudio microscópico del sedimento urinario, que a su juicio era necesario para una valoración correcta de las enfermedades renales. (Kark-Lawrence, 1979).

La orina es un filtrado de plasma sanguíneo que practicamente no contiene proteínas y es producida por los nefrones en el riñón. (Gross,1973)

Las funciones del riñón consisten en:

- 1) Eliminar el exceso de agua del organismo
- 2) Eliminar los productos de desecho del metabolismo (urea, y creatinina).
- 3) Eliminar sustancias extrañas y ciertos medicamentos.
- 4) Retener sustancias necesarias para la fisiología normal (proteínas, aminoácidos y glucosa).
- 5) Regular el equilibrio electrolítico y presión osmótica de los líquidos orgánicos.

La nefrona es la unidad funcional del riñón, siendo sus partes principales el glomérulo renal o de Malpighio y el túbulo; cada riñón contiene más de un millón de nefronas.

El glomérulo renal es un aglomerado de capilares sanguíneos invaginados en el extremo ciego ensanchado del túbulo renal. Salvo a nivel de entrada y salida de vasos sanguíneos, el glomérulo está cubierto por una doble capa, éstas capas forman la cápsula de Bowman.

El túbulo renal varía en tamaño, va de 30 a 40 mm; y esta formado por un túbulo contorneado proximal, asa de Henle y un túbulo contorneado distal. El riñón se irriga por la arteria renal que viene de la aorta. (Harper, 1982).

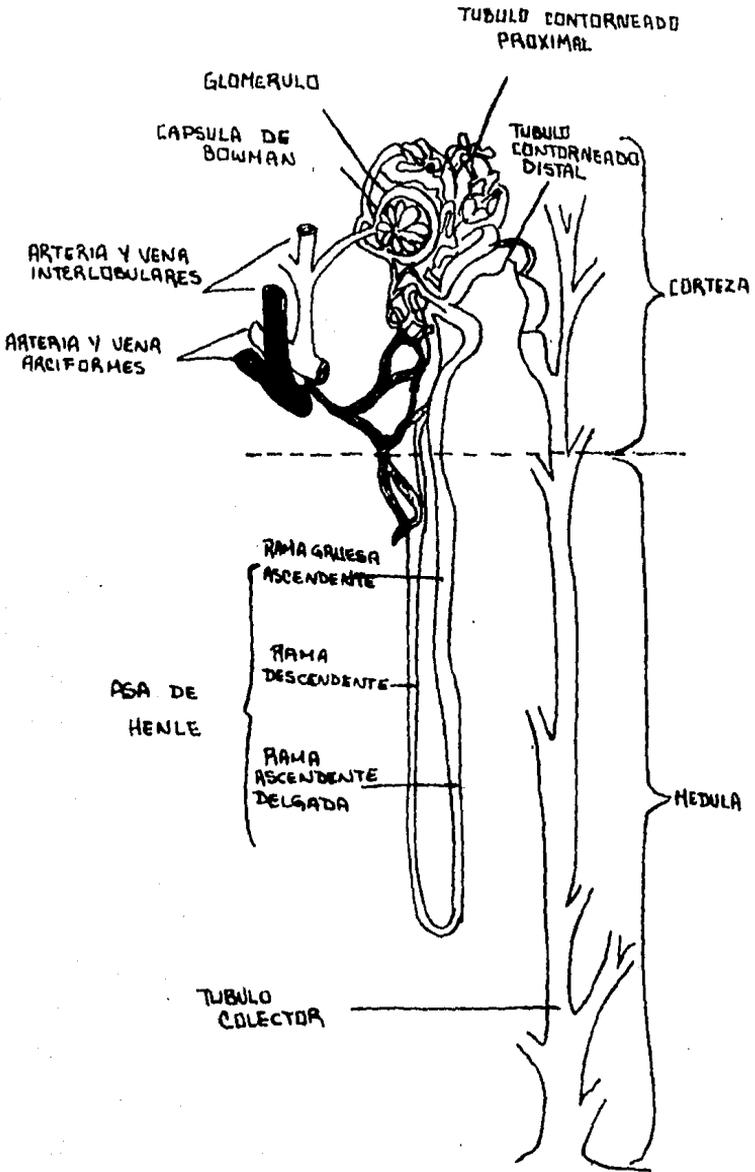
El riñón en el hombre está situado en la región lumbar y detrás del peritoneo; su función principal consiste en regular la composición y el volumen de los líquidos orgánicos. Cada minuto se filtran por los glomérulos 120 cm^3 de líquido plasmático; por ello supone un volumen diario de aproximadamente 170 lt, de los cuales solo 1.5 lt se expulsan en forma de orina; el resto, una vez depurado, es reabsorbido y reintegrado a los compartimientos orgánicos (Leeson, 1978).

El riñón mide 12 cm de longitud y pesa 140 g; se halla rodeado por tejido graso y envuelto por una cápsula celulosofibrosa. En el adulto normal, 1 lt de sangre es filtrado cada minuto por la acción de los dos millones de nefronas de los dos riñones; y se forman 120 ml/ min. de filtrado glomerular en la cápsula de Bowman, por lo tanto la tasa de filtración glomerular en los adultos es alrededor de 120 ml/ min. Desde el punto de vista químico, el filtrado glomerular es, en esencia, un líquido extracelular exento de proteínas. La composición de la orina es diferente de la del filtrado glomerular.

Los glomérulos actúan solamente como filtros y por lo tanto la composición del filtrado glomerular queda determinada únicamente por la permeabilidad de la membrana capilar a los constituyentes de la sangre. Como resultado de esto, el filtrado glomerular contiene muchas sustancias necesarias para el metabolismo normal tales como agua, glucosa, aminoácidos y cloruros, así como sustancias que van a ser excretadas y eliminadas como la urea, la creatinina y el ácido úrico. Más aún, en diversas condiciones la cantidad de sustancias esenciales serán retenidas de acuerdo con la necesidad de mantener la constancia del medio interno.

Esta función altamente selectiva del riñón corre a cargo de los túbulos. Estos modifican el filtrado glomerular por medio de resorción y de secreción, y producen de este modo la orina. (Salvat, 1971; Harper, 1978; Ganong, 1980; Stanley, 1976 Leeson, 1978; Loeb, 1977).

LA IRRIGACION DE LA NEFRONA
(EN LA ZONA EXTERNA DE LA CORTEZA):



(Harper, 1982)

RECOLECCION DE MUESTRAS DE ORINA

Los métodos de recolección de muestras de orina varían según la prueba específica que se quiera realizar.

1) ANALISIS QUIMICO Y MICROSCOPICO DE LA ORINA.- Generalmente para el exámen rutinario de la orina, no hay necesidad de elaborados procedimientos de limpieza. Sin embargo, estas precauciones deben de observarse cuando la orina pudiera contaminarse con alguna descarga vaginal o hemorrágica. A veces puede ser necesario taponar la vagina, pero generalmente es preferible obtener muestras libremente emitidas, según las indicaciones que se mencionan más adelante.

2) EXAMEN BACTERIOLOGICO.-

Las muestras libremente emitidas son adecuadas para el exámen de orina y el cultivo, si se prepara en forma adecuada.

En individuos masculinos esto es fácil, el glande debe ser limpiado con una solución antiséptica suave. La muestra debe recogerse en un recipiente estéril después de que se ha dejado escapar el flujo inicial.

En mujeres debe usarse la siguiente técnica: si el meato urinario o uretral puede ser expuesto ampliamente, y el chorro de la orina es directo emitiéndose con fuerza:

a) Pedir a la paciente que se ponga en cuclillas, sobre una bacinica (meatorio ó pato), con las piernas en posición genopectoral.

b) Con guantes estériles, separar los labios menores para -

exponer el orificio uretral.

c) Con algodón estéril empapado en jabonadura limpiar cada lado del meato; enjuagar con agua.

d) Pedir a la paciente que orine con fuerza, dejando que la porción inicial del chorro caiga en la bacinica, mientras se siguen teniendo los labios separados.

e) Recoger la muestra de la segunda parte de la emisión urinaria en un recipiente estéril, sin tocar ninguna parte del periné con la boca del recipiente.

f) Se deben recoger de 30 a 100 ml de orina, dejar de separar los labios y permitir que la paciente termine de orinar.

NOTA: La cateterización se considera como método innecesario y peligroso, debido a la posibilidad de causar infección del aparato genitourinario y pielonefritis; además de ser traumático para el paciente. (Lynch, 1972).

Mencionábamos al principio que dependiendo de la prueba a efectuar iba a ser la forma determinada de tomar y -- conservar la muestra así como también el procedimiento a -- seguir.

TIPOS DE TOMA DE MUESTRA PARA EL URINÁLISIS.-

a) La primera orina de la mañana. - Generalmente para practicar un examen general de orina, se le pide al paciente -- que recoja en un recipiente perfectamente limpio, la primera orina del día.

(Esto es debido a que la orina es más concentrada)

b) El exámen de orina de 24 horas.-

Esta muestra adecuadamente conservada, proporciona una medida cuantitativa más exacta de la excreción de algunas sustancias como:

glucosa, concentración de hormona gonadotrofina corfónica, proteínas, sin embargo también se les puede determinar en muestras ocasionales de orina.

c) Existen también muestras de 6 0 12 horas utilizadas para la determinación de alguna substancia que interviene en el metabolismo como depuración de creatinina. En estos casos se le informará al paciente el procedimiento que deberá seguir para tomar la muestra.

RECOMENDACIONES:

A) El Exámen General de Orina deberá efectuarse lo más rápido posible, ya que puede ocurrir una contaminación. (No más de 30 minutos).

B) El cultivo bacteriológico de la orina debe hacerse inmediatamente, cuando ésto no es posible, la orina deberá mantenerse refrigerada. (No más de 2 horas).

NOTA: El crecimiento de 10^5 colonias/ml de orina se considera infección del aparato urinario. Bajo estas condiciones estandars el crecimiento de no más de 10^3 colonias/ml de orina, generalmente indica contaminación.

También es posible que haya una infección de importancia cuando puedan observarse bacterias en frotis teñidos

con Gram de sedimento de orina fresca libremente emitida. La combinación de piuria y bacteriuria considerable sugiere claramente el diagnóstico de infección del aparato urinario.

TECNICA PARA EL EXAMEN GENERAL DE ORINA.-

A. FUNDAMENTO.

La orina es un líquido emitido por el conducto uretral, éste es excretado por el riñón en una cantidad entre 1000 y 1500 ml en el caso de los adultos; dependiendo del clima pues influye en el volumen total por día; pues cuando hace frío el adulto orina más veces que cuando hace calor. Algunos padecimientos renales, de las vías urinarias, y extrarrenales modifican la orina en sus características físicas, químicas o en la morfología de las células encontradas en el sedimento urinario.

B. MATERIALES Y EQUIPO.

1) Aparatos

Centrífuga
Densitómetro o Refractómetro de Coulberg
Microscopio Electrico con objetivos 10, 40,
y 100 X
Espectrofotómetro
Tina de agua para hervir (Baño María).

2) Cristalería

Vasos de precipitados
Tubos de ensaye
Pipetas de Pasteur
Pipetas graduadas
Matraces volumétricos

3) Reactivos

- a) Reactivo de Robert
 Sulfato de Magnesio 76 g
 Acido Nítrico 20 ml
 Agua destilada c.b.p. 100 ml
- b) Acido acético al 5%
 Acido acético glacial 50 ml
 Agua destilada c.b.p. 1000 ml
 Mezclar y aforar
- c) Reactivo de ácido sulfosalicílico,
 Acido sulfosalicílico 30 g
 Agua destilada c.b.p. 1000 ml
 Disolver y aforar.
- d) Reactivo de Benedict cualitativo,
 Sulfato de cobre 17.3 g
 Citrato de sodio 173 g
 Carbonato de sodio 100 g
 Agua destilada c.b.p. 1000 ml
 Disolver el citrato y el carbonato por separado, disolver sulfato de cobre, mezclar las dos soluciones y aforar.
- e) Reactivo de Rothera,
 Nitroprusiato de sodio 10 g
 Sulfato de amonio 200 g
 Carbonato de Sodio 200 g
 Mezclar en mortero.
- f) Piramidón al 5 por ciento,
 Alcohol 96% c.b.p. 1000 ml
 Disolver y aforar.
- g) Solución de cloruro de bario al 10%
 Cloruro de bario 10 g
 Agua destilada c.b.p. 100 ml
 Disolver y aforar.
- h) Reactivo de Fouchet,
 Acido Tricloroacético 25 g
 Solución del cloruro férrico al 10% 10 ml
 Agua destilada c.b.p. 100 ml
 Disolver, mezclar y aforar.

- i) Reactivo de Ehrlich,
p-dimetilaminobenzaldehído 2g
Acido clorhídrico, diluído (1:2)
a la mitad con agua destilada
c.b.p. 100 ml
Disolver y conservar a 4 grados centígrados
la solución.

CLASIFICACION DE LAS PRUEBAS EN EL EXAMEN GENERAL DE ORINA:

- 1) Examen físico: Volumen
olor
color
densidad
pH
cantidad de sedimento
Aspecto

- 2) Examen Químico: Proteínas
glucosa
cuerpos cetónicos
sangre
bilirrubinas
urobilinógeno

- 3) Examen microscópico: En el sedimento urinario podemos -
observar microscópicamente: cristales, células, cilindros,
bacterias y cuerpos extraños como algodón, cabellos, etc.

C. METODO.

1. Material biológico:

La primera orina de la mañana en un frasco limpio. Es conveniente aconsejar a la persona que reduzca la ingestión de líquidos en la tarde y noche anteriores al día de la prueba.

2. Técnica:

- a) Volumen
Sólo se mide cuando se junta la orina de 24 horas.
En este caso se usa una probeta de vidrio graduada de 1000 ml.

b) Densidad

Colocar 20 ml de orina en una probeta de plástico, -
introduzca el densímetro ^{im-}
primiéndole un movimiento rápido de rotación. Procure
que el densímetro no toque las paredes del recipien-
te de orina. Examine en qué lugar del densímetro que
da el menisco de la orina.

c) pH

Se humedece un fragmento de papel Phyrion con la -
orina y se compara el color con la escala del equi-
po.

d) Albúmina

Fundamento:

Los ácidos nítricos, sulfosalicílico y tricloroacé-
tico precipitan la albúmina en la orina. Los preci-
pitados formados por los ácidos salicílico y tri-
cloroacético son proporcionales a la cantidad de al-
búmina presente.

Prueba cualitativa

En un tubo de 13 por 100 mm colocar 2 ml de orina y
estratificar 1.0 ml de reactivo de Robert, la apari-
ción de un anillo blanco indica la presencia de al-
búmina.

Prueba cuantitativa

(Con ácido sulfosalicílico)

Colocar en un tubo de ensaye 2.5 ml de orina filtra-
da. Añadir 7.5 de reactivo. Mezclar por inversión.

Dejar reposar durante 5 minutos.

Leer a una longitud de onda de 420 mu. o filtro 445.
Ajustar a 100 por ciento de transmitancia con blan-
co de reactivos (sustituyendo la orina por agua des-
tilada)

Calibración

De un Versatol que contenga 7 g de proteínas en 100
ml tomar 0.5 y diluirlos a 100 ml con agua destila-
da.

TUBO	AGUA DESTILADA ml	ML DE VERSATOL DILUIDO	mg/ 100 ml
1	2.5	0.0	0
2	2.0	0.5	7.0
3	1.5	1.0	14.0
4	1.0	1.5	21.0
5	0.5	2.0	28.0

Proseguir con todos los tubos como se indica en la 18
técnica cualitativa.

e) Glucosa

Fundamento:

La glucosa reduce el cobre de la solución alcalina de Benedict a Oxido cuproso, con formación de un precipitado de color rojo ladrillo.

Prueba cualitativa

Colocar en un tubo de 13 X 100 mm 1.0 ml de reactivo de Benedict.

Añadir dos gotas de orina y mezclar.

Colocar el tubo en baño de agua hirviendo durante dos minutos. Dejar enfriar, la aparición de un precipitado rojo ladrillo indica la presencia de glucosa.

Prueba cuantitativa

En un matríz volumétrico de 100 ml poner 1.0 ml de orina y aforar con agua destilada.

Colocar 2.0 ml de la orina diluida en un tubo de Folin-Wu

En seguida prosiga como para determinar la concentración de glucosa en sangre. (Ver pagina 170)

f) Acetona

Fundamento

El nitroprusiato de sodio en presencia de acetona forma un compuesto color violeta.

Prueba cualitativa

Poner 5 gotas de orina en una placa excavada de porcelana.

Agregar aproximadamente 0.5 g de reactivo de Rothera.

Una coloración violeta indica la presencia de acetona.

Prueba cuantitativa

Hacer las siguientes disoluciones de la orina con agua destilada: 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6.

Practicar la prueba cualitativa con cada una de las disolu-

ciones anteriores. Multiplique el inverso de la última dilución de la prueba cualitativa positiva por 10. El producto son los miligramos por ciento que tiene la orina.

g) Hemoglobina

Fundamento

La hemoglobina y el peróxido de hidrógeno oxidan al piramidón y producen un color violeta.

Prueba

Colocar aproximadamente 5 ml de orina en un tubo de 13 por 100 mm y agitar.

Añadir unas gotas de ácido acético al 5 por ciento.

Añadir 1.0 ml de solución alcohólica de piramidón al 5 por ciento y agitar.

Añadir unas gotas de peróxido de hidrógeno al 13 por ciento la aparición de una coloración azul indica la presencia de hemoglobina.

El resultado positivo se informa en cruces, según la intensidad del color, de una a cuatro cruces.

h) Bilirrubinas

Fundamento

La bilirrubina al ponerse en contacto con el reactivo de -- Fouchet se oxida formando biliverdina de coloración azul -- verde.

Prueba

Colocar 20 ml de orina en un vaso de precipitados de 100 ml
Añadir 10 ml de solución de cloruro de bario al 10 por ciento.

Mezclar y dejar reposar durante cinco minutos.

Filtrar

Añadir unas gotas de reactivo de Fouchet al precipitado

Una coloración azul verde indica la presencia de bilirrubina.

Si el resultado es positivo se informa en cruces según la intensidad del color de una a cuatro cruces.

i) Urobilinógeno

Fundamento

Con el reactivo de p-dimetilaminobenzaldehído, el urobilinógeno dá un compuesto de color rojo, de naturaleza desconocida.

Prueba

Poner de 2 a 5 ml de orina en un tubo de 13 por 100 mm

Añadir 0.5 ml de reactivo de Ehrlich y mezclar.

Dejar reposar de 3 a 5 minutos.

El urobilinógeno normal en orina da un color ligeramente rosado; una cantidad mayor dá un color rojo.

Informar el resultado positivo en cruces, de una a cuatro cruces, según la intensidad del color.

j) Sedimento

Colocar 5 ml de orina en un tubo de 13 por 100 ml, centrifugar a 1 800 r.p.m. durante cinco minutos.

De-cantar la orina, resuspender el sedimento en la gota de orina residual.

Poner una gota del sedimento en un porta-objeto, cubrirla con un cubre-objeto.

Examinar con el microscopio el sedimento y con el objetivo seco fuerte, cuente en número de leucocitos, eritrocitos y cilindros por campo.

3. VALORES NORMALES:

A) Volumen	800 a 1500 ml en 24 horas
B) Densidad	de 1.003 a 1.030 g/ cm ³
C) pH	de seis a siete
D) Albúmina	No hay
E) Glucosa	No hay
F) Cuerpos cetónicos	No hay
G) Hemoglobina	No hay
H) Bilirrubinas	No hay
I) Urobilinógeno	De 0 a 4 mg en 24 horas
J) Sedimento:	

Leucocitos: Menos de 10 por campo, con objetivo seco fuerte.

Eritrocitos: De 0 a 1 por campo, con objetivo seco fuerte.

Cilindros: De 1 a 2 por campo, con objetivo seco fuerte.

Nota:

La cantidad de cilindros de reportan de la siguiente manera:

0-10	+ / por campo observado
10-15	++ / por campo observado
15-20	+++ / por campo observado
20 ó más	++++ / por campo observado

EXAMEN DEL SEDIMENTO URINARIO

(Widman, 1981)

Cilindros en orina	Celulas en orina	Cristales en orina
<p>Los cilindros hialinos proceden de un gel de proteína en el tubulo renal. Estos pueden contener inclusiones celulares y se disuelven rápidamente en orinas alcalinas, el sedimento urinario normal puede contener de 1 a 2 cilindros hialinos por campo.</p>	<p>Las células epiteliales pueden ser de 3 tipos: tubulares de transición o escamosas. Unas cuantas de estas células pueden encontrarse normalmente en el sedimento urinario. Las células tubulares son 1/3 mayores a los leucocitos. Las células de transición que pueden proceder de la pelvis renal o el tracto urinario inferior tienen forma de pera o espiga. Las células escamosas son grandes y planas con un núcleo prominente, proceden de la uretra o de la vejiga.</p>	<p>Los cristales de fosfato triple y los de oxalato calcico son comunes en el sedimento urinario. Los cristales de fosfato triple tienen forma de ataúd, no tienen color y aparecen en la orina alcalina, los cristales de oxalato calcico tienen forma de sobre y aparecen en la orina ácida. Ambos pueden aparecer después de haber ingerido determinados alimentos.</p>
<p>Los cilindros de de generación celular reciben el nombre de granuloso. La desintegración de las células en cilindros durante el tránsito a través del sistema urinario, desemboca en la destrucción de las membranas celulares, fragmentación del núcleo y granulación citoplasmática. De la mayor desintegración resultan primero gránulos</p>	<p>Los glóbulos rojos pueden proceder de cualquier parte del sistema renal, la presencia de un número elevado sugiere infección, trauma tumor o cálculos renales. Sin embargo, la presencia de 1 ó 2 eritrocitos en el sedimento urinario o sangre en la orina debida a una contaminación menstrual., no debe consi</p>	<p>Los cristales de cistina son finos, de estructura hexagonal, aparecen en la orina como resultado de un defecto genético. Pueden aparecer en caso de cistitiuria y homocistitiuria. Los cálculos se forman en un pH ácido, cuando la concentración de cistina excede de 300 mg.</p>

<p>toscas y después - gránulos finos. No hay diferencia clí- nica entre los dos tipos, la distin- ción es subjetiva.</p>	<p>derarse anormal.</p>	
<p>Los cilindros ce- reos son cilindros viejos y son el - resultado de cam- bios degenerati- vos de los cilin- dros granulares. Estos están gene- ralmente asocia- dos con enfermeda- des renales cróni- cas graves, y con amiloidosis renal, su aparición indi- ca nefronas enfer- mas y dilatadas - por enfermedad cró- nica grave.</p>	<p>Los leucocitos en - orina (piuria) pue- den proceder de cu- alquier parte del - sistema renal. La - presencia de más de 1 leucocito por cam- po de sedimento de los hombres, o más de 5 en mujeres o - niños puede indicar infección, cistitis o pielonefritis. Las células brillan- tes son leucocitos polimorfonucleares- que muestran movi- mientos Brownianos en sus granos cito- plasmáticos. Las -- bacterias en orina (bacteriuria) pueden ser causa de una -- contaminación en la toma de muestra, o por infección urina- ria presente.</p>	<p>Los cristales de co- lesterol son placas transparentes muy ra- ras en la orina. Pue- den ser vistos en ca- sos de infecciones - serias del tracto ur- inario, nefritis, - ruptura de vasos lin- fáticos en la pelvis renal, como resulta- do de un bloqueo del drenaje de la linfa en área torácicoabdo- minal.</p>
<p>Los cilindros leuco- citarios o purulen- tos son cúmulos de leucocitos integra- dos en la matriz de un cilindro. Estos indican infección o pielonefritis. Tam- bien pueden encon- trarse enfermedades glomerulares.</p>	<p>Los elementos leva- duriformes no tie- nen color, varían - en tamaño, son ovoí- des y presentan bro- tes. A menudo se -- confunden con hema- tias. La Candida -- albicans se encuen- tra a veces en dia- betes, embarazo, o-</p>	<p>Los cristales de áci- do úrico se encuen- tran en orina ácida. Pueden tomar diversas formas: rombos, pla- cas, rosetas y cris- tales pequeños. Sus colores pueden ser: rojo, amarillo, ma- rrón. Aumentan en pa- cientes con gota.</p>

<p>Los cilindros eritrocitarios son -- patológicos y su presencia indica un daño serio del glomérulo. Es muy raro que ocurran hemorragias trans-tubulares que for-men cilindros leucocitarios. Estos se encuentran en casos de glomerulo nefritis aguda, lupus, endocarditis bacteriana y septicemia. Los cilindros sanguíneos -- son granulares y tienen hemoglobina de glóbulos rojos degenerados.</p>	<p>besidad y otras enfermedades debilitantes. Las Trichomonas vaginalis son protozoos flagelados que infectan a hombres (uretritis) y mujeres (vaginosis)</p>	<p>Su presencia no indica generalmente una situación patológica o concentraciones aumentadas de ácido úrico.</p>
--	---	--

NOTAS:

El tipo de cristal o de sedimento amorfo depende en gran parte de la acidez de la orina.

ORINA ACIDA: Oxalato calcico, ácido úrico y cristales de urato.

ORINA ALCALINA: Cristales de fosfato y carbonato y fosfatos amorfos.

Se pueden encontrar en el sedimento urinario cuerpos extraños como: fibras de algodón, grasas, cabellos, fibras de nylon, gránulos de almidón de trigo y de patata burbujas de aire, fibras musculares, plumas, células de plantas glóbulos de aceite; que en ocasiones pueden confundirse con algun tipo de sedimento patológico en dicha orina.

En la orina de los varones pueden concentrarse espermatozoides después de la eyaculación nocturna.

La anguila del vinagre, larvas de mosca y otros parásitos pueden encontrarse en la orina como resultado del empleo de re cipientes sucios o contaminados.

(Iovine,1979; Gordon, 1976; Freeman, 1974; Gross, 1973; Tood- Sanford, 1978; Kark- Lawrence, 1979).

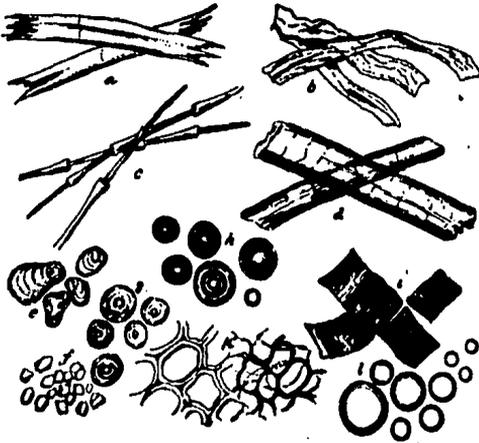
ILUSTRACIONES DEL SEDIMENTO URINARIO (Tood- Sanford, 1978).



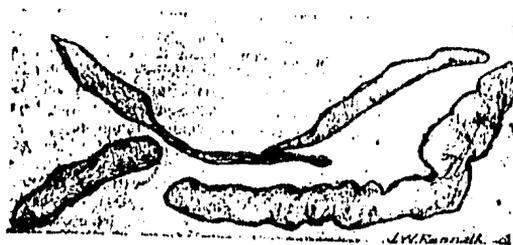
Orina alcalina. A, cristales de fosfato amónico magnésico (fosfato triple); B, urato amónico (marrón); C, fosfato amorfo; D, cristales de fosfato cálcico estrellados (menos corrientes) (x150).



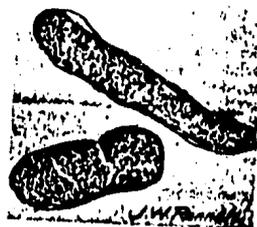
Orina ácida. A, varias formas de cristales de ácido úrico (colorados); B, cristales de oxalato cálcico (también se ven en la orina alcalina); C, uratos amorfos. (x150).



Materia extraña encontrada en la orina: a, fibras de lino; b, fibras de algodón; c, plumas; d, cabello; e, gránulos de almidón de patata; f, gránulos de almidón de arroz; g, gránulos de almidón de trigo; h, burbujas de iris; i, fibras musculares; k, células de plantas; l, glóbulos de aceite.



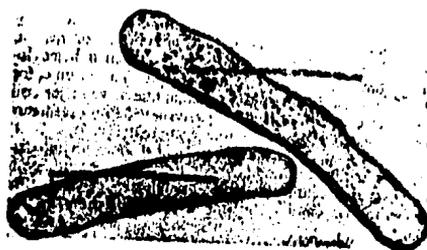
Cilindros hialinos en espiral y fusiformes ($\times 350$).



Cilindros granuloso
toscos ($\times 350$).



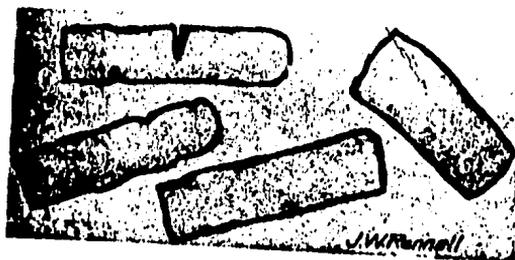
Cilindros granuloso
y grasos, y dos cuerpos grasos
($\times 350$).



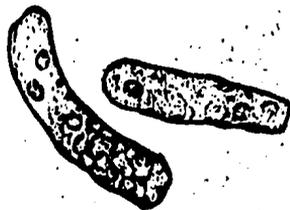
Cilindros granuloso fino ($\times 350$).



Cilindros granuloso, un leucocito
y tres hematocitos ($\times 500$).



Cilindros ceros ($\times 350$).



Cilindros leucocitario
($\times 350$).



Cilindros de hematocitos ($\times 400$).



Cilindro hemático ancho ($\times 400$).

Cilindros hemáticos:
antitubular renales



Cilindro celular mixto
y hemático ($\times 400$).



Cilindros de células epiteliales ($\times 350$).



Seudocilindros
formando cristales ($\times 300$).



Los filamentos mucosos pueden confundirse
con cilindros ($\times 350$).



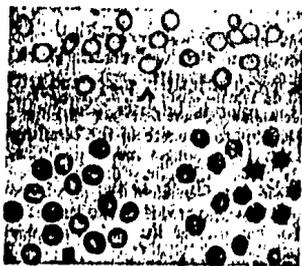
Cúmulo de leucocitos neutrófilos, que
muestra gránulos y algunos núcleos ($\times 500$).



Células epiteliales escamosas, leucocitos
y bacteria. Contaminación vaginal ($\times 300$).



Células epiteliales renales.
Las cuatro células inferiores contienen grasa ($\times 475$).



Hemáticos. A, células «fantasmas»,
B, recientes. C, dentados ($\times 475$).



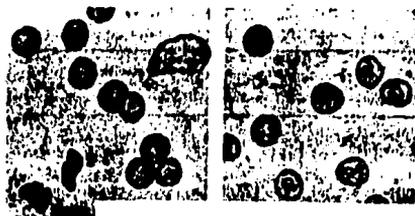
Células epiteliales caudadas
de la pelvis renal (Jakob).



Células epiteliales de transición de la
vejiga. a, planas, de la capa superficial. b, células
más profundas (Jakob).



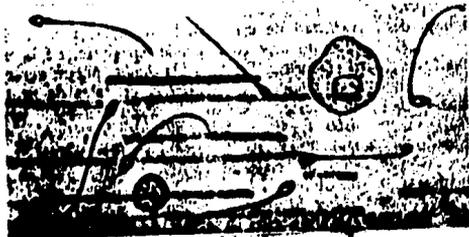
Dos hemáticos y cinco leucocitos po-
limorfonucleares. Burbuja de aire en el ángulo
superior izquierdo ($\times 300$).



A

B

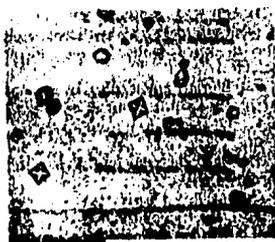
Leucocitos neutrófilos. A, aspecto normal.
B, con ácido acético ($\times 475$).



Espermatozoos, célula epitelial de la vejiga
y leucocito (pequeño) ($\times 475$).



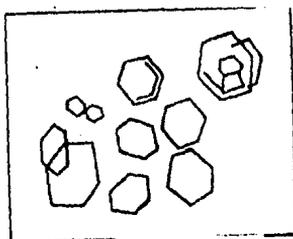
Dos cristales de fosfato amónico magnésico, «fosfato triple», con gránulos amorfos de fosfato ($\times 500$).



Hongos con yemas y cristales de oxalato cálcico ($\times 450$).



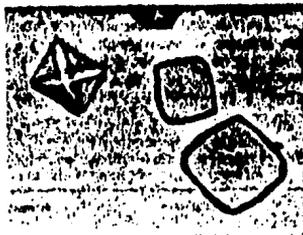
Dos cristales de cistina, hexagonales, con un cristal pequeño de oxalato cálcico ($\times 500$).



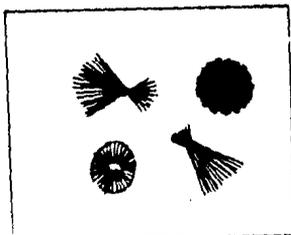
Cristales de cistina: placas hexagonales, incoloras.



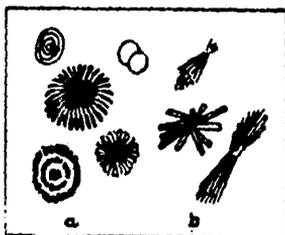
Dos cristales de ácido úrico, uno grande y poliestratificado ($\times 900$).



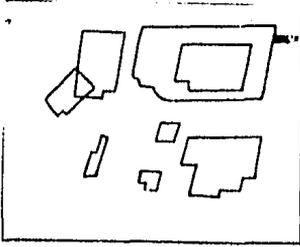
Dos cristales de ácido úrico, de cuatro lados y un cristal de oxalato cálcico ($\times 500$).



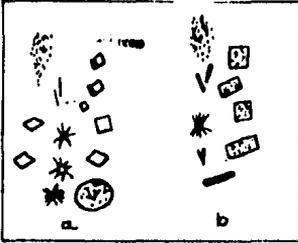
Cristales de sulfadiazina (redondo) y de acetilsulfadiazina (haza).



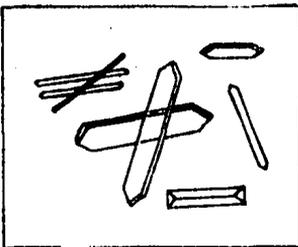
a, esferas de leucina; b, agujas de tirocina.



Cristales de colesterol;
placas planas, con muescos.



a, Bilirrubina (marrón, formas amorfas, agujas y placas de cuatro lados, ocasionalmente intracelular); b, indigotina (azul, formas amorfas, agujas y placas de cuatro lados).



Prismas del ácido hipúrico.

PRUEBAS MULTIPLES CON TIRA DE PAPEL.-

A. Fundamento:

1. pH. La mezcla de los colorantes de rojo metilo y bromotimol azul, permite obtener pH de 5 a 9 con coloraciones que varían del amarillo al verde y azul.

2. Proteínas. El indicador de tetrabromofenol azul tiene coloración amarilla que en presencia de proteínas cambia de verde amarillento a azul verde.

3. Glucosa. La glucosa oxidasa reacciona con la glucosa -- presente en la orina con eliminación de dos átomos de hidrógeno, los que se combinan con el oxígeno atmosférico y forman peróxido de hidrógeno, el que en presencia de la peroxidasa o oxida la ortotoluidina, que pasa de incolora a coloración azul, proporcional a la cantidad de glucosa presente.

4. Acetona. El ácido acético con nitropusiato de sodio y en presencia de ácido aminoacético forma un complejo colorido.

5. Hemoglobina. La hemoglobina de la sangre catalíticamente desdobra el peróxido de hidrógeno con liberaciones de oxígeno, el cual oxida a la ortotoluidina, con formación de coloración azul.

B. Reactivos:

TEST- TIRAS REACTIVAS PARA URINALISIS

Tira de papel imregnada con reactivos.

C. Material Biológico:

Orina.

D. Técnica:

Seguir las instrucciones del fabricante.

E. Bibliografía:

Frankel. S.: Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis

Saint Louis, C.V. Mosby 1963 vol. 2 página 1803.

Kark R., Lawrence. J: Pollak, V.: Pirani, C.: Muehrcke R., y

Silvia H.: Manual práctico de urianálisis, México, La prensa -
Médica Mexicana.

Lippman, R. : Urine and The urinary sediement, Springfield, -
Charles C. Thomas.

PROTEINA DE BENGE-JONES

A. Fundamento:

La prueba se basa en las diferencias de solubilidad a ciertas concentraciones de sal, entre las proteínas de mieloma y - las proteínas de la orina de pacientes con enfermedades renales sin mieloma.

B. Material y Equipo:

1.- Cristalería:

Matraces Volumétricos 1000 ml
Pipetas graduadas
Termómetro
Tubos de Ensaye

2.- Aparatos:

Espectrofotómetro.

3.- Reactivos:

a) Solución 3.6 molar equimolecular de fosfatos mono y -
dipotásico.

Fosfato monopotásico KH_2PO_4	245 g
Fosfato dipotásico K_2HPO_4	315.6 g

Disuélvase y afore con agua destilada a 1000 ml, fíltrese y a través de papel Whatmann número 42.

b) Control:

pH: 1.0 ml diluido a 35 ml con agua destilada debe tener un pH de 6.8 ± 0.01

Densidad: de acuerdo a la relación $d = \text{masa} / \text{volumen}$

Pese 20 ml, de la solución en un vaso de precipitado, y en el mismo vaso vuelva a pesar 20 ml de agua destilada.

Debe tener densidad de $1.376 \pm 0.003 \text{ g/cm}^3$

Solución de fosfatos monosódico y disódico:

Fosfato monosódico NaH_2PO_4 , 0.007 M.

Fosfato disódico Na_2HPO_4 , 0.01 M

pH = 6.0 con fuerza iónica de 0.1 de la solución.

C. METODO

1. Material Biológico:

3 ml de orina centrifugada.

2. Técnica:

a) De la prueba de salación:

Tubo Número	1	2
Sol. de fosfato de Potasio (ml)	14	18
Agua destilada (ml)	4	1
Orina (ml)	2	1
Vol. total (ml)	20	20
Conc. de Sal % de saturación	70	90
Conc. de orina %	10	5

Use celdillas de 19 por 150 mm Coleman.

Mezcle por inversión cuidadosamente cuatro veces.

La prueba debe hacerse dentro de los primeros 30 minutos y es positiva cuando la precipitación en el tubo 1 es mayor -- que el tubo 2. En caso de duda puede leerse en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 μ .

Ajustar el 100 por ciento de transmitancia con el tubo 2.

b) De la prueba de floculación con el calor, poner partes iguales de orina y solución de fosfatos, mono disódico, habitualmente 2 ml de cada uno en dos tubos de 13 por 100 mm.

Calentar hasta que uno de los tubos en baño de agua hasta que alcance la temperatura de 55°C.

La temperatura se mide con un termómetro que se coloca -- dentro del tubo.

Después subir la temperatura lentamente hasta 65°C

Si aparece la floculación a ésta ó más baja temperatura, -- la prueba es positiva para la proteína de Bence- Jones.

Es conveniente repetir las pruebas varias veces en el -- curso de la enfermedad, para demostrar la presencia de la proteína de Bence-Jones.

c) De la prueba de precipitación con ácido p-Toluen sulfónico.

Reactivos:

Acido p-Toluen sulfónico al 12 por ciento en ácido acético.

Procedimiento:

Poner 1.0 ml de ácido p-Toluen sulfónico al 12 por ciento en un tubo de 12 por 75 mm. Con una pipeta, cuya punta esté pegada a la pared interior del tubo, deje escapar lentamente 2 ml de orina perfectamente transparente. Al final mezcle el contenido con movimientos de balanceo, provocados por suaves golpes en el tubo con un dedo. Incube a 20°C durante cinco minutos.

Cualquier turbiedad que aparezca entre cero y cinco minutos debe considerarse como prueba positiva.

3. Valores Normales:

No hay proteínas en Bence-Jones.

D. BIBLIOGRAFIA:

Effersoe, P., y Tidström B.: Detection of myeloma protein in urine by a New Quick method J. Lab. Clin. Med. 1957.

RECUESTO DE ADDIS

Es un método de enumeración cuantitativa de los hematíes, leucocitos y cilindros en una muestra de orina de 12 horas, - (Addis, 1948). El valor principal del recuento de Addis consiste en que permite seguir el proceso de una enfermedad renal conocida, por ejemplo la glomerulonefritis aguda.

Método.-

Recojase una muestra de orina de exactamente 12 horas.

Es aconsejable una muestra concentrada con un pH bajo que

se obtiene más fácilmente recogiendo la orina de la noche cuando el paciente no come ni bebe (se debe tener cuidado de no contaminar la muestra).

La formalina es el elemento conservador de elección para células y cilindros; también inhibe el crecimiento bacteriano. Se introduce una cantidad suficiente de formalina con solo enjuagar el frasco de la recogida con una solución de formaldehído en agua al 10% desechando el exceso. La muestra deberá examinarse lo más pronto posible después de la recogida.

METODO:

1) Mezclar bien la muestra y medir su volumen cuidadosamente.
2) Deberá realizarse un examen microscópico preliminar del sedimento urinario con una concentración de 10 l del sedimento. Basándose en los resultados de éste examen, puede determinarse el volumen en que se volverá a suspender el sedimento en el siguiente paso 5.

3) Pasar 10 ml de orina a la centrifuga graduada especial de - Addis y centrifugar durante 5 minutos a 2000 r.p.m..

4) Quitar la orina sobrenadante y guardarla para la determinación de proteínas. Ajustar el volumen del resto a 1 ml; cuando la cantidad de sedimento es grande ajustar el volumen a 2 o 5 ml y ajustar adecuadamente los cálculos.

5) Mezclar bien para volver a suspender el sedimento y con una pipeta capilar montar el sedimento resuspendido sobre los dos lados de las dos cámaras de recuento de Levy-Hausser, con el rayado perfeccionado de Neubauer. (Lugar donde se cuentan los G.B.).

6) A pequeño aumento, contar el número de cilindros en las cuatro áreas rayadas ($4 \times 9 = 36 \text{ mm}^2$), a ambos lados de las áreas de dos cámaras de recuento. Con el objetivo de gran aumento, contar los hematies, los leucocitos y las células epiteliales en 4 mm^2 (habitualmente 1 mm^2 de cada lado de cada cámara). No se cuentan las células escamosas epiteliales.

Pueden registrarse el número de células y cilindros excretados en 12 o 24 horas. Este número se determina de la manera siguiente:

$$\text{Número contado por } \text{mm}^2 \times 1/10 = \text{Número/mm}^2 \text{ corregido para la concentración de Hb}$$

Número/mm² X 1 mm/0.1 mm = Número/mm³ X 1.000 = Número/ml

Número/ml X 12 hrs en ml = Número/12 hrs.

INTERPRETACION:

Valores Normales:

<u>Hematies</u>	0 a 500.000 en 12 hrs
<u>Leucocitos no</u>	0 a 1000.000 en 12 hrs
<u>escamosos</u>	
<u>Cilindros</u>	0 a 5000 cilindros hia linos en 12 hrs.

* En niños el número de eritrocitos y leucocitos puede ser menor y el número de cilindros mayor. (Lyttle, 1933).

Addis ha dado los siguientes promedios de recuento en 12 hrs, en casos de glomerulonefritis:

	<u>Cilindros</u>	<u>Hematies</u>	<u>Leucocitos</u>
Aguda	690.000	405.000.000	48.000.000
Crónica activa	1850.000	34.000.000	14.000.000
Crónica latente	48.000	16.000.000	2.400.000
Crónica terminal	398.000	26.400.000	10.000.000

Addis, T. 1948. Glomerular Nephritis New York. The Macmillan Company.

CULTIVOS DE ORINA

Los organismos que pueden encontrarse en la orina incluyen: Escherichia coli, Proteus, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, enterococos, Mycobacterium tuberculosis, Salmonella sp., Serratia, Herella, Klebsiella y Enterobacter.

A su paso por la uretra, la orina puede contaminarse con ciertas bacterias especialmente con E. coli y estafilococos. Es más probable que ocurra esto en la mujer, por eso es importante el método de recogida de la orina, para un cultivo es necesario saber como se recogió para interpretar los resultados.

Una vez recogida la muestra no debe pasar más de una hora para el comienzo del cultivo.

Los preservadores pueden ser de gran utilidad. El ácido bórico o la solución de NaCl-polivinilpirrolidona (PVP) resultan efectivos en la prevención del desarrollo excesivo de saprofitos en la orina cuando el cultivo no se realice en menos de una hora. Deberían utilizarse medios de cultivo para organismos gram negativos ya que ambos se encuentran en la orina.

Es necesario efectuar como mínimo una inoculación de una parte de la orina en una placa de agar-sangre, así como en una placa de eosina y azul de metileno o en otro medio específicamente selectivo para bacterias gram negativas.

También puede incluirse una placa de agar-sangre con alcohol feniletílico o agar ANC Columbia (ácido nalidixico-colimicina), los cuales son selectivos para bacterias gram positivas. El cultivo cuantitativo de la orina puede verificarse muy bien con un asa estandar de 0.01 ml.

METODO:

Colocar una gota pequeña de solución salina en el centro de una placa de agar-sangre. El agar DECL (deficiente de electrolito cistina-lactosa) resulta excelente para éste propósito, puesto que inhibe la multiplicación de *Proteus* y permite una buena diferenciación de las colonias.

Transládese 0.01 ml de orina a la gota de solución salina (ésta orina no debe de centrifugarse).

Mediante un alambre curvo de aproximadamente 1.25 cm del extremo, ha de repetirse el inóculo por toda la placa; el número de colonias que se logren desarrollar se multiplica por 100 y se reporta en: Número de colonias/ml de orina.

En la práctica ha resultado conveniente hacer una dilución 1:10 de la orina, añadiendo 0.1 ml de orina a 0.9 ml de solución salina y distribuir 0.01 ml de ésta dilución en una segunda placa, con esto, se hace mejor la estimación de las muestras de orina que tengan grandes cantidades de bacterias. Aquí el resultado se multiplica por 100.

* Kass y otros colaboradores han demostrado que generalmente menos de 10.000 bacterias/ml de orina son una cifra insignificante, y más de 100.000 indican una infección del aparato urinario.

** Las cifras entre estas cantidades se consideran, según el tipo de organismo y el cuadro clínico del paciente. La mera cuantificación no es suficiente, también es importante el tipo de organismo, para ello se deberá trabajar un diagnóstico bacteriológico clínico.

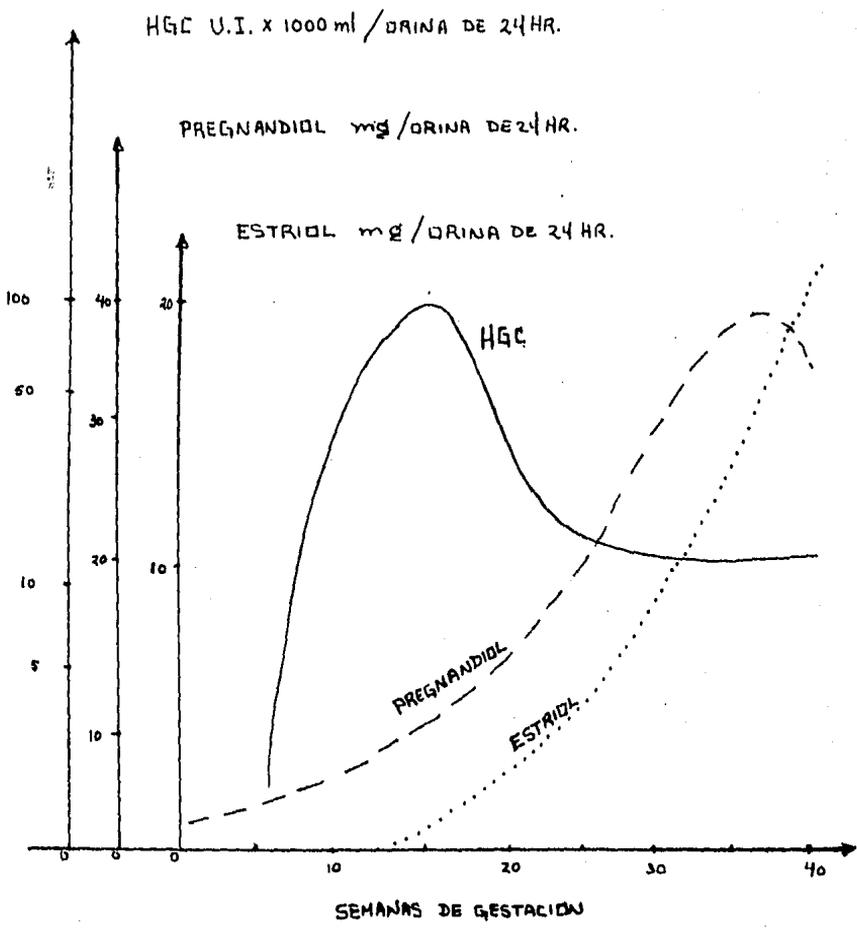
ANALISIS DE LAS GONADOTROPINAS CORIONICAS

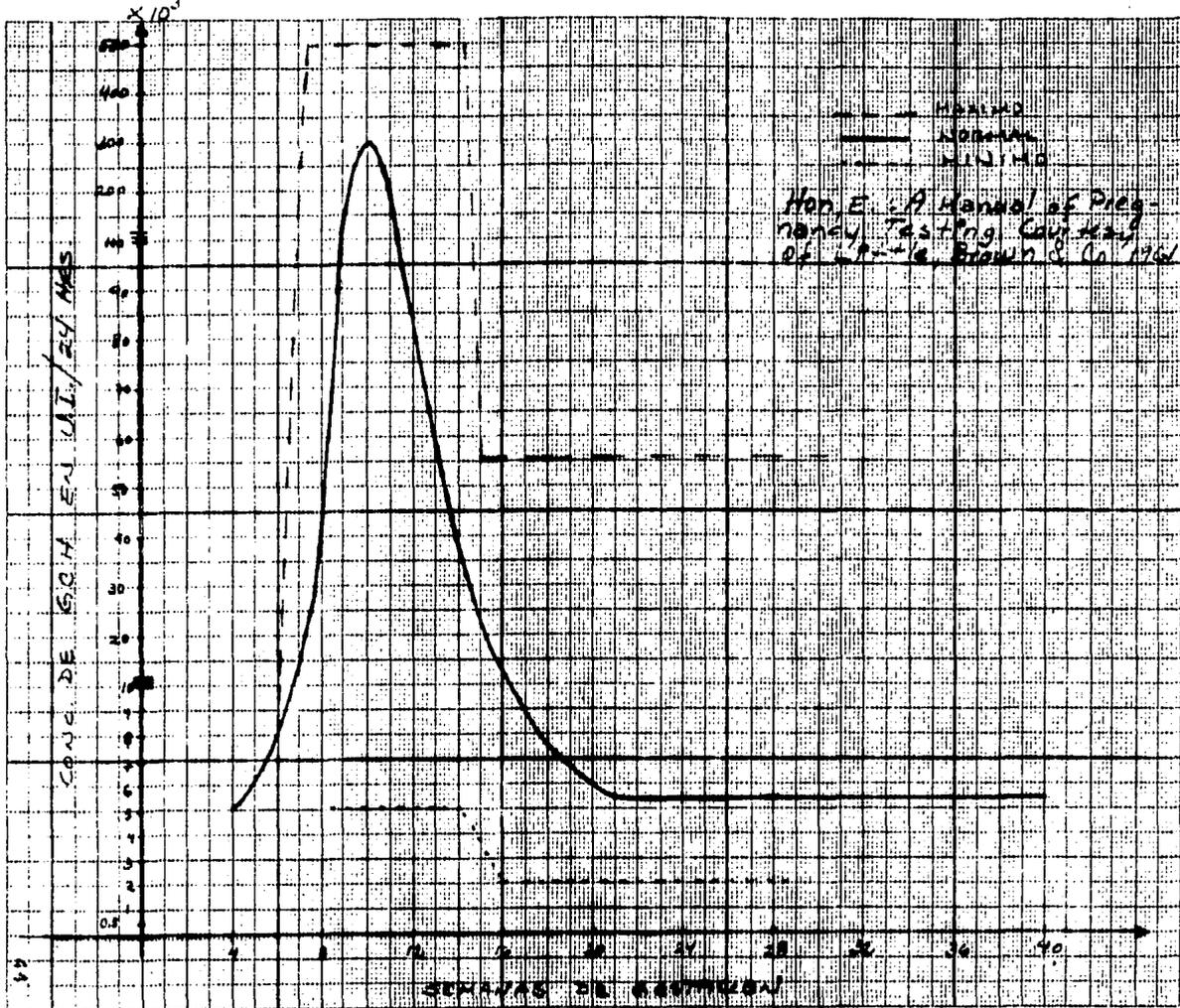
El término prueba de embarazo es de hecho un término erróneo, ya que la mayoría de estos procedimientos lo que miden es la presencia de gonadotropina coriónica humana (HCG) y no la de un feto.

La HCG es una glucoproteína producida por las células trofoblásticas después de aproximadamente 10 días de la concepción (Wide, 1969). La HCG es un dímero de peso molecular aproximado de 28,000, compuesto de subunidades alfa y beta (Bahl, 1972), (Morgan y Canfield, 1971). Las subunidades alfa no son específicas, siendo compartidas con las de la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del tiroides (TSH) y la hormona estimulante del folículo (FSH). Las subunidades Beta son únicas en la HCG.

Después de la concepción, se produce un rápido aumento en la cantidad de HCG en la orina aproximadamente a las 5 semanas de gestación (5 semanas después del último periodo menstrual), que alcanza los niveles máximos en un tiempo aproximado de 10 semanas de gestación.

En la gráfica se puede observar la relación existente entre la HCG, pregnandiol y estriol en la orina durante el embarazo.





Hon. E. A. Manual of Preg-
 nancy Testing, Copyright
 of W. B. Saunders Co. 1951

Las semanas de gestación se refieren a las semanas transcurridas después del último periodo menstrual más que a las semanas después de la concepción, ya que esta fecha es más difícil de determinar. A medida que la producción de estrógeno y progesterona por la placenta aumenta durante el segundo trimestre, los niveles de HCG descienden. Este nivel constituye la medida más lógica para la pronta confirmación de un embarazo; por el contrario, el estriol es más útil para la elevación de problemas del feto durante el tercer trimestre.

El diagnóstico rápido del embarazo puede establecerse generalmente con razonable exactitud, a través de un cuidadoso historial y exámen físico realizado dos semanas después de la primera falta, por ejemplo a las seis semanas de gestación.

Durante las primeras etapas del embarazo, las pruebas más sensibles para la HCG (1 UI/ml) resultan positivas aproximadamente una semana después de la primera falta. Las pruebas menos sensibles (5 UI/ml) resultan típicamente positivas cerca de 3 a 5 días más tarde.

Durante el primer trimestre, la prueba cuantitativa de HCG puede ser útil como guía para el pronóstico de un posible aborto.

DETERMINACION DE LA HORMONA GONADOTROFINA CORIONICA

(Técnica inmunológica)

A. Fundamento:

La prueba está basada en el principio de inhibición de la - 46

hemoaglutinación.

Los eritrocitos cubiertos con gonadotrofina coriónica humana se precipitan en presencia de un antisuero y forman una capa uniforme en el fondo del tubo de ensaye.

Cuando a éste sistema se agrega un líquido que contiene gonadotrofina coriónica, por ejemplo, la orina de una mujer embarazada, esta gonadotrofina inhibe la reacción anterior y se forma en el fondo del tubo un anillo de eritrocitos.

B. Material y Equipo:

1. Reactivos:

Equipo prognóstico "Al-in" para determinar gonadotrofina coriónica por el método de inhibición de la hemoaglutinación. Con otro tipo de equipo deben seguirse las instrucciones del fabricante.

Agua destilada.

2. Material y Equipo:

Pipetas graduadas de 1 a 5 ml.

Tubos de ensaye de 13 por 100 mm.

Gradillas.

C. Método.

1. Material Biológico:

La primera orina de la mañana. Es conveniente recomendar a la paciente que disminuya la ingestión de líquidos en la tarde y la noche anteriores a la prueba y hacer que - desheche la micción de las 22 horas de la noche anterior.

2. Técnica (cualitativa)

- a) Colocar 5 ml de orina en un tubo de ensaye y centrifugar 10 minutos a 2500 r.p.m.
- b) En la gradilla especial que se proporciona con los equipos colocar una ámpula que contiene el antisuero liofilizado y los glóbulos rojos liofilizados, agregar 0.1 de la orina.
- c) Adicionar 0.4 ml de agua destilada.
- d) Agitar la gradilla con movimientos de rotación durante un minuto y dejarla en reposo durante dos horas.
- e) Leer a las dos horas.
- f) Interpretación del resultado.
 Ausencia de anillo = reacción negativa.
 Presencia de anillo = reacción positiva.

Técnica (cuantitativa):

- a) Se hacen una serie de diluciones con agua destilada y con la orina por titular. Dichas diluciones pueden ser por ejemplo: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, etc., o bien: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, etc.
- b) De cada una de dichas diluciones, se coloca 0.1 ml en la ámpula con antisuero y glóbulos rojos liofilizados y se acondicionan a cada ampollita 0.4 ml de agua destilada.
- c) Se hace la lectura de las dos horas. La última dilución de la serie en la que aún se forma claramente el anillo, dará la cantidad de gonadotrofina presente en la muestra de orina. La concentración de gonadotrofina coriónica en UI/l, -

se calcula al multiplicar la sensibilidad de los reactivos - por la última dilución en que se formó el anillo. Por ejemplo:

Sensibilidad de los reactivos: 1500 UI/lt
Resultado positivo hasta la dilución 1:64
1500 X 64 = 96000 UI/lt

3. Valores Normales:

0 - 4	semanas de gestación	=	6000 - 8000	UCG
8 - 12	" " "	=	300000 - 400000	UCG
16 - 20	" " "	=	4000 - 5000	UCG (UI/lt) permaneciendo constante hasta las cuarenta semanas de gestación.

BIBLIOGRAFIA.-

Instructivo clínico Merck.
DETERMINATION OF
UCG SLIDE TEST.-

(PRUEBA DE LATEX EN PORTAOBJETOS)

Para el diagnóstico precoz del embarazo.-

A. Fundamento:

Determinación de la presencia de HCG en la orina de las mujeres embarazadas mediante un procedimiento inmunológico. Es un método rápido (dos minutos) y ya que puede detectar - hasta 2 UI de HCG/ml de orina, permite el diagnóstico del - embarazo hacia el quinto día de la fecha esperada de menstruación.

La prueba se basa en el principio de la inhibición de - la aglutinación hemática. En presencia del antisuero HCG, el

látex recubierto con HCG, deberá aglutinarse. Cuando la gona-
dotrofina coriónica de la orina de mujeres embarazadas se a-
diciona a éste sistema, la HCG se combinará con el antisuero
y evitará que el látex recubierto reaccione con el anticuer-
po, inhibiendo su aglutinación. Por lo tanto, la ausencia de
aglutinación deberá considerarse como una prueba positiva de
embarazo.

La orina que carece de HCG, no se combinará y, por lo -
tanto no neutralizará al antisuero, lo que dará por consecuen-
cia una aglutinación del látex. Por lo mismo, la presencia
de aglutinación será indicativa de una prueba negativa del -
embarazo.

B. Material y Equipo.-

Frasco gotero con 1.5 ml de reactivo antisuero
(suero antigonadotropina coriónica humana, de conejo; con-
servador: azida de sodio al 0.1%)
Frasco gotero con 1.5 ml de látex antígeno (suspensión de
partículas de látex recubiertas con gonadotropina corióni-
ca humana; conservador: azida de sodio al 0.1%)
Pipetas desechables y bulbos de hule
Mezcladores de madera desechables
portaobjetos de vidrio (fondo negro)

C. Método

Nota: Los reactivos y la orina deben estar a la temperatura
ambiente antes de usarlos.

1. Empleando una de las pipetas desechables depositar una -
gota de orina en el centro de un círculo del portaobjetos.
2. Agregue una gota del reactivo antisuero.

3. Agregue una gota de látex antígeno.
4. Con un mezclador desechable, mezcle y extienda las sustancias, abarcando toda el área circunscrita.
5. Balancee suave y lentamente durante dos minutos el portaobjetos en forma circular , y observe si se presenta la aglutinación o no.

Interpretación de los resultados:

Prueba negativa: Presencia de aglutinación.

Prueba positiva: Ausencia de aglutinación.

D. Medidas de seguridad.-

Los reactivos deben conservarse a temperatura de refrigeración de 2 a 8°C.

Para leer la reacción deberá tenerse una fuente luminosa sobre el portaobjetos.

No deberá usarse suero en vez de orina.

Después de adicionar el látex antígeno, no deberá pasar más de dos minutos, ya que la evaporación de los reactivos puede dar lugar a falsas lecturas.

Nunca se deberá alterar el orden estipulado de los reactivos.

E. Bibliografía.-

Instructivo UCG Slide-Test
Carter Wallace, S.A. Prol. Ingenieros Militares # 76
México 17, D.F.

ELECTROLYTES

DISTRIBUCION DE LIQUIDOS Y ELECTROLITOS

La vida sería imposible sin los líquidos orgánicos; el agua es el principal constituyente del cuerpo humano, en el adulto el total de líquidos del organismo constituye un promedio alrededor de: el 60% en el hombre , el 50% en la mujer , y el 80% (en el recién nacido) de su peso corporal total. Es importante mencionar que el contenido de agua en el organismo depende directamente de la edad , el sexo y el peso de cada individuo.

Los líquidos del organismo tienen principalmente dos funciones:

- 1) Transportar los elementos nutritivos hacia las células, llevándose después los productos de deshecho.
- 2) Proveer un medio propicio para las reacciones químicas.

El agua corporal está contenida dentro de compartimientos , los cuales están separados por membranas semipermeables. Estos compartimientos son:

- a) Agua Intracelular (agua dentro de las células)
- b) Agua extracelular (agua fuera de las células)
 - b.1 Agua intravascular (agua en el interior de los vasos sanguíneos)
 - b.2 Agua intersticial (agua en los tejidos entre las células y los espacios vasculares).

El siguiente cuadro nos muestra el porcentaje relativo en éstos compartimientos en función de la edad y el sexo. Nótese que aunque el lactante posee más agua corporal que el adulto.-

la mayor parte de éstas se encuentran en el compartimiento extracelular, el cual es aproximadamente mayor que el compartimiento extracelular del adulto.

El hueso posee 5% del peso corporal en agua y los compartimientos transcelulares como el líquido cefalorraquídeo, líquido intraocular, espacio pleural, peritoneal y aparato digestivo representan otro 3% del peso corporal y 7% del peso del cuerpo es volúmen sanguíneo, del cual corresponden 2% a la masa de eritrocitos y de 4-5% al plasma.

	HOMBRE ADULTO % DEL PESO DEL CUERPO	MUJER ADULTA % DEL PESO DEL CUERPO	LACTANTE % DEL PESO DEL CUERPO
TOTAL DE AGUA EN EL CUERPO	60 ± 15	50 ± 15	80
AGUA INTRACELU- LAR	45	40	50
AGUA EXTRACELU- LAR	15 - 20	15 - 20	30
AGUA INTERSTI- CIAL	11 - 15	11 - 15	30
AGUA INTRAVAS- CULAR	4 - 5	4 - 5	5

El cuerpo pierde agua através de la piel, de los humores, de los riñones y del aparato digestivo. Las pérdidas normales son obligatorias, ya que son necesarias para la función normal del cuerpo.

Estas pérdidas pueden subdividirse en:

Insensibles: (no visibles) que representan alrededor de 1000 ml/día, perdiéndose de 500 a 700 ml a través de la evaporación cutánea nsensible en la regulación térmica del cuerpo y 200 ml debido a la hume-

dad del aire respirado proveniente de los pulmones.

Sensibles: (visibles) que representan alrededor de 1200 ml/día, el gasto urinario promedio en el adulto normal es de 1000 a 1200 ml/día. La pérdida excesiva de agua en los individuos puede ser grave, puesto que desciende su contenido total de líquido del organismo; ocasionando un desequilibrio homeostático. (Homeostasis: es la relativa estabilidad del medio interno; variable dentro de ciertos límites). A éste tipo de pérdidas se les llama adicionales; estas no son esenciales para la función del cuerpo, y pueden ser sudación, vómitos, diarreas, los cuales pueden causar alteraciones patológicas (como por ejemplo la deshidratación).

Algunos síntomas que presenta un paciente con problemas de falta de líquido en el organismo pueden ser: letárgos, mucosas secas y aumento de temperatura. Las necesidades diarias de agua en base al peso corporal son:

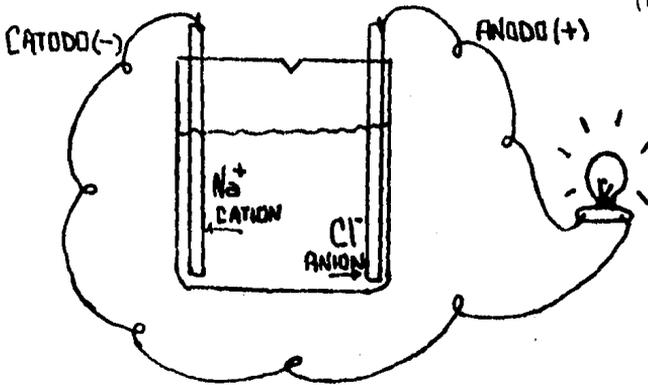
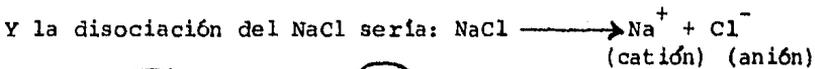
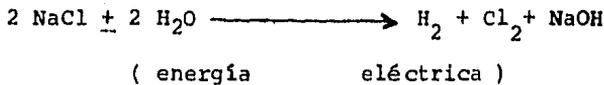
	Peso	Necesidad
Lactante	2 - 10 kg	150 100 ml/kg/día
Niño	10 - 40 kg	100 45 ml/kg/día
Adulto	40 ó más	40 35 ml/kg/día

Los líquidos orgánicos se hallan formados por agua y las sustancias en ella disueltas. Cuando se disuelve una sustancia y algunas de sus moléculas se disocian en sus iones de acuerdo

a su carga eléctrica o valencia, a dicha sustancia se le dá el nombre de Electrolito.

Este tipo de sustancias tienen la capacidad de conducir la electricidad produciendo la reacción electroquímica llamada Electrólisis.

Por ejemplo: Si se usa una cuba electrostática podría comprobarse éste tipo de reacción: colocando una solución de cloruro de sodio en agua, dentro de un vaso de precipitados; y le integramos dos polos o electrodos (uno positivo llamado ánodo y otro negativo llamado cátodo) conectados por medio de cables a un soquet con foco, notaríamos que en el momento en que los iones positivos del sodio y los iones negativos del cloro se unieran a los diferentes electrodos la reacción empezaría y como consecuencia el foco se encenderá. La reacción efectuada se ría:



Cuando sustancias electrolíticas como NaCl y KCl se disuelven, ellas se disocian en iones Na^+ , K^+ y Cl^- . Las moléculas de agua se orientan alrededor de estos iones impidiendo la unión de las partículas con carga + y - en moléculas neutras. En esta forma los iones son mantenidos en solución y permanecen activamente cargados.

Para estudiar los líquidos orgánicos debemos disponer de unidades adecuadas, para medir volumen utilizaremos litros o mililitros y $1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3$ por lo tanto puede decirse que $1 \text{ lt} = 1000 \text{ cm}^3$

Es necesario disponer de una medida para los diversos electrolitos de los líquidos orgánicos. Como lo que nos interesa es la acción de los electrolitos (o su capacidad para combinarse y formar otros compuestos), esta unidad de medición debe expresar su capacidad de combinación o actividad química.

Esta capacidad es una función del número de iones; el peso de un ión no guarda relación con su actividad química.

La medición de electrolitos en unidades de peso tales como mg % o mg/100 ml no nos expresa la capacidad de combinación pues nosotros queremos saber cuantos iones pueden interactuar en las reacciones químicas (Número cationes = Número Aniones).

Para ello, la unidad de medición que expresa esto son los miliequivalentes (mEq). Un peso equivalente es la cantidad de un electrolito que desplazará o reaccionará con una cantidad dada de Hidrógeno (se utiliza el H como punto de referencia en

la medición).

"1 mEq de cualquier catión reaccionará siempre químicamente con 1mEq de un anión" relación 1:1

Por ejemplo: En el organismo encontramos que tenemos 140 mEq de Sodio por litro de sangre y 104 mEq de Cloro por litro de sangre; por lo que después de combinarse el sodio con el cloro aún tendremos 36 mEq libres de sodio que pueden combininarse con otros iones que no sean Cl^- .

El número de aniones y de cationes debe de ser siempre el mismo para que exista la homeostásis.

En todo el organismo, las membranas celulares y las paredes de los capilares son selectivamente permeables. El agua y algunos solutos pasan libremente a través de éstas barreras, mientras que otros solutos requieren de un sistema de transporte activo.

La difusión es el proceso por el cual un soluto puede diseminarse en toda la solución. Las moléculas de una sustancia disuelta en un solvente se diseminarán por difusión desde una zona de mayor concentración a otra de menor concentración. El desplazamiento de un solvente a través de una membrana semipermeable hacia una zona donde existe una mayor concentración de solutos que no pueden atravesar la membrana se denomina ósmosis, Y el resultado de éste proceso son dos soluciones, iguales en concentración, separadas por una membrana.

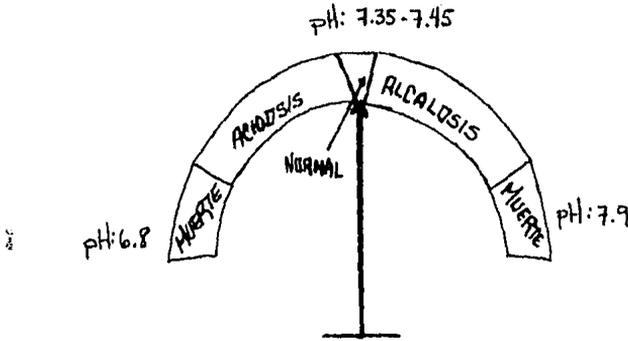
La presión osmótica es la fuerza que arrastra al solvente desde una solución negativa concentrada a través de una membrana semipermeable hacia una solución de concentración positiva. La magnitud de la presión osmótica se determina por el número relativo de partículas de soluto del lado de mayor concentración. Cuando las soluciones se encuentren a la misma concentración de los dos lados de la membrana, se dice que son isotónicas. Una solución hipotónica posee menos solutos que una solución isotónica mientras que la solución hipertónica contiene más solutos.

Si la membrana semipermeable permite el paso al solvente pero no hace lo mismo con el soluto, el solvente se desplazará hacia el lado de la mayor concentración de solutos. Si un ión se moviliza a través de una membrana desde una zona de menor concentración hacia otra de mayor concentración se requerirá un sistema de Transporte Activo.

La presión hidrostática es la fuerza de un líquido que presiona hacia afuera sobre una superficie. Cuando existe una diferencia de presión hidrostática en ambos lados de una membrana el agua y los solutos difusibles se movilizarán abandonando la solución que posee la mayor Presión hidrostática. Este proceso se denomina Filtración.

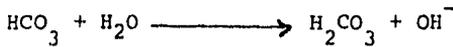
En el extremo arterial del capilar la P. Hidrostática es mayor que la P. Osmótica, por lo tanto, el líquido y los solu-

el pH arterial alrededor de 6.8 hasta 7.9.



Para mantener un equilibrio ácido-base del organismo hay tres mecanismos de defensa: el sistema Buffer, el sistema del aparato digestivo y el sistema renal.

El sistema Buffer se halla formado por dos o más compuestos que impiden alteraciones excesivas en el pH de los líquidos orgánicos. El más importante de los Buffers es el sistema ácido carbónico-bicarbonato de sodio:



El pH del líquido extracelular puede volver a lo normal - mediante este sistema.

El sistema del aparato respiratorio ayuda a mantener el - equilibrio ácido-base gracias al control del contenido de anhí

drido carbónico. Cuando la cantidad de anhídrido carbónico del líquido extracelular aumenta, las respiraciones también aumentan en frecuencia y en profundidad a fin de exhalar mayor cantidad de anhídrido carbónico. En cambio, si el nivel de anhídrido carbónico es bajo, la respiración se deprime. Cuando se elimina una cantidad grande de anhídrido carbónico, hay menor cantidad para combinarse con el agua y formar ácido carbónico. Los riñones pueden eliminar iones H^+ o de Bicarbonato de los líquidos orgánicos y en ésta forma aumentar o disminuir el pH. El mecanismo renal requiere mayor tiempo que los otros sistemas, pero es más poderoso.

**** Electrolitos normales en plasma o en suero sanguíneo:**

Electrolito	EXPRESADOS	COMO:
	Peso/volumen mg/100 ml plasma	Reactivos/volumen mEq/lt plasma
Cationes:		
Sodio	326	142
Potasio	20	5
Calcio	10	5
Magnesio	2.4	2
Cationes totales	<u>358.4</u>	<u>154</u>
Aniones:		
Bicarbonato	60.5	26
Cloruro	365.7	103
Fosfato	3.4	2
Sulfato	1.6	1
Acidos orgánicos	17.5	6
Proteinato	6500	16
Aniones totales	<u>6948.7</u>	<u>154</u>
Electrolitos Totales:		
	7307.1	308

(Tood-Sanford, 1978).

En el organismo, los electrolitos pueden ser de dos tipos: Electrolitos con carga o valencia positiva llamados Cationes y electrolitos con carga o valencia negativa llamados aniones.

Dentro del grupo de los Cationes tenemos:

1) AL POTASIO (K^{+1}).

Se encuentra aproximadamente en cantidad de 4000 mEq (160 gr) como contenido total de potasio en el cuerpo humano. Este catión es el principal del compartimiento intracelular. Hay aproximadamente 150 mEq de K en 1 Kg de agua celular, con excepción de los eritrocitos, que contienen 125 mEq de K/kg. En cambio, el compartimiento extracelular tiene un contenido de 3.5 - 4.5 mEq. Por lo tanto, 98% de K corporal total, es intracelular. Existe un mecanismo de bomba iónica que transporta o empuja al K hacia en interior de la célula. Este transporte se debe a una enzima que adquiere energía al desdoblar el adenosíntrifosfato en adenosín difosfato y fósforo inorgánico. Además hay también un gradiente eléctrico que favorece el paso del K al interior celular, ya que una membrana celular tiene una carga positiva en el exterior y una carga negativa en el interior. Dentro de la célula el potasio está ionizado junto con aniones polivalentes de proteínas y fosfato orgánico. Cuando el K penetra a la célula hay una pérdida de iones Na^{+} e H^{+} , de manera que por cada 3 K que penetran salen 2 Na y 1 H, manteniéndose la neutralidad eléctrica dentro de la célula.

El paciente promedio excreta 40 - 75 mEq de K por la orina en 24 horas, y 10 mEq en las heces. La alimentación promedio proporciona de 50 a 85 mEq de K/día. El paciente que sufre "stress" ya sea quirúrgico, traumático o por enfermedad tendrá mayor pérdida de K y necesitará K adicional, hasta 100-120 --- mEq/día. Una determinación sérica refleja las concentraciones extremas de K y ésta tendrá un significado definitivo, y así una cifra elevada de potasio sérico indica la necesidad de cuidado extremo para no administrar K por el peligro de provocar un paro cardíaco, y una cifra baja indicará la falta de K.

ALTERACIONES PATOLOGICAS.-

Pueden ser:

HIPOPOTALASEMIA: Cuando la cifra sérica de K es de 3 mEq/lt o menos.

HIPERPOTASEMIA: Cuando el K sérico es de 6mEq/lt o más.

Las causas de la Hipopotasemia pueden ser:

- Pérdidas gastrointestinales
- Pérdidas renales
- Ingestión inadecuada y desnutrición
- traumatismo
- Líquidos intravenosos (alcalosis).

Las causas de la Hiperpotasemia, son generalmente:

Insuficiencia renal.

2) EL SODIO (Na^{+1}).-

El sodio total del cuerpo humano alcanza aproximadamente 5600 mEq, correspondiendo 50% al sodio extracelular, 40% al so dio óseo y 10% al intracelular. Alrededor de 1/3 parte del sodio óseo es rápidamente intercambiable. El adulto promedio ingiere y excreta alrededor de 100 mEq de Na/día. Un niño requiere re la mitad de ésta cantidad y un lactante 20 mEq/día.

El riñón tiene la capacidad de conservar Na. 4/5 partes del sodio, son absorbidas pasivamente en los túbulos proximales y la restante 1/5 parte está bajo control hormonal en los túbulos distales.

90% de Na se halla en el compartimiento extracelular y determina la Presión osmótica y el volumen del líquido extracelular. En contraste a la concentración extracelular del Na, que es de 140 mEq/lt, solamente hay 4.5 mEq/lt de Na en el agua celular. El Na desempeña un papel muy importante en el equilibrio ácido-base del cuerpo en virtud de la capacidad renal para retener Na substituyéndolo con amoníaco y iones H^+ . El Na se puede perder anormalmente en el aparato digestivo, en la sudación y en la fiebre, en donde se pierde una solución hipotónica en enfermedades como insuficiencia cardiaca, nefropatías en donde hay uso prolongado de diuréticos y en la hiponatremia de las enfermedades crónicas. (Borow, 1976; Teldy, 1973).

TECNICA PARA DETERMINAR SODIO Y POTASIO.-

A. Fundamento:

El suero diluido es atomizado en una llama cuya temperatura es suficiente para excitar los electrones de algunos elementos sodio y potasio en este caso a un nivel de energía superior y al regresar a su estado original emiten radiación de longitud de onda característica para cada elemento, la intensidad de esta radiación es proporcional a la concentración del elemento.

B. Material y Equipo:

1) Aparatos:

- a) Fotómetro de Flama Coleman
- b) Cable para conectar el fotómetro.
- c) Escala de lectura directa para sodio y potasio.

2) Cristalería:

- Matríz volumétrico de 50 ml
- Vaso de precipitados de 10 ml
- Pipetas graduadas de 1.0 y 5.0 ml

3) Reactivos:

- Sterox al 1.0% y al 0.02%
- Labtrol (solución para calibrar el Flamómetro)

Nota: Para calibrar el flamómetro, diluir el labtrol como si fuera suero con la solución de Sterox al 0.02%.

4) Material Biológico:

- 0.5 ml de suero

C. Método

- a) Colocar 0.5 ml de suero, en un matríz volumétrico de 50 ml y aforar con solución de Sterox al 0.02%
- b) Marcar cuatro vasos de precipitados de 10 ml de la siguiente manera:
 - P Problema o muestra
 - O Sol. blanco limpiadora inicial
 - F Sol. limpiadora final
 - St Estandart: Sol. 150 mEq/lt de sodio y 5 mEq/lt de potasio.

Colocar de la siguiente manera:

- | | VASO P | VASO O | VASO F | VASO ST |
|---|---|---------------------------------|---|---------|
| 1 | Colocar en todos los vasos 1.0 ml de la solución de suero diluido con Sterox (inciso a) | | | |
| 2 | Llenar con sol. anterior | | | |
| 3 | | Llenar con sol. de Sterox 0.02% | | |
| 4 | | | Llenar con sol. Standar 150 mEq /lt Na y 5 mEq/lt K | |

- c) conectar el fotómetro de flama y el espectrofotómetro con -- sus respectivas clavijas y uno de los dos aparatos introduciendo el cable que sale de la parte inferior del espectrofotómetro en el correspondiente enchufe del flamómetro situado en la parte posterior, introducir con la clavija ancha hacia arriba. Sacar 1.0 cm el porta cubetas de plástico del espectrofotómetro, girar lentamente y depositar nuevamente en su compartimiento, debe quedar un poco afuera, asegurarse que no hay paso de luz, tapar y cerrar los controles del espectrofotómetro y del flamómetro. Girar la derecha 1/4 de vuelta los botones para ajuste grueso y fino del espectrofotómetro; el círculo de luz que se encuentra en la reglilla lectora se moverá hacia la izquierda y desaparecerá de la vista si los aparatos se encuentran conectados correctamente. Colocar el filtro de Sodio en la ranura para filtros del flamómetro.
- d) Abrir la toma de gas y encender. Inmediatamente abrir la toma de oxígeno y lentamente llevar hasta 1.0 Kg y regular la flama a fin de obtener un cono azul intenso, de 1.0 cm de altura.
- e) Colocar el vaso "O" en el porta muestras del flamómetro cerrar la puerta y atomizar dando vuelta al pasador en el sentido de las manecillas del reloj.
- f) Con los controles para ajuste grueso y fino del flamómetro llevar el índice luminoso del espectrofotómetro a cero (extremo izquierdo de la escala).
- g) Sustituya el vaso "O" por el vaso "St" y atome de la misma manera.
- h) Con los controles del espectrofotómetro ajuste el índice de la luz a los mEq del St de Na en la escala correspondiente de la reglilla
- i) Comprobar que el ajuste ha sido correcto, atomizando varias veces los vasos "O" y "St" hasta que obtenga dos lecturas iguales.
- j) Una vez estabilizadas las lecturas, coloque el vaso "P" lea y anote la concentración de Na según la lectura en la escala de sodio.
- k) Vuelva a atomizar los vasos "O" y "St" para asegurarse de que los ajustes no variaron y la determinación del vaso "P" -- fué correcta.

- l) Quitar el filtro de Na y poner en su lugar al filtro de K.
- m) Colocar en el portamuestras el vaso "O", atomizar y ajustar a cero de la escala con los controles del flamómetro.
- n) Sustituir por el vaso "St", atomizar y ajustar los mEq del "St" de K en la escala correspondiente con los controles del fotómetro.
- ñ) Comprobar si el ajuste es correcto al atomizar varias veces los vasos "O" y "St".
- o) Comprobada la exactitud, colocar el vaso de la muestra diluida en el portamuestras y atomizar.
- p) Leer y anotar la concentración de K según la escala.
- q) Atomizar nuevamente los vasos "O" y "St" para comprobar el ajuste y asegurar la exactitud de la lectura del vaso "P".
- r) Por último atomizar el vaso "F" durante 30 segundos para limpiar el atomizador.
- s) Limpie el atomizador con el capilar metálico que tiene dicha función, introduzcalo siempre por el orificio inferior.
- t) Para apagar el aparato quite el capuchón, gire la llave del oxígeno, cierre inmediatamente el gas.

NOTA: Siempre que se introduzca una solución electrolítica en el atomizador es necesario lavar con el vaso "F" o sea con el reactivo de Sterox al 0.02% ; de esta manera no habrá contaminación del reactivo con el problema y del reactivo con el estándar.

VALORES NORMALES:

Sodio de 138 a 146 mEq/lit de suero
Potasio de 3.8 a 5.1 mEq/lit de suero

D. MEDIDAS DE SEGURIDAD Y CONTROL:

Hay que tener mucho cuidado de no contaminar las muestras al

cambiar de vasos y pasarlos por el aparato.

Debe de asegurar las lecturas dadas por el aparato ~~reptian-~~
do varias veces la misma muestra.

E. BIBLIOGRAFIA:

Manual de Coleman Instruments

3) EL MAGNESIO (Mg^{++}).-

La concentración de Mg en el adulto promedio es alrededor de 25 gr. Su distribución es similar a la del K, ya que se halla concentrado en el interior de la célula (40 mEq/lt). En el suero, los valores varían de 1.5 a 2.5 mEq/lt. La mitad del Mg total del cuerpo se encuentra en el hueso, en donde no se equilibra con rapidéz. El Mg abunda en los alimentos, particular--mente en los vegetales, ya que es componente de la clorofila. Se absorbe en la parte alta del yeyuno y en menor grado en el estómago. Se elimina fundamentalmente mediante el riñón, aunque es excretado también por el hígado, páncreas y aparato diges--tivo. El Mg constituye un cofactor en muchas reacciones enzimáticas en el metabolismo de la glucosa. La concentración extra-celular de Mg tiene importancia en la función muscular.

ALTERACIONES:

Hipomagnesemia: Cuando la concentración de Mg en el suero disminuye a menos de 1.0 mEq/lt. Este trastorno se observa en las

enfermedades crónicas como: cirrosis alcoholica;
Pancreatitis crónica;
Cáncer
Nefritis crónica.

Hipermagnesemia: Cuando la concentración de Mg está por arriba de 3.0 mEq/lt, y ocurre en casos de:

Letárgos
Defectos en la conducción auriculo ventricular
(Weldy,1976; Sniwely,1980).

TECNICA PARA DETERMINAR MAGNESIO.-

A. Fundamento:

Una lámpara de cátodo hueco forrado de Mg, produce luz de longitud de onda característica; esta luz se pasa a través de la flama donde se proyecta, a presión, la muestra, los átomos de la intensidad de la luz que atraviesa la flama antes y después de la introducción de la muestra es proporcional a la concentración de Mg en ella.

B. MATERIALY EQUIPO:

1) Aparatos:

a) Espectrofotómetro de Absorción Atómica Unicam SP 90A

2) Cristalería:

Matríz volumétrico de 1000 ml
Matraces volumétricos de 10 ml y de 100 ml
Vasos de precipitados de 100 ml

3) Reactivos:

- a) Solución de Mg 100 mg/lt
Oxido de magnesio 1000 mg
ácido clorhídrico 10 ml
Llevar a 1000 ml con agua destilada;
guardar en frasco de polietileno y refrigerar.
- b) Solución de Mg 100 mg/lt
De la solución anterior tomar 25 ml y llevarlos hasta 150 ml con agua destilada.
- c) Solución de EDTA 3.75 g en 100 ml

EDTA 37.5 g

Disolver y llevar hasta 1000 ml con agua destilada
guardar en frasco de polietileno, refrigerar.

- d) Solución de EDTA 0.78 g en 100 ml
De la solución anterior C colocar 208 ml en un matraz volumétrico y aforar con agua destilada a 1000 ml; guardar en frasco de polietileno, refrigerar.

C. METODO

Material Biológico: 0.4 ml de suero

- a) En un matraz volumétrico de 100 ml se colocan 0.4 ml de suero problema, se afora con solución de EDTA (0.78 g/100 ml).

El suero queda diluido 1:25.

- b) Colocar en siete matraces volumétricos de 100 ml lo siguiente:

Con el fin de elaborar la Curva de Calibración:

Matraz	Sol. standar 10 mg/100 ml	Sol. de EDTA 0.78 g/100 ml	Agua destilada	Conc. final en mg/100 ml
1	0 ml	20 ml	llevar a 100 ml	0
2	4 ml	"	"	1
3	6 ml	"	"	1.5
4	8 ml	"	"	2.0
5	10 ml	"	"	2.5
6	12 ml	"	"	3.0
7	16 ml	"	"	4.0

- c) Estas soluciones y la muestra se leen en absorción atómica de acuerdo a las siguientes indicaciones:

Longitud de Onda	285	nm
Abertura	0.08	nm
Filtro	1	
Cantidad de corriente	4 miliampers	de acetileno
Altura del quemador	1	cm
Presión del acetileno	0.7	Kg/cm ²
Aire	2.1	Kg/cm ²

NOTA:

El aparato se coloca a cero con la solución (d); las concentraciones se obtienen en mg de Mg/100 ml de suero; pero si se requiere mEq/lt debe multiplicarse el valor en -- mg por 0.823 que es el factor constante para dicha equivalencia.

VALORES NORMALES:

De 1.8 a 3.6 mg de Magnesio/100 ml de suero.

D. MEDIDAS DE SEGURIDAD Y CONTROL:

Debe tenerse cuidado de no aumentar la cantidad de Sodio - (EDTA) en las soluciones porque esto interferiría en la determinación del Mg.

E. BIBLIOGRAFIA:

Dawson, J.B. Heaton, F.W. The determination of magnesium in biological materials by atomic absorption spectrophotometry
Bioch. J. 80: 99-106, 1961.

4) EL CALCIO (Ca^{++}).-

El contenido total de Ca corporal es de aproximadamente ---- 1000 - 1200 g del cual el 99% está concentrado en el esqueleto la ingestión cotidiana de Ca oscila entre 1 y 2 g y la mayoría se elimina por el aparato digestivo y una excreción urinaria de aproximadamente 200 mg/lt/día.

La cifra sérica normal varía entre 9 y 11 mg/100ml.

El Ca en la sangre se encuentra en tres formas:
ionizado, unido a proteínas y formando complejos.

Aproximadamente el 45% de Ca se encuentra en forma ionizada y es esta parte la responsable de la actividad fisiológica en procesos como la Coagulación de la sangre, la Excitabilidad Neuromuscular, La actividad Enzimática y la Calcificación ósea.

El calcio se absorbe fundamentalmente en el duodeno y en la parte alta del yeyuno.

ALTERACIONES:

Hipocalcemia: Cuando la concentración de Ca es menor a 8 mg/100 ml; y presenta síntomas como: Entumecimiento, hormigeo alrededor de la boca y puntas de los dedos.

Hipercalcemia: Cuando la concentración de Ca es mayor a 11 mg/100 ml en enfermedades como Hipertiroidismo, Cáncer, Nefropatías; presentando síntomas como fatiga, debilidad, náusea, vómito, pérdida de peso, cálculos renales. (Sniwely, 1980).

TECNICA PARA DETERMINAR CALCIO: (Ferro-Hamm).

A FUNDAMENTO:

El ácido cloránico precipita al Ca, como cloranilato cálcico, el cual se disuelve con solución de EDTA y forma el cloranilato sódico soluble, de color rosa.

B MATERIAL Y EQUIPO:

1. Aparatos.

Espectrofotómetro Centrífuga

2. Cristalería

Tubos de ensaye

Vasos de precipitados de 500 ml

Matraces volumétricos de 1000 ml

Pipetas graduadas de 1.0, 5.0 y 0.1 ml

3. Reactivos:

- a) Acido cloranílico
Hidróxido de sodio 4.0 g
Acido cloranílico 11.0 g
Disolver, ajustar a pH 6.5 y aforar a 1000 ml con Agua destilada.
- b) Alcohol Isopropílico al 50%
Alcohol Isopropílico 500 ml
Mezclar con agua destilada hasta llegar a 1000 ml
- c) EDTA al 6%
EDTA 60 g
Disolver y aforar con agua destilada hasta 1000 ml
- d) Solución de Calcio 10 mg/100 ml
Carbonato de calcio 0.2497 g
Acido clorhídrico concentrado 8 ml
Disolver el carbonato de calcio, agregar el ácido clorhídrico, y aforar con agua destilada hasta 1000 ml.

4. MATERIAL BIOLÓGICO:

2.0 ml de suero

C METODO .

- a) En un tubo de ensaye colocar 2.0 ml de suero.
- b) Añadir 1.0 ml de reactivo de ácido cloranílico.
- c) Dejar reposar durante 30 minutos.
- d) Centrifugar a 1800 r.p.m. durante 10 minutos
- e) Decantar el líquido sobrenadante y dejar reposar durante 3 minutos sobre papel filtro al precipitado para que se seque.
- f) Lavar el precipitado con 6 o 7 gotas del reactivo de alcohol isopropílico al 50%.
- g) Volver a centrifugar y volver a hacer lo mismo para eliminar el líquido sobrenadante como en el paso e.
- h) Añadir al precipitado dos gotas de agua destilada y agitar hasta resuspender el precipitado.
- i) Añadir 6.0 ml del reactivo de EDTA al 6%, tapan el tubo y agitar por inversión hasta disolver al precipitado.
- j) Leer a una longitud de onda de 520 nm.
- k) Ajustar a 100% de Transmitancia con blanco de Agua destilada.

NOTA:

Para la preparación del Estandar, se toman 2.0 ml del -- reactivo de calcio 10 mg/100 ml y se procede a trabajar como se indica desde el paso b. La lectura del St es de 78% de T, se puede leer la concentración en el disco de escala de con-- centraciones o haciendo simplemente una regla de tres.

si St = 10 mg \longrightarrow 78% de T
el P \longrightarrow x % de T (Obtenido)
Donde P = Problema

Preparación de la curva de calibración:

TUBO	AGUA DESTI LADA	SOL. DE CALCIO 10 mg/100 ml	CONCENTRACION DE Ca EN mg/100 ml
1	6.0	0	0
2	4.5	1.5	7.5
3	4.0	2.0	10.0
4	3.5	2.5	12.5
5	3.0	3.0	15.0

A cada tubo se le trabaja de la misma manera que al tubo con la muestra del paciente (proseguir con los 5 tubos desde el paso b).

VALORES NORMALES:

De 9 a 10 mg/100 ml de suero
ó de 4.5 a 5.5 mEq/lt

D. MEDIDAS DE SEGURIDAD Y CONTROL.

En general se debe tener cuidado del manejo de los aparatos y su calibración, ajustando perfectamente a cero antes de hacer las lecturas del problema y del estandar.

E. BIBLIOGRAFIA.

Manual of clinical chemistry procedures, Miami, Date reagents_ 1965,

Manual de Técnicas Sigma

Manual clínico, Klett-Summerson

NOTA: La técnica de Ferr-Hamm para la determinación de la concentración de calcio en el suero sanguíneo viene igual en los diferentes Manuales de Técnicas Clínicas, pero con algunas modificaciones en cuanto a cantidades agregadas de los reacti--vos; ésto quiere decir que siguen el mismo principio o funda--mento para calcular la concentración de Ca en la muestra pro--blema.

DENTRO DEL GRUPO DE LOS ANIONES TENEMOS:

AL CLORO (Cl^{-1}).

En el adulto promedio hay aproximadamente 2400 mEq de Cl las 2/3 partes son extracelulares y la 1/3 es intracelular.

El cloro intracelular se encuentra en cantidades signifi--cantes sólo en los eritrocitos y en los leucocitos y en aque--llas célula con función excretora externa como las de la mu--cosa digestiva. El cloro sérico existe en cantidad inversa al ión bicarbonato. El Cl está regulado por el riñón donde las - 4/5 partes son absorbidas por los túbulos proximales y la o--tra 1/5 parte en los túbulos distales bajo control hormonal. El cloro es excretado habitualmente con K en forma de KCl, la deficiencia de uno coexiste con la deficiencia del otro y la restitución debe incluir a ambos.

ALTERACIONES:

Hipocloremia: En la acidosis respiratoria, Nefropatías crónicas con retención de SO_4^{--} y PO_4^{---} y (en el aumento de la excreción de cloro).

Hipercloremia: En la acidosis metabólica, Alcalosis respiratoria y con la administración de NH_4 , K y NaCl.

TECNICA PARA DETERMINAR CLORO.- (Schales y Schales).

A. FUNDAMENTO:

Los iones de cloro se combinan con los iones mercúricos.

El exceso de estos reacciona con el indicador S-difenil-carbazona y dá color violeta.

B MATERIAL Y EQUIPO:

1) Cristalería:

Matraces erlenmeyer de 25 ml
Matraces volumétricos de 1000 ml
Pipetas graduadas de 5, 1, y 0.1 ml

2) Reactivos:

- (a) SDifenil-carbazona (indicador)
S-difenil-carbazona 1.0 g disolver con Alcohol etílico y aforar hasta 1000 ml. Conservar en frasco ambar y en refrigeración.
- (b) Nitrato mercúrico
Nitrato mercúrico 1.5 g
Acido Nítrico 2N 20 μl;
Disolver el nitrato mercúrico, agregar el ácido nítrico y aforar con agua destilada hasta 1000 ml.
- (c) Solución de NaCl 10 mEq/l
Cloruro de Sodio 584.5 mg
Disolver y aforar con agua destilada hasta 1000 ml.

- 3) Material biológico:
1.0 ml de suero.

C. METODO

- A) A 0.2 ml de suero añadir 1.8 ml de agua destilada y 4 - gotas del reactivo de S-difenil-carbazona.
- B) Titular con el reactivo de Nitrato mercúrico hasta la - aparición de una coloración violeta pálido permanente.
- C) Para calcular la concentración de cloro en la muestra - se deben multiplicar los ml utilizados en la titulación por el factor de conversión y se obtendrán mEq de Cl/lit.

NOTA:

Para obtener el valor del factor de conversión se hace - lo siguiente:

- 1) Poner 2.0 ml de cloruro de sodio 10 mEq/lit en un matraz er lenmeyer de 25 ml.
- 2) Añadir 0.06 ml de sol. indicadora
- 3) Titular con la solución de Nitrato mercúrico, hasta obtener la coloración violeta.
- 4) Dividir 100 entre el número de ml utilizados en la titula- ción del cloruro de sodio y se obtendrá el factor de con- versión.

VALORES NORMALES:

De 96 a 105 mEq de Cl/lit

D. MEDIDAS DE SEGURIDAD Y CONTROL:

Debe tenerse mucho cuidado al efectuar la titulación para- obtener el resultado lo más exacto posible.

E. BIBLIOGRAFIA:

Schales, O. y Schales, S.S. Simple and Accurate Method for

Determination of chloride in biological fluids J. Biol. Chem
140: 879, 1941.

Schales O. Standard Methods of clinical chemistry N.Y.

M. Reiner Academic Press, 1953 vol. 1

--Maxwell Borow 1976, Respuestas fisiológicas en la salud y
en la enfermedad. Ed. El Manual Moderno S.A. México, D.F.

-Norma Jean Weldy, 1973. Líquidos y Electrolitos del orga-
nismo Ed. Médica Panamericana, S.A. Argentina.

Manual de Procedimientos Clínicos

I.M.S.S. México, 1974 Dr. Luis Castelazo Ayala

Subdirector General Médico.

BIOMETRICA HEMATICA

BIOMETRIA HEMATICA

Introducción a la Hematología.-

La sangre es un líquido rojo, claro de composición variable que circula a través de los vasos sanguíneos del organismo.

Participa en las actividades fisiológicas y patológicas de todos los órganos y está compuesta de un líquido llamado plasma en el que están suspendidos los eritrocitos, células blancas o leucocitos y trompocitos o plaquetas denominados en conjunto Hematocitos.

La Hematología estudia la parte morfológica de la sangre; y se ocupa de la total interacción de los sistemas vascular y hematopoyético. (Byrd, 1978; Weiss, 1977)

Cuando la sangre se coagula, hay una separación de un coágulo sanguíneo y un líquido color ambar llamado suero, carente de fibrinógeno (lo cual lo diferencia del plasma)

Los distintos componentes citológicos de la sangre pueden definirse como:

1) ERITROCITO: (Llamado también célula hemática roja, glóbulo rojo o hematíe)

Es una célula discoide elástica bicóncava y carente de -

núcleo, que normalmente se halla en la periferia de la luz de los vasos sanguíneos. Tiene un promedio de vida de 80 a 120 - días, un diámetro de 7.2 micras y un color (con tinción Wri--ght) anaranjado o rojo.

La principal función del eritrocito es la de contener -- hemoglobina asociada con oxígeno y llevarla a los diferentes órganos.

2) LEUCOCITO: (Llamado también célula blanca hemática ó globu
lo blanco)

Es una célula con núcleo, con un diámetro entre 8 y 16 - micras, se halla en la sangre periférica.

Tiene un promedio de vida indefinido.

Está compuesto principalmente por:

Células polimorfonucleares: (con un promedio de vida de 3 a 4 días).

Linfocitos: (con promedio de vida de 100 días).

Monocitos: (con promedio de vida de 2 días a 2 semanas).

y en ocasiones

Células plasmáticas: (con larga duración de vida).

Cada tipo de leucocito juega un determinado papel en la defensa del organismo frente a la enfermedad mediante la fagocitosis y la formación de anticuerpos.

3) TROMBOCITO: (También conocido como plaqueta).

Es un fragmento morfológicamente irregular (con vida pro medio de 8 a 11 días) (in vitro máximo 4 hrs), derivado de la porción citoplásmática de los megacariocitos. (células madre - normalmente situadas en la médula ósea).

Esta célula es fundamental para que tenga lugar la coagu lación de la sangre. Cualquier variación moderada o intensa - del número, alteración morfológica y función de uno o más de los componentes citológicos de la sangre producirá un síndrome hematológico complejo llamado Discrasia Sanguínea.

FISIOLOGIA DEL SISTEMA VASCULAR.-

Los principales órganos de la hematopoyesis son la médula ósea, hígado, bazo, timo y ganglios linfáticos.

La hematopoyesis se inicia durante la vida fetal; sin em bargo, bajo situaciones específicas de stress, el hígado, bazo, timo y ganglios linfáticos pueden volver a su función fetal y presentar una hematopoyesis extramedular.

Las principales funciones de las células del sistema hematopoyético son las de: transporte de oxígeno, resistencia a la infección, producción de anticuerpos, detención de la hemo rragia. (Limman, 1975; Byrd, 1978; Platt, 1972).

PROPIEDADES GENERALES DE LA SANGRE.-

- * Tiene un pH entre 7.35 a 7.8
- * Densidad de la sangre completa 1.048 - 1.066 en hombres
1.053 en mujeres
- * Densidad del suero 1.026 a 1.031 (g/ cm³)
- * Densidad de los hematies 1.092 a 1.095
- * Su volumen total es de 5 a 6 lt con respecto al peso corpóral. (O de 7 a 8 %).
- * Plasma : está compuesto por suero y fibrinógeno, ocupa el 55% del volumen sanguíneo total.
- * Agua: Comprende del 91 al 92% del peso del plasma.
- * Proteínas plasmáticas: Ocupan del 6 al 9% (éstas están formadas en el hígado y ejercen una presión osmótica de 25 a 30 ml de Hg; son también responsables de la viscosidad sanguínea.

Las proteínas plasmáticas están compuestas por:

1. Albúmina sérica (4%)
2. Seroglobulina (2.7%)

En el plasma también están presentes las proteínas reguladoras y protectoras, tales como las hormonas y las enzimas).

* Sustancias anabólicas difusibles:

a) Material inorgánico (0.9%) (tales como cloruro sódico, calcio, potasio, ácido carbónico, yodo y fierro)

b) Sustancias nutritivas orgánicas: (Tales como aminoácidos glucosa, grasa, colesterol, O₂ y CO₂)

* Componentes catabólicos difusibles: (Tales como urea, ácido úrico, creatinina, creatina y amonio).

De los anteriores podemos resumir que las funciones de la sangre son: respiratorias, nutritivas, excretoras, de mante-

nimiento hídrico de tejidos y de regulación térmica corporal.

(Limman, 1975).

SERIE ERITROCITICA.-

1. Esta se inicia en médula ósea con la formación de la célula primitiva de origen o hemohistioblasto; esta célula es -- oval, grande (de 25 a 35 micras), tiene un nucleo oval grande con cromatina regular en forma de fina red vesicular.

La tercera parte de su volumen esta ocupado por un citoplasma de color lila grisáceo con unos gránulos policromáticos diminutos.

2. A partir de estas células se forma el hemocitoblasto (de 20 a 30 micras) caracterizado con el mismo tipo de núcleo -- que la célula primitiva, sin embargo el citoplasma de contornos irregulares se hace más pequeño, azulado y no granular, cuya tinción es variable.

La división de ésta célula da lugar a dos nuevas células: una diferenciada que se encuentra en la médula ósea, -- ganglios linfáticos, bazo e hígado; tiene un diámetro de 25 a 35 micras con un nucleo redondo u oval que ocupa casi todo el contenido celular. Y la otra célula hija es indiferenciada multipotencial, esta permanece en esta fase para evitar una depleción de las células primitivas.

3. La célula blástica específica más joven de la serie del eritrocito es el pronormoblasto (proeritroblasto o rubriblasto). Esta es una célula ovoide cuyo tamaño es el doble que -

el del hematíe y tiene un diámetro medio de 14 a 19 micras.

Su núcleo es de color púrpura claro, vesicular y granular con una ligera densificación de la cromatina (a medida que la célula envejece la cromatina se dispone en filamentos).

Existen de uno a tres nucleolos perfectamente diferenciados. El citoplasma es granular y de color azul claro en las formas jóvenes y aumentando la intensidad de color en las formas viejas o maduras.

4. A partir de esta célula se forma el normoblasto basófilo (eritroblasto primitivo o prorrubricito) tiene un diámetro de 12 a 17 micras ligeramente menor que el pronormoblasto. Su núcleo tiene color púrpura oscuro; la cromatina está más aglutinada y en ocasiones tiene el aspecto de rueda de carro. No hay nucleolos y su citoplasma es azul marino.

5. Después se forma el normoblasto policromatófilo (eritroblasto tardío o rebricito) tiene un diámetro de 12 a 15 micras con núcleo compacto condensado y más maduro cuya cromatina tiene un color negro azulado y muy densa. El citoplasma es de color rojo azulado o policromático.

6. Luego sigue el normoblasto ortocrómico (normoblasto ácido filico, o metarrubricito) que se forma a partir de la maduración del pronormoblasto en un periodo de dos días.

Esta célula tiene un núcleo oscuro y homogéneo con una cromatina condensada llamada picnótica, tiene un diámetro de

8 a 12 micras.

7. Consecutivamente se forma el reticulocito (eritrocito policromatófilo o difusamente basófilo). Este es un eritrocito joven formado por:

a) salidas del núcleo de la célula mediante el proceso de contracción activa,

b) o por destrucción del mismo por medio de fragmentación.

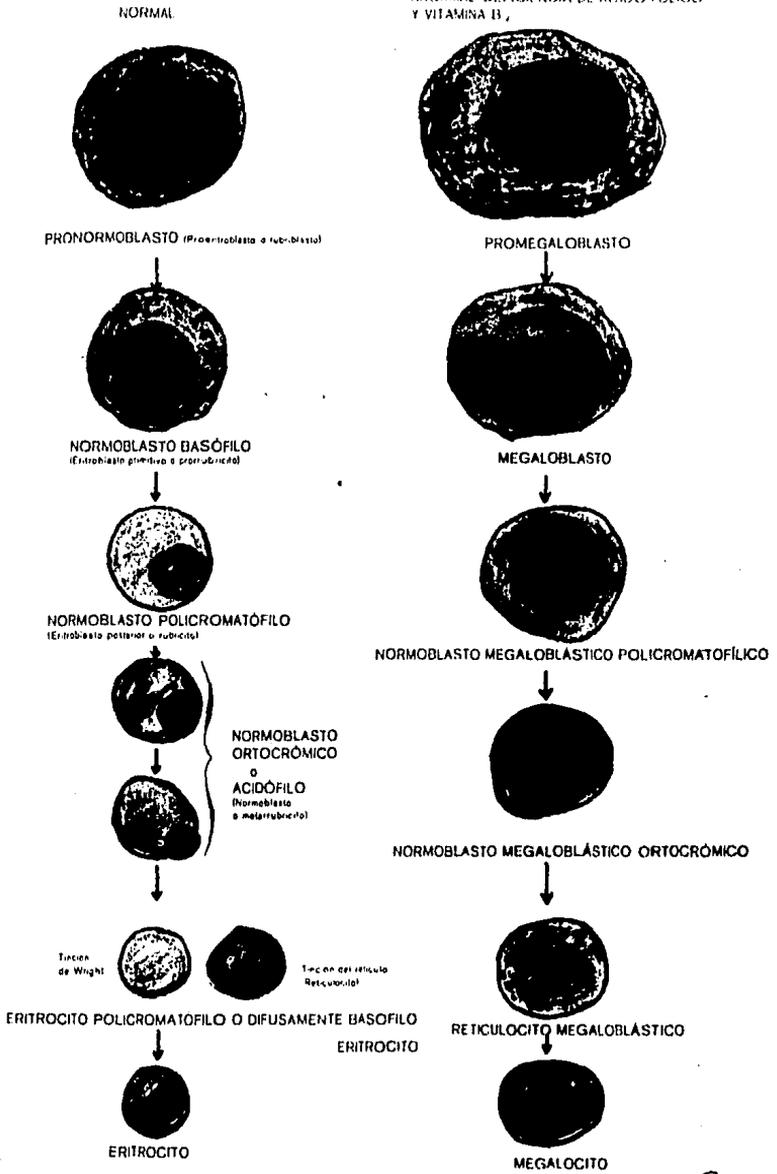
Tiene un diámetro de 7 a 10 micras y retiene cierta cantidad de RNA que le dá características policromatofílas en la tinción de Wright y su característico aspecto reticulado azul.

8. Por último se forman los eritrocitos (normocito o hematíe) a partir de la célula anterior cuatro días después, con un diámetro de 7.2 micras y un color anaranjado o rojo con tinción Wright. Su forma es oval y carece de núcleo.
(ver lámina # 2)

SERIE GRANULOCITICA.-

1. Células primitivas (retículo endoteliales o reticulares) - tienen un tamaño de 15 a 40 micras, presentan un núcleo redondo, grande con una cromatina reticular que se tiñe en rojo - púrpura. Tiene de uno a cuatro nucleolos bien definidos y de forma irregular, su citoplasma es azulado, no tiene gránulos.

2. Mieloblasto: Tiene un tamaño de 10 a 18 micras de diáme--tro con forma ovoide, su núcleo ocupa la mayor parte de las células, es redondo o ligeramente ovoide. Contiene de 2 o -



1.4mina 2
SECUENCIAS DE LA MADURACION ERITROCITICA

más nucleolos ovoides de color azul pálido.

3. Progranulocito:(promielocito) Su tamaño es de 10 a 20 micras, tiene forma redonda u oval, su nucleo es ovoide, grande con cromatina de color púrpura y ligeramente densa. Presenta dos o más nucleolos ovoides y de color azul pálido. Tiene un citoplasma color púrpura claro basófilo.

4. Mielocito: No tiene nucleolo, posee gránulos, tiene un tamaño de 12 a 18 micras es redondo u oval. Su nucleo es redondo u oval, tiene cromatina densa, carece de nucleolos, su citoplasma es rosa azulado con gránulos azurofilos.

5. Metamielocito: (célula juvenil) Tiene un tamaño de 10 a 18 micras, redondo u oval, la cromatina nuclear es oscura, de color púrpura no tiene nucleolos, su citoplasma es abundante de color azul rosado y lleno de numerosos gránulos pequeños (neutrófilos, eosinófilos o basófilos).

6. Célula en cayado: (en banda) tiene un tamaño de 10 a 16 micras, redondo u oval, presenta un núcleo en forma de herradura, tiene cromatina nuclear densa y de color azul púrpura intenso, no tiene nucleolos, su citoplasma es abundante de color azul pálido o rosado con gránulos grandes color naranja (eosinófilos), azul oscuro (basófilos) o pequeños gránulos color lila (neutrófilos).

7. Granulocitos polimorfonucleares: (segmentados). Tiene un

tamaño de 10 a 15 micras, tienen un núcleo con dos lóbulos de color púrpura unidos por una tira delgada de cromatina -- densa; los núcleos eosinófilos y basófilos tienen dos lóbulos. Presenta citoplasma azul o rosa pálido, el neutrófilo tiene muchos gránulos finos de color violeta, y el eosinófilo tiene gránulos más grandes de color rojo amarillento; los del basófilo son grandes y de color azul oscuro.

(Ver Lámina # 3).

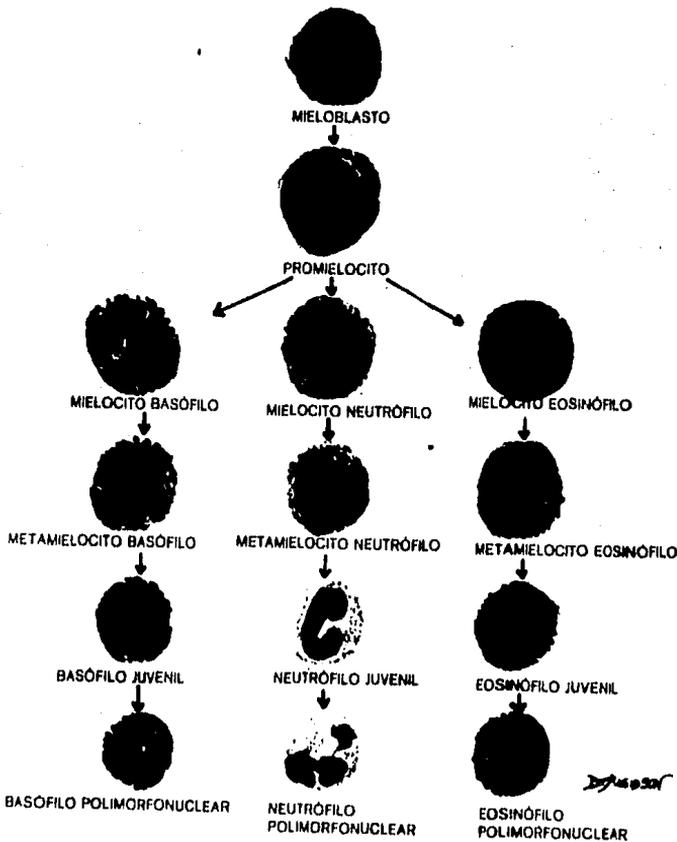


Lámina 3
MADURACIÓN DE LA SERIE GRANULOCÍTICA

SERIE LINFOCITICA.-

1. Linfoblasto: Normalmente pueden encontrarse en médula ósea pero no en sangre periférica. Tiene un tamaño de 10 a 18 micras su núcleo ocupa la mayor parte de la célula, es redondo u oval. La cromatina es de color púrpura oscuro. Suele tener uno o dos nucleolos bien definidos con color azul claro. Su citoplasma es de color azul intenso con gránulos.

2. Prolinfocito: Tiene un tamaño de 9 a 17 micras, con núcleo ovoide, su cromatina es densa y tiene un color púrpura intenso. Tiene un nucleolo azulado. Su citoplasma es de color azul claro u oscuro y en ocasiones con gránulos azurófilos.

3. Linfocitos: Tienen un tamaño variado de 7 a 16 micras. Su núcleo tiene forma redonda, tiene cromatina de color azul -- púrpura oscuro y es muy densa

No tiene nucleolos, su citoplasma es de color azul claro con algunos gránulos azurófilos.

(Ver lámina # 4).

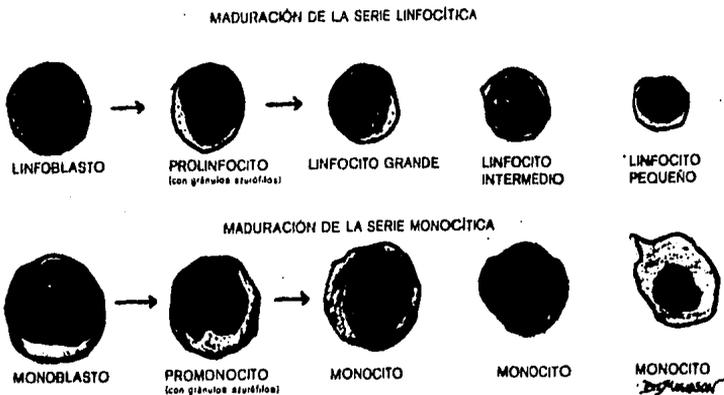


Lámina 4
MADURACIÓN DE LA SERIE LINFOCÍTICA Y DE LA SERIE MONOCÍTICA

SERIE MONOCITICA.-

1. Monoblasto: Su tamaño va de 12 a 20 micras. Su núcleo es grande, redondo y ovoide, con cromatina fina y color púrpura claro o rosado. Tiene de uno a dos nucleolos. Su citoplasma es de color azul intenso y no tiene gránulos.

2. Promonocito: Su tamaño es de 12 a 18 micras, su núcleo es grande, lobulado, de forma arriñonada. Su cromatina tiene color púrpura claro; tiene un nucleolo. Su citoplasma es de color gris azulado con gránulos grandes y pequeños de color lila o azurófilos que dan un aspecto polvoriento.

3. Monocitos: Son células de mayor tamaño que existen en la sangre periférica, van de 12 a 16 micras. Su núcleo es oval tiene forma de herradura. Posee cromatina de color púrpura claro o rosado. No tiene nucleolos. El citoplasma es abundante de color gris con muchos gránulos de color lila.

(Ver lámina # 5).

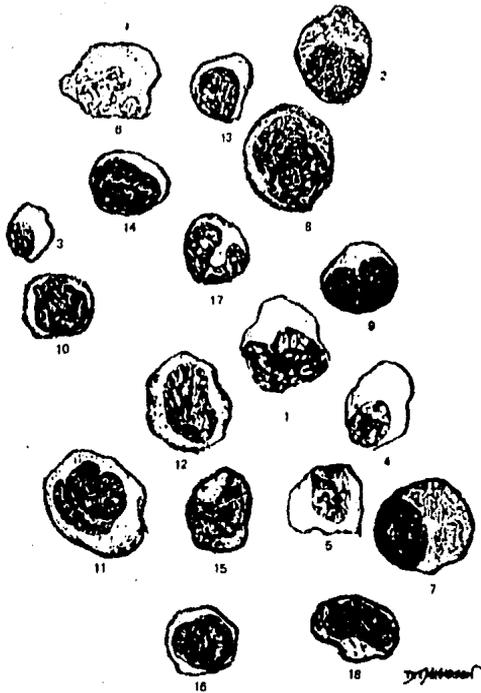


Lámina 5

TIPOS DE LEUCOCITOS (MONONUCLEARES)

1, Monocito. 2, Mielocito neutrófilo. 3, Linfocito. 4, Linfocito. 5, Monocito. 6, Monocito. 7, Mielocito neutrófilo. 8, Promonocito. 9, Linfocito. 10, Monocito. 11, Monocito. 12, Mielocito neutrófilo. 13, Linfocito. 14, Linfocito. 15, Mielocito neutrófilo. 16, Linfocito. 17, Metamielocito neutrófilo. 18, Metamielocito neutrófilo.

SERIE PLASMOCITICA.-

1. Plasmoblasto: Se observa raramente en la médula ósea, - tiene un tamaño de 14 a 24 micras, su nucleo es ovoide y --- su cromatina es reticulada, poco densa y de color púrpura. - Presenta de uno a tres nucleolos grandes de color azul. Su - citoplasma es abundante.

2. Proplasmocito: Tiene forma ovoide mide 14 a 22 micras , - con cromatina densa en su nucleo de color púrpura. Tiene de uno a dos nucleolos de gran tamaño, su citoplasma es abundante de color azul claro con un halo más claro.

3. Plasmocito: (Célula plasmática) Es ovoide con un polo más estrecho que el otro, su tamaño es de 8 a 18 micras con nú-- cleo ovoide, su cromatina es púrpura, muy densa, con un cito plasma de color azul obscuro.

(Ver lámina de la # 1 a la 5)

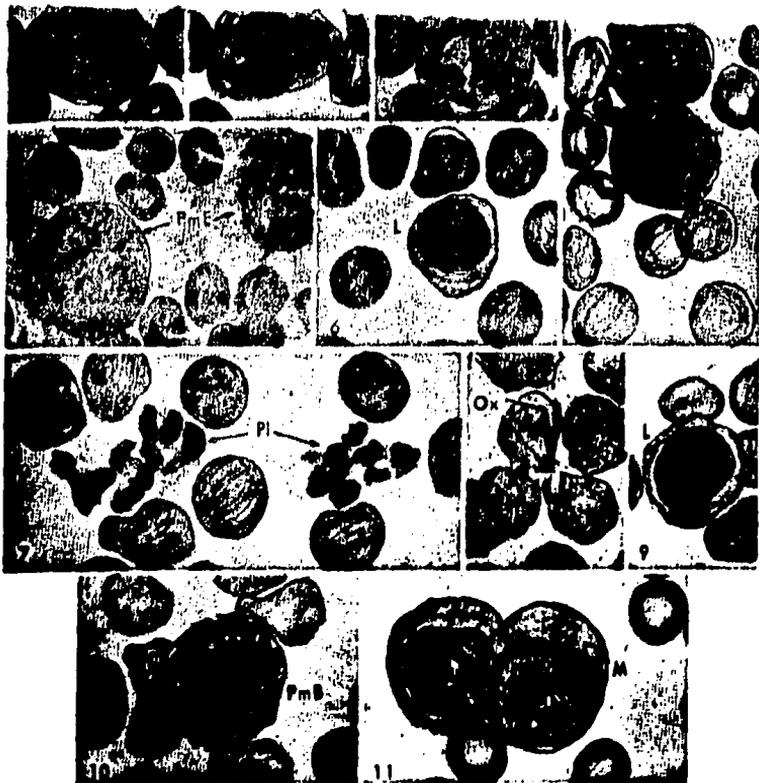


Lámina 6 SANGRE NORMAL Periférica

Linfocitos (L), monocitos (M), cristales de oxalato (anticoagulante) (Ox), polimorfonuclear basófilo (Pm B), polimorfonuclear eosinófilo (Pm E), polimorfonuclear neutrófilo (Pm N).

Datos diagnósticos: Normalmente hay del 50 al 70 por ciento de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (Pm N), 25 a 30 por ciento de linfocitos (L), 3 a 8 por ciento de monocitos (M), 1 a 4 por ciento de eosinófilos (Pm E) y 0 a 1 por ciento de basófilos (Pm B). Solamente deben utilizarse las buenas extensiones (tinción de Wright). Si la extensión es demasiado gruesa es muy difícil efectuar la diferenciación celular, especialmente entre los linfocitos y monocitos; si la extensión sanguínea es demasiado fina, la mayoría de los Pm N y de los monocitos estarán situados en los bordes y en el final de la extensión.

El primer examen de la extensión se efectuará con pequeño (100 X) o gran aumento (430 X) para comprobar la calidad de la extensión sanguínea y la distribución de los leucocitos. Una vez realizado esto, el observador puede notar las células anómalas (p. ej., normoblastos, otras células blásticas, células plasmáticas, parásitos, etcétera). Utilizando el aceite de inmersión pueden observarse: 1) el tamaño de los eritrocitos, forma y grado de hemoglobinización, presencia o ausencia de anisocitosis, poiquilocitosis, hipocromía, microcitosis, macrocitosis, policromasia, punteado basófilo y presencia de hematías nucleados; 2) maduración de los leucocitos, atipismos, cantidad de los lóbulos de los Pm N, presencia o ausencia de granulación tóxica, vacuolación, células manchadas y células en cesta; y una correlación semicuantitativa del recuento leucocitario total y parcial; 3) plaquetas,

OBTENCION DE MUESTRAS DE SANGRE.-

Introducción:

La punción suele hacerse en la vena media cefálica que corre por el interior del brazo y es visible al pliegue del codo. Hay que tomar en cuenta que la serenidad y seguridad del técnico o persona que vaya a efectuar la toma de la muestra influye sobre la tranquilidad del paciente; si el paciente está nervioso será necesario tranquilizarlo verbalmente - platicando con él y preguntándole sobre su estado patológico.

Antes de nada se deberá cerciorar de que tiene una iluminación adecuada, así como de un material completo para esa toma de muestra. En casos en los cuales resulta difícil localizar la vena, puede pedírsele al paciente que abra y cierre fuertemente su mano; ayudándole con un masaje de abajo hacia arriba. Se pueden utilizar las venas del dorso de las manos, pero el inconveniente es que estas venas son móviles. La extracción de sangre de la yugular o de los vasos femorales, debe hacerla una persona especializada.

La punción cutánea se usa cuando es difícil la obtención de la sangre venosa y en pruebas en las que se necesiten pequeñas cantidades de sangre (además de las pruebas en que se requiere tomar el tiempo de sangrado o de la determinación de grupos sanguíneos).

Esta punción se puede realizar en la yema de un dedo, -
el lóbulo de la oreja o en el talón del pie.

MATERIAL NECESARIO:

Jeringas de 3, 5 y 10 ml
Agujas hipodérmicas (20 X 38 mm)
Ligadura de hule
Tubos de ensaye (con o sin anticoagulante)
Algodón
Alcohol al 70%
Lancetas
Tubos y agujas Vacutainer
Gradilla
Cronómetro
Agitador magnético
Centrifuga
Pipetas Pasteur
Tubos capilares
Papel filtro

Técnica:

Apoyar el brazo en una superficie plana. Limpiar la región anterior del brazo con alcohol, aplicar el torniquete - con la ligadura de hule aproximadamente a 7 cm del codo.

Este torniquete debe sujetarse con un medio nudo para - que pueda quitarse jalando el extremo libre.

Quitar el tapón de plástico de la jeringa, tomar ésta - de tal manera que el bisel de la aguja se encuentre hacia arriba. Se sujeta la parte posterior del brazo del paciente a nivel del codo, se jala ligeramente, la piel sobre la vena, se introduce la aguja a la piel a lo largo de la cara lateral de la vena, hasta llegar a perforar la

vena. La sangre sube espontáneamente a la jeringa, entonces se jala ligeramente el émbolo. Cuando se tiene ya la cantidad necesaria de sangre, se suelta el torniquete, se retira la jeringa y se coloca una torunda de algodón humedecido en alcohol pidiéndole al paciente que doble su brazo presionando la torunda de 3 a 5 minutos.

El paso de la sangre de la jeringa al tubo de ensaye deberá ser lento y resbalando la sangre por las paredes de dicho tubo. En los casos en que se necesite la sangre completa se le agrega anticoagulante al tubo en que se va a depositar la sangre, mezclando perfectamente. Cuando las pruebas a realizar se hagan en suero, ésta sangre no necesita anticoagulante, la sangre se coagula en baño María (37°C) y después se centrifuga y se separa la parte que es suero (superior) de la inferior.

NOTAS:

Generalmente la sangre que se obtiene con lanceta (capilar) contiene más glucosa, más leucocitos, cifras más altas de Hb y G.R. plaquetas más bajas, pH más bajo y G.R. más frágiles.

Al efectuar una toma capilar se debe evitar presionar pues esto puede diluir la sangre con líquido intersticial -- (linfa). Siempre deberá etiquetarse perfecta y adecuadamente.

te todo cuanto material sea utilizado por cada paciente, evitando con ello la confusión de las muestras.

Antes de la toma de muestra es necesario que se sepa la procedencia de las pruebas que serán efectuadas al paciente; para así tener una adecuada conservación y manejo de la muestra. (Lynch, 1972; Medina, 1973; Balcells, 1978)

ANTICOAGULANTES

NOMBRE	CONCENTRACION	FUNCION	UTILIDAD
Mezcla de Oxalatos Amónico y potásico	6 partes O.A. y 4 partes O.P. 2 mg/ml de sangre	Impiden la coagulación sustrayendo el calcio del plasma sanguíneo por precipitación o fijación en forma no ionizada.	Puede usarse en VGM, Hb, Ht, recuento globular. Su actividad está limitada a los primeros minutos de haberse tomado la muestra ya que este anticoagulante forma cuerpos dentados en los hematíes, vacuolas y algunas otras deformaciones.
Citrato trisódico	Solución acuosa al 3.8% se mezcla a razón de 1/9 con sangre para investigaciones de coagulación.	Impide la coagulación sustrayendo el calcio del plasma sanguíneo por precipitación o fijación en forma no ionizada.	Se puede utilizar principalmente para impedir la coagulación de la sangre destinada a Transfusiones.

<p>Secuestrene (EDTA)</p>	<p>1 a 2 mg/ml de sangre</p>	<p>Impide la coagulación sus- trayendo el calcio del plasma sanguíneo por precipitación o fijación en forma no ionizada.</p>	<p>Se podría decir que este es el más utilizado ya que presenta grandes ventajas; tiene una mayor confiabilidad aun en tiempos largos después de haberse tomado la muestra (de 2 a 3 hrs) a temperatura ambiente y hasta 24 hrs a 4°C. Aparte de que no forma artefactos deformantes.</p>
<p>Heparina</p>	<p>0.1 a 0.2 ----- mg/ml de sangre</p>	<p>Neutraliza la trombina y otras fases de la activación de los factores de la coagulación.</p>	<p>No afecta el tamaño corpuscular, ni el Ht. Es el mejor anticoagulante para prevenir la hemólisis y para pruebas de fragilidad osmótica. No resulta útil para las extensiones sanguíneas ya que forma un fondo azul en las prepara-</p>

			ciones teñidas con Wright.
--	--	--	-------------------------------

* El citrato trisódico, el EDTA y la Heparina pueden utilizarse para el mismo fin; pero NO la mezcla de Oxalatos por ser tóxica.

MEDIDAS DE PRECAUCION.-

Las extensiones de sangre deben prepararse inmediatamente. Se debe mezclar perfectamente la sangre con el anticoagulante.

Si en el plazo de 2 a 3 hrs no pueden llevarse a cabo tras determinaciones la sangre deberá refrigerarse a 4°C.

** CONSECUENCIA.-

A veces entre las 6 y 24 hrs, la hinchazón de los eritrocitos aumenta el Ht y el valor corpuscular medio y disminuye la concentración corpuscular media de la Hb y la velocidad de sedimentación de los eritrocitos.

** Brittin y cols. 1969
Lanpasso 1968
Gambino y cols. 1965

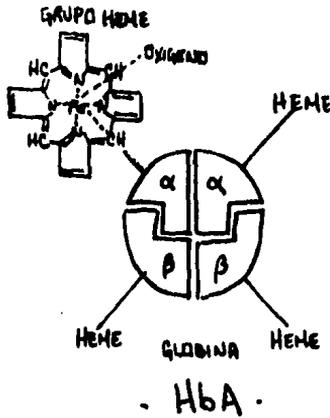
LA HEMOGLOBINA.-

Es un complejo proteico de 200 a 300 millones de moléculas casi esféricas en cada hematíe. La Hb se sintetiza normalmente en la red lipoproteica de las células de la serie eritrocítica, su principal función es el transporte de oxígeno por la sangre.

Químicamente está formada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos de ellas alfa y las otras dos beta; y éstas cade-

nas arrolladas de porfirina orientadas en dos ejes de simetría y unidas a una matriz proteica mediante átomos de ión ferroso. Los átomos ferrosos tienen 6 uniones coordinadas; 4 de ellas están unidas al nitrógeno pirrólico del radical porfirínico. La quinta unión está enlazada al nitrógeno imidazólico del radical de histidina de una cadena polipeptídica de globina y la sexta está unida a una molécula de oxígeno mediante un enlace reversible.

(Ver estructura).

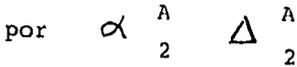


Los tres componentes importantes de la Hb normal son:

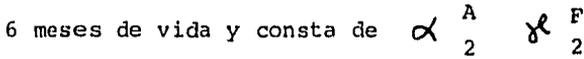
1) HbA: Hallada en la sangre del adulto normal y cuya nota-

ción es $\alpha_2^A \beta_2^A$.

2) Hb₂: Que también se encuentra en los hematíes del adulto-normal en proporciones menores que la HbA, y se representa -



3) HbF: O fetal que se halla normalmente en los primeros 4 o



Existen varios métodos para determinar cuantitativamente a la Hb, como dato importante en la determinación clínica de una anemia, principalmente, y para detectar la presencia de pigmentos anormales.

Estos métodos pueden ser: Colorimétricos, Densimétricos, Gasométricos o Químicos, basados en el principio siguiente:

Las dos Hb fisiológicas: la Hb reducida ($Hb^{++} \longrightarrow H+HCO_3$) y la oxiHb ($H^{++}O_2$), se convierten fácilmente en diversos compuestos por acción de ácidos, alcalis, sustancias oxidantes o reductoras, gases calor y otros agentes.

TECNICA PARA BIOMETRIA HEMATICA.-

A) Fundamento General: El estudio morfológico de la sangre corresponde a la parte clínica llamada Hematología.

En este estudio se realizan técnicas cualitativas de los elementos for de la sangre así como también cuantitativas para que al compararlos con los valores estandarizada-mente normales veamos realmente si hay o no alguna anomalidad.

Las pruebas realizadas en la biometría hemática son:

Hb, Ht, V.S.G., Número de eritrocitos, Número de leucocitos, Cuenta diferencial, Índices de los hematíes.

B) Material y equipo:

1. Cristalería:

Pipetas Salhi
Pipetas Thoma (GR y GB)
Cámara Ne ba er
Cubre objetos
Pipeta Pasteur
Pipetas graduadas (1 y 5 ml)
Tubos de ensaye
Tubos capilares
Tubo de Wintrobe
Matraces aforados
Vasos de precipitados

2. Aparatos:

Hemocitómetro
Espectrofotómetro
Microscopio Eléctrico
Centrífuga
Agitador Mecánico

3. Reactivos:

a) Anticoagulante EDTA 5%

EDTA (sal disódica) 5 gr

Disolver a aforar con agua hasta 1000 ml

* Por cada 5 ml de sangre agregar 0.2 ml de anticoagulante.

b) Diluyente de Drabkin

Ferricianuro de potasio 200 mg

Cianuro de potasio 50 mg

Bicarbonato de sodio 1 gr

Disolver y aforar a 1000 ml con agua destilada.

c) Solución salina al 0.85%

Cloruro de sodio 8.5 gr

Disolver a aforar a 1000 ml con agua destilada.

d) Diluyente de Turk

Colocar de 1 a 3 ml de ácido acético glacial en un matraz aforado de 100 ml y aforar con agua destilada. Agregar -- unas gotas de azul de metileno.

e) Colorante Wright

Colorante Wright 2 gr
Glicerina 30 ml
Metanol c.b.p. 1000 ml

* Este colorante debe dejarse madurar por lo menos 1 mes y filtrarse antes de usarse.

f) Solución amortiguadora para colorante Wright

Fosfato disódico 4.539 gr
Fosfato monopotásico 5.940 gr
Agua destilada 1000 ml (*)

(*) De esta solución tomar 9.54 ml y aforar con agua destilada a 2 lt (**)

(**) Esta solución debe ajustarse a pH entre 6.4 y 6.5

4. Material Biológico:

Aproximadamente 5 ml de sangre con anticoagulante.

TECNICAS.-

Metodo de Cianometahemoglobina.-

Fundamento:

La Hb reacciona con el ferricianuro y forma $m\text{taHb}$, la cual con el cianuro de potasio forma la cianometahb, las soluciones de este compuesto son relativamente estables.

Método:

- 1) Colocar en un tubo de ensaye 5 ml del reactivo de Drabkin
- 2) Agregar 0.02 ml de sangre con anticoagulante (use pipeta Salhi)
- 3) Mezcle por inversión y deje reposar 10 min.

4) Leer en el espectrofotómetro a 540 nm ajustando con solución Drabkin como blanco a 100% de transmitancia.

Cálculos:

Interpolar en la curva de calibración:

TUBO No.	SOL. DE Hb EN DILUYENTE DRA BKIN mg%	SOL. DE CIANOMETAL (O DILUYENTE DRABKIN) ml	gr DE Hb en 100 ml (gr%)
1	5	0	15
2	2.5	2.5	7.5
3	0	5	0

* Proseguir desde el paso 2.

Valores Normales:

Hombres 15.5 a 20 gr/100 ml de sangre

Mujeres 13.5 a 17 gr/100 ml de sangre

METODO DENSITOMETRICO PARA HEMOGLOBINA.-

Fundamento:

El método densitométrico para la determinación de Hb se basa en que la Hb contenida en la sangre, por la agregación de una solución reactiva se transforma cuantitativamente en Oxihemoglobina (HbO_2).

Las diversas Hb tienen espectros de absorción (D.O.- densidad optica-) características, que pueden determinarse fácilmente con el espectrofotómetro; (escala para medir la cantidad de Luz-fotones-quantos de energía que deja pasar o que retiene una substancia, % de Transmitancia y D.O. respectivamente) a diferente longitud de onda del rayo de luz- nm .

Así, la HbO_2 tiene un máximo de absorción de luz a 578 nm y por lo tanto si hay mayor absorción es mayor la concentración de HbO_2 .

Material:

Tubos de ensaye
Pipetas de 5 ml y de 0.02 (Pipeta de Salhí)
Manguera de succión
Espectofotómetro con cubetas
Algodón
Sangre anticoagulante (sin hemolizar)
Solución de Hidróxido de amonio NH_4OH 0.007 N

NH_4OH ----- 4 ml

H_2O ----- c.b.p. 1000 ml

** Esta es la solución reactiva y al mismo tiempo la solución blanco.

Método:

Poner 5 ml de reactivo de Oxihemoglobina ** en un tubo de ensaye.

Agregar 0.02 ml (20 cm) de sangre homogenizada con la pipeta de Salhí.

Mezclar bien para oxigenar debidamente la muestra (X).

Leer la absorvancia (D.O.) de la muestra (X) en el espectrofotómetro contra el blanco de reactivo, esto es: Calibrar el aparato a cero, luego introducir muestra solución blanco y calibrar con ella hasta que deje pasar el 100% de luz, sacar el tubo blanco, introducir la muestra (X) y anotar la D.O. todo esto a una longitud de onda de 578 nm.

Cálculo:

D.O. X 26.3 (factor constante = a X gr de Hb/100 ml de sangre.

Valores Normales:

Hombres: 14 - 18 gr de Hb/100 ml
Mujeres: 12 - 16 gr de Hb/100 ml
Niños: 13 - 14.5 gr de Hb/100 ml

*** Una forma actualmente utilizada en los laboratorios para calcular el valor de la Hemoglobina y compararlo con un valor normal es el siguiente: Esto nos sirve para detectar los problemas de anemia.

De acuerdo a los parámetros de referencia se calcula la concentración normal y los valores por abajo de éste promedio se consideran casos de anemia o deficiencia hemoglobínica.

HEMATOCRITO.-

Fundamento:

Se basa en la separación del paquete globular y el plasma cuando se centrifuga la sangre 5' a 10 000 r.p.m. El resultado se reporta en paquete globular/100 ml.

Técnica:

Mezcle perfectamente y con suavidad la sangre con anticoagulante (por lo menos 50 inversiones). Llene de sangre un tubo Wintrobe de hematocrito, hasta la marca 0-10 con una

pipeta de Pasteur o una jeringa con aguja metálica larga (no deben quedar burbujas al aire dentro de la columna de sangre o en el fondo del tubo). Centrifugue el tubo a 100 r.p.m. durante 30 minutos. Lea el límite superior de la columna de glóbulos rojos en la escala ascendiente de la derecha. Informe el resultado en milímetros por ciento.

Técnica (micro):

Llene con sangre venosa o capilar las dos terceras partes de dos tubos heparinizados (microhematócritos). Cierre el extremo más distante de la sangre con la flama. Centrifugue el tubo en una centrifuga especial cinco minutos a 10 000 r.p.m.

Lectura de microhematócritos:

Ponga el tubo capilar en el surco del indicador de plás tico cuide de que el extremo inferior de la columna de glóbu los rojos coincida con la línea negra de dicho indicador.

Gire el disco inferior de manera que la línea de 100% --- quede abajo de la línea roja del indicador y sosténgalo en ésta posición.

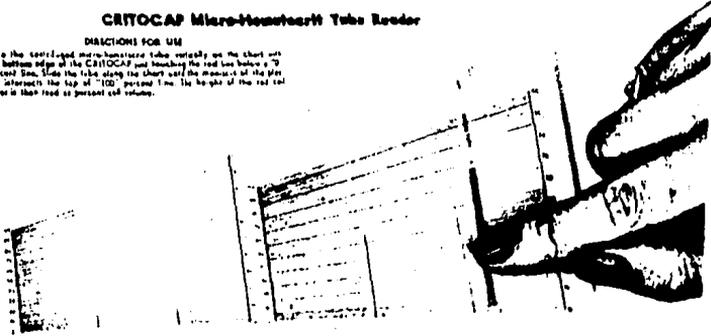
Por medio del orificio gire el disco superior para que la línea espiral intercepte el tubo capilar en la interfase plasma-aire. Gire ambos discos juntos hasta que la línea es piral intercepte el tubo capilar en la interfase glóbulos -- rojos-glóbulos blancos. El micro hematócrito en milímetros -

Hematocrito y velocidad de sedimentación

CITOCAP Micro-Hematocrit Tube Reader

DIRECTIONS FOR USE

Place the centrifuged micro-hematocrit tube vertically on the short end of the bottom edge of the CITOCAP and touching the red line below a 75 percent line. Slide the tube along the short end the amount of the plate as indicated on the top of the 100 percent line. The height of the red cell layer is then read as percent cell volume.



PLACA PARA LECTURA DE HEMATOCRITO



MICROCENTRIFUGA

por ciento se lee en el punto de la escala que queda abajo - de la línea del indicador de plástico.

LEUCOCITOS.-

Cuenta total:

Aspire sangre bien mezclada con una pipeta para glóbulos blancos hasta la marca 0.5.

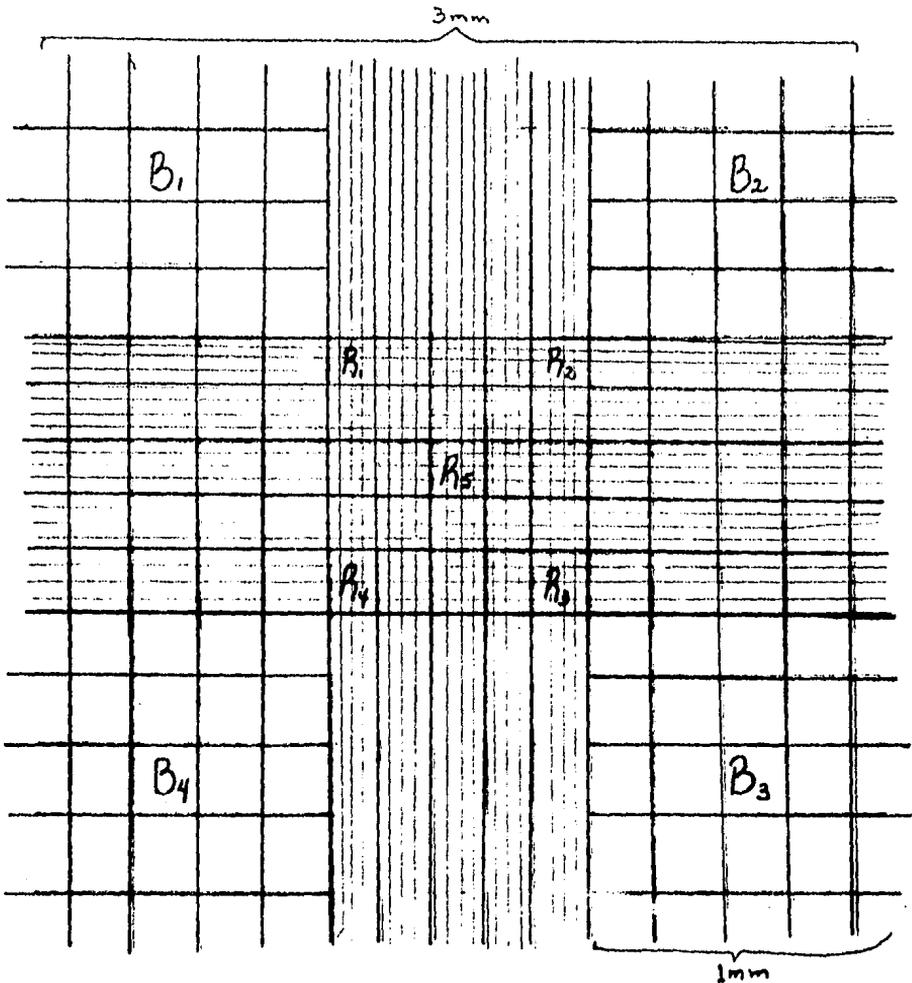
Aspire líquido de Türk con la misma pipeta hasta la mar ca 11 (debe rotarse la pipeta mientras se aspira diluyente). Agite la pipeta 90 segundos, aproximadamente para conseguir una suspensión uniforme.

Tire tres o cuatro gotas del contenido de la pipeta, lim pie la punta de ésta con gasa o papel absorbente y llene la cámara para contar glóbulos en una forma tal que la introduc ción del líquido sea uniforme.

Espere dos minutos y cuente con objetivo seco débil los cuadros grandes de las esquinas de la cuadrícula, el resultado multiplíquelo por 50 y así obtiene el número de leucocitos en un milímetro cúbico.

NOTA: Si el número de leucocitos es menor a 2000, aspirar - sangre con la pipeta de leucocitos hasta la marca 1 y diluyente hasta la marca 11; y cuente los nueve cuadros de la - cámara y el resultado se multiplica por 11.1

Si la cuenta es de 2000 a 4000, llene la pipeta con sang



* R (del 1 al 5) indican los cuadros en que se encuentran los Glóbulos Rojos ((Eritrocitos))

** B (del 1 al 4) indican los cuadros en que se encuentran los Glóbulos Blancos ((Leucocitos))

PIPETAS DE THOMA



gre hasta la marca 0.5, cuente los nueve cuadros grandes de la cuadrícula y multiplique el resultado por 22.2.

Para cuentas entre 4000 y 25000 leucocitos. llene la pipeta hasta la marca 0.5 y cuente los cuatro cuadros grandes de la cuadrícula y multiplique el resultado por 50.

Para cuentas de 25000 y 50000 leucocitos debe llenarse la pipeta para eritrocitos hasta la marca 1 y diluyente hasta la marca 1.01.

Cuente los cuadros grandes de la cuadrícula y multiplique el resultado por 250.

Para cuentas superiores a 50000 leucocitos debe hacerse dilución en una pipeta para eritrocitos hasta la marca 0.5 (1:200) o hasta la marca 1 (1:100), según el caso, y cuente los cuadros grandes de las esquinas, toda la cuadrícula central, o solo cinco pequeños cuadros de la cuadrícula central, según el caso.

Los factores por los que debe multiplicarse el resultado serán:

para dilución 1:100	250	1000	y	5000	
para dilución 1:200	500	2000	y	10000	respectivamente

Para que la cuenta de leucocitos sea lo más exacta posible no debe contarse ni menos de 100 ni más de 500 leucocitos, por lo que debe usarse la dilución adecuada.

NOTA: En la eritroblastosis fetal se cuentan todas las células nucleadas, después se hace la cuenta diferencial para ob

tener el % de normoblastos; con estos datos se calcula el número de leucocitos por mm^3 mediante una regla de tres.

Cuenta diferencial:

Haga una extensión de sangre bien mezclada, recientemente extraída o capilar. Deje que seque. Cúbrela con el colorante de Wright (de 1.5 a 2.0 minutos). Añada el doble de la solución amortiguadora $\text{pH} = 6.4$ y deje actuar la mezcla 6 minutos. Lave al chorro de agua y deje secar. Observar con el objetivo seco al microscopio. Observar con el objetivo de inmersión para hacer la diferenciación de las células y anotar las normalidades de cada una de los elementos de la serie blanca, de la serie roja y de las plaquetas.

NOTA: Los blastos de la serie blanca y las células plasmáticas deben entrar en la cuenta de 100 células, en cambio los normoblastos deben contarse fuera de las 100 células.

Valores Normales:

a) Hemoglobina:

Hombres: de 15.5 a 20.0 g/100 ml de sangre

Mujeres: de 13.5 a 17.0 g/100 ml de sangre

b) Hematocrito:

Hombres: $47\% \pm 7$

Mujeres: $42\% \pm 5$

c) Leucocitos:

Cuenta total: de 5000 a 10000 en 1.0 mm^3

Cuenta diferencial:

linfocitos:	de	24	a	38%
Monocitos	de	4	a	9%
Neutrófilos	de	50	a	70%
Eosinófilos	de	2	a	4%
Basófilos	de	0	a	1%
Mielocitos		0		
Metamielocitos		0		
En banda	de	4	a	7%
Segmentados	de	45	a	65%

Se cuentan 100 células en total o 500 células si es necesario un mayor parámetro.

Bibliografía:

Wintrobe, W.W. 1933: Macroscopic Examination of the Blood. Am. J. Med. Sc. 185:58

Crosby W.H.; Mann J.I. y Furth F.N. 1954: Standardizing a Method for Clinical Hemoglobinometry U.S. Armed Forces Md. J.5 :693.

Drabkin D.L. y Austin J.H. 1936: Spectrophotometric Studies. II preparations from washed blood cells Nitric Oxide Hemoglobin and Sulf Hemoglobin J. Biol. Chem. 112:51.

VELOCIDAD DE SEDIMENTACION GLOBULAR

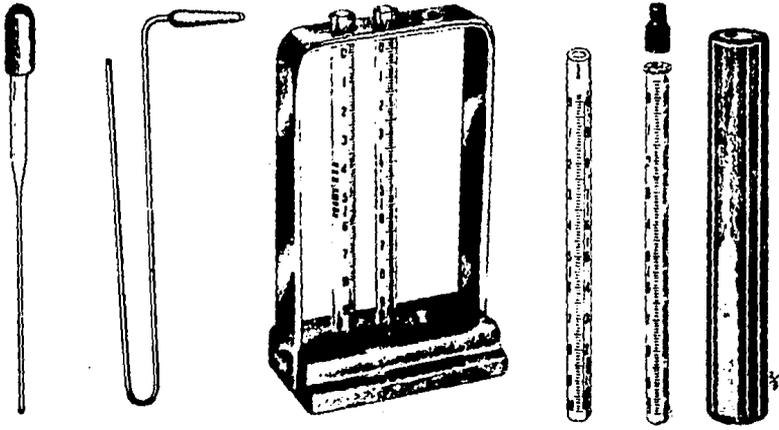
METODO DE WINTROBE.

El fundamento básico de esta prueba es que ya sabemos que la sangre es una suspensión de elementos, estructuras o sistemas individuales cada uno cumpliendo sus funciones en el plasma por lo tanto la sedimentación de los glóbulos es un fenómeno que se observa siempre que una muestra sangre que se le ha puesto anticoagulante y se tiene en posición vertical, puesto que por gravedad son más pesados que el plasma; pero la rapidéz de esta sedimentación puede ser variable por el cambio de las propiedades fisicoquímicas del plasma por lo que su determinación nos es útil para el diagnóstico y pronóstico en procesos infecciosos u orgánicos así como para seguir su evolución, en donde estas propiedades se ven alternadas.

El método de Wintrobe para determinar la sedimentación globular media se basa en determinar la rapidéz de la caída de los glóbulos de la sangre con anticoagulante e introducirlos en unas pipetas específicas (tubos de Wintrobe), en posición vertical y durante un tiempo determinado.

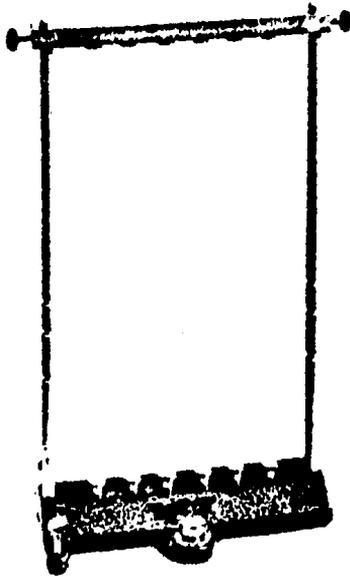
Material:

Tubos de Wintrobe (diámetro de 3 mm con divisiones en mm del 0 al 10)
Siendo la escala: de izq. de 0 a 10 descendiente para VSG
de der. de 0 a 10 ascendiente para Ht



PIPETA PASTEUR

GRADILLA PARA TUBO DE WINTROBE



OTRO TIPO DE GRADILLA PARA TUBO DE WINTROBE

Pipetas llenadoras
Gradilla de sedimentación
Reloj Cronómetro
Sangre con anticoagulante

Método:

Se homogeniza bien la sangre
Se llena la pipeta llenadora (puede hacerse con una pipeta
Pasteur con punta larga delgada)
Llenar el tubo de Wintrobe ((cuidando de no hacer burbujas))
Se llena el tubo hasta la marca 0 lo más exacto posible
Se coloca en la gradilla de sedimentación
Se dá un tiempo determinado y se hace la lectura en mm.

Valor Normal:

Hombres: 0 a 6.5 mm/1 hora
Mujeres: 0 a 15.0 mm/1 hora

* Esta prueba es relativamente lenta en la sangre normal, sin
embargo en muchas enfermedades por ejemplo los estados infla
matorios, degenerativos o necrobióticos, tienen lugar altera
ciones de las propiedades fisicoquímicas del plasma. Estas
alteraciones afectan al plasma y a sus coloides, con un au-
mento de fibrinógeno plasmático, una alteración de la concen-
tración de proteínas plasmáticas y una alteración en la pro-
porción entre las distintas fracciones proteicas.

Las alteraciones pueden afectar la superficie del hema-
tíe, originando que al agruparse o apilarse los hematies ten-
gan una superficie menor por lo que la VSG va a ser aumenta-
da.

Por el contrario, en las enfermedades que tienen un au-

mento de fibrinógeno o de globulinas, existe una disminución de la agrupación de los hematíes y como consecuencia una disminución de la VSG.

VALORES CORPUSCULARES DE LOS HEMATÍES.-

Indice de los Hematíes.

Wintrobe ha introducido procedimientos para el estudio de la anemia que han sustituido a los estandares cuantitativos objetivos por impresiones subjetivas: volumen corpuscular medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular media (HCM) y Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina (CCMH).

Se necesitan tres valores básicos, calculados con precisión: recuento de hematíes, hemoglobina y hematocrito. Se emplea para ello sangre con anticoagulante.

V.G.M. Es el volumen medio de los hematíes individuales; en micras cúbicas (μ^3).

Cálculo:

$$\text{V.G.M.} = \frac{\text{Hematocrito (\%)} \times 10}{\text{Num. de Hematíes (millones/\mu l)}}$$

Valor normal: 90 ± 8 fl/célula **

* 1 fl (femtolitro) = 10^{-15} lt (litros)

o micra cúbica ---- μ^3

* μ l: microlitos

** Si el V.G.M. aumenta se trata de una anemia macrocítica
Si el V.G.M. disminuye se trata de una anemia Hipocrómica
Microcítica
(Esto es de acuerdo al valor normal)

H.C.M. Es el contenido (peso) de hemoglobina en un hematíe individual medio, en microgammas (μg) o picogramos (pg).

Cálculo:

$$\text{H.C.M.} = \frac{\text{Hemoglobina (g/100 ml)} \times 10}{\text{Num. de Hematíes (millones/ l)}}$$

Valor Normal: 30 ± 3 pg ***

*** Si aumenta se trata de una anemia macrocítica y si disminuye se trata de una anemia microcítica Hipocromica.

C.C.M.H. Es la concentración media de hemoglobina por 100 ml de hematíes concentrados en %.

Cálculo:

$$\text{C.C.M.H.} = \frac{\text{Hemoglobina (g/ml)} \times 100}{\text{Hematocrito (\%)}}$$

Valor Normal: $34 \pm 2\%$

Si aumenta se trata de una anemia normocromica
Si disminuye se trata de una anemia Hipocromica.

Los índices de los Hematíes se emplean para determinar el tipo morfológico de Anemias, lo cual es útil para elaborar un diagnóstico para el paciente con anemia.

(Platt, 1972; Tietz, 1972; Weiss, 1977; Carpenter, 1967; George, 1963; Byrd, 1978; Castellanos, 1965; Castelazo, 1978; Food-Sanford, 1978; Gordon, 1976; Limman, 1975).

COAGULACION SANGUINEA

COAGULACION SANGUINEA

La coagulación sanguínea o hemostásis es el proceso - mediante el cual se detiene la sangre dentro del sistema vas-
cular, a pesar de la lesión en la pared vascular.

En 1905, Morawite publicó la teoría Clásica de la Coa-
gulación. Esta teoría fué un intento para explicar la obser-
vación de que los extractos de tejido (tromboplastina) acele-
rarían la coagulación de la sangre en presencia de calcio.
Así pues, en la fase I la protrombina con iones calcio y --
tromboplastina (tisular) formaría la trombina y, en la fase
II el fibrinógeno y la trombina formarían la fibrina.

El concepto moderno de la Coagulación divide el proceso
en tres fases; las diversas substancias que intervienen en -
la coagulación sanguínea reciben el nombre de factores de --
coagulación y se designan mediante números romanos del I al
XIII, excluyendo el VI.

Las fases básicas son:

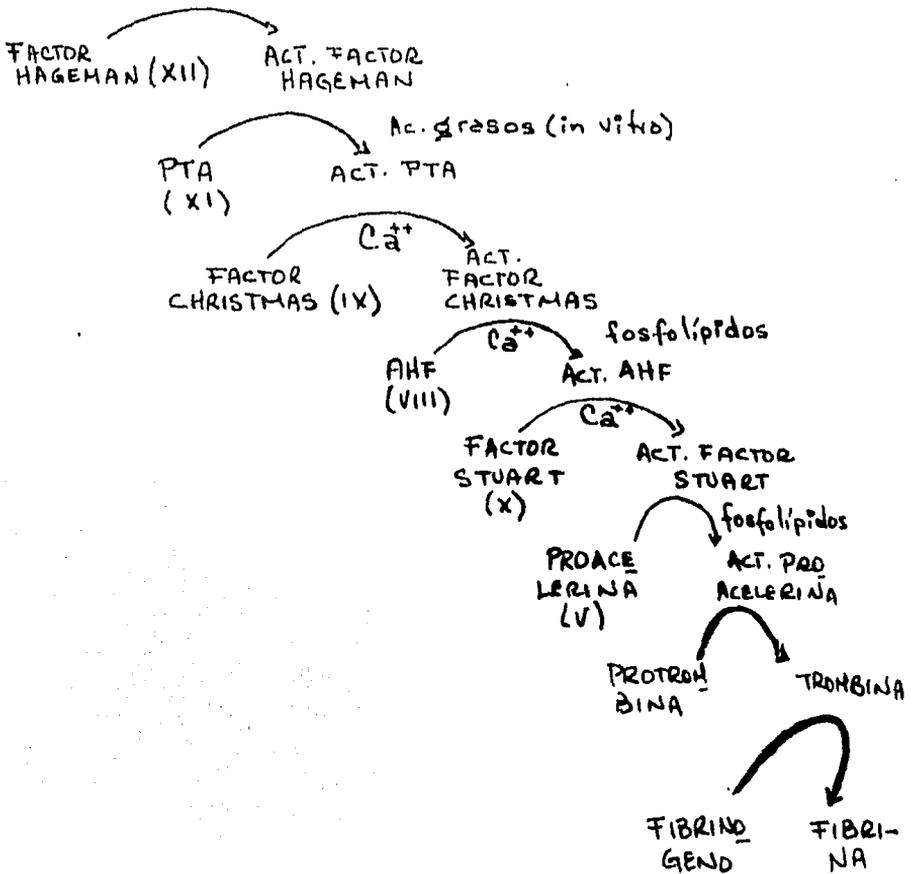
1. La formación de tromboplastina.
2. La conversión de protrombina a trombina
3. La conversión de fibrinógeno a fibrina.

(Ver esquema de la Teoría de la Cascada de Breckenridge y Ra-
tnoff)

Los factores de coagulación sanguínea son:

- | | |
|----|-------------|
| I | Fibrinógeno |
| II | Protrombina |

CASCADA DE LA COAGULACION



Tarda 7 minutos hasta factor Stuart

Davie, E.W. y Ratnoff, O.D. 1964.

Mecanismo en cascada para el proceso intrínseco de la coagulación sanguínea, Science, 145:1310

- III Factor Hístico
- IV Calcio
- V Proaccelerina
- VI *El factor VI no existe
- VII Proconvertina
- VIII Factor antihemofílico A
- IX Factor antihemofílico B
- X Factor Stuar-Power
- XI Factor antiplasminico de la tromboplastina
- XII Factor Hageman
- XIII Factor Laki-Lovand ó Estabilizador de la fibrina.

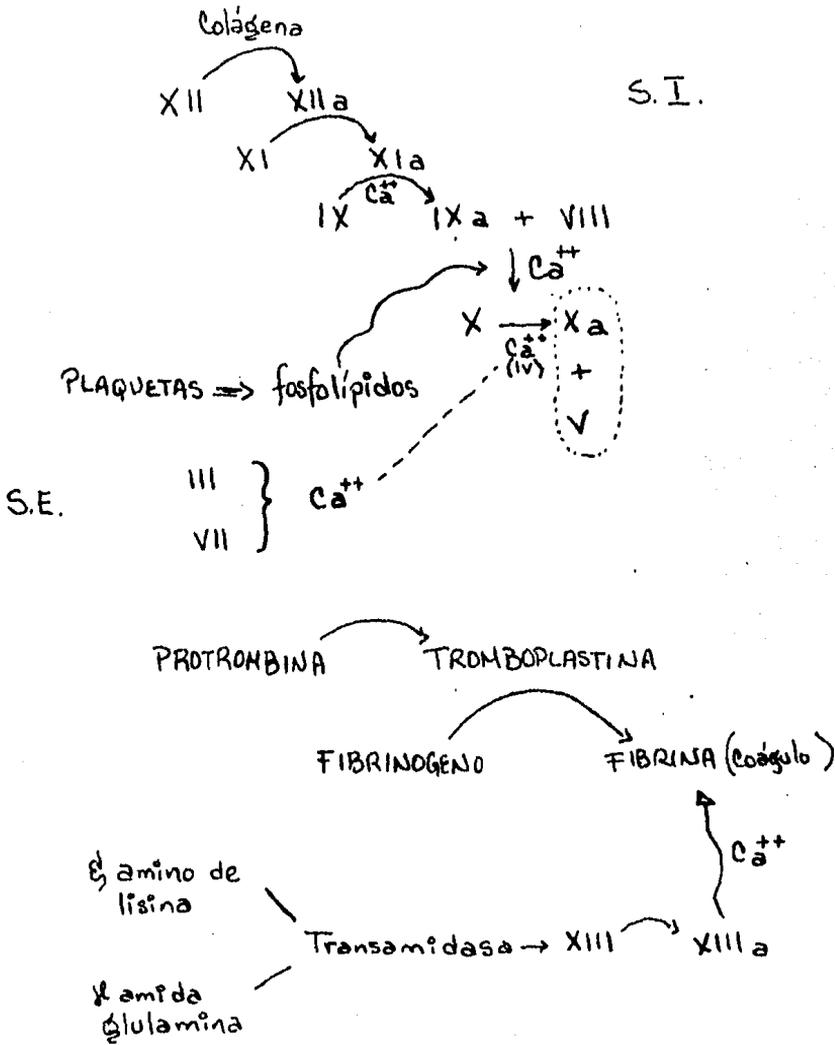
La fase I puede tener lugar en dos formas distintas:

1. La tromboplastina tisular III es presencia de los factores plasmáticos V y X y de Ca (IV), activa la protrombina a trombina. Se precisa también el factor VII y parece actuar como un cofactor de la tromboplastina tisular (III). Como la tromboplastina tisular no se halla habitualmente en la sangre circulante, el sistema en el que se utiliza se llama Extrinseco.
2. El factor VII no se requiere en este proceso, pero son importantes los factores VIII IX, XI y XII y las plaquetas (factor plaquetario 3). Además los factores V y X y el Ca (IV). Como todos los componentes de este sistema se hallan en la sangre este se llama Intrínseco.

La fase dos comprende la conversión de Protrombina a trombina; esta fase es una vía común de los sistemas intrínseco y extrínseco. (Ver esquema)

La fase III es la única reacción visible. El fibrinógeno soluble polimerizado por el sistema proteolítico previa-

VIA COMUN DE LOS SISTEMAS INTRINSECO Y EXTRINSECO EN LA CASCA DA DE LA COAGULACION SANGUINEA.



mente formado, que es la trombina. Como consecuencia de estas tres fases resulta un coágulo insoluble de fibrina.

Las plaquetas desempeñan un papel importante en el proceso de la coagulación sanguínea.

Estas células son provenientes de los megacariocitos de la médula ósea y se encuentran en la sangre, la cantidad de 250 000 plaquetas en 1 mm^3 en condiciones normales, y los depósitos de almacenamiento son el bazo y los pulmones. Su vida media es de menos de una semana, con destrucción en el S.R.E. como hígado y bazo.

Existen factores plaquetarios que provienen del interior de las plaquetas y son importantes en el mecanismo de la coagulación.

El factor plaquetario I y el factor plaquetario II son aceleradores del proceso de la coagulación y el factor plaquetario III, que es una lipoproteína desempeña un papel primordial en la formación del acelerador intrínseco de la protrombina actuando reciprocamente con el factor X y el factor V.

La adhesividad o aglomeración de las plaquetas constituye su propiedad de adherirse a células dañadas, formando agregados en el colágeno de los vasos sanguíneos dañados. Después de la aglutinación, las membranas plaquetarias se lisan y las plaquetas coalescen formando un tapón más duradero.

Al igual que el factor plaquetario III, también se liberan lisosomas, serotonina y otras sustancias vasoactivas.

La integridad de la pared vascular depende de la presencia de las plaquetas.

Transtornos Hemorrágicos.-

Se le llama hemorragia a la salida constante de sangre, por alguna pared vascular. También puede ser llamada Diastesis Hemorrágica, y puede ser debida a:

- * Un aumento de fragilidad de los vasos sanguíneos.
- * Una disminución plaquetaria.
- * Un transtorno del mecanismo de coagulación sanguínea o hemostático.
- * Una combinación de disminución plaquetaria y transtorno en el mecanismo hemostático.

Las pruebas de laboratorio para detectar algún transtorno hemorrágico son:

1. Tiempo de sangrado.
2. Tiempo de coagulación
3. Conteo de plaquetas
4. Tiempo de retracción del coágulo
5. Tiempo de protrombina
6. Fibrinógeno (cuantificación)
7. Tiempo parcial de tromboplastina
8. Prueba de Torniquete

(Stanley, 1976; Widmann, 1978; Harper, 1978).

TIEMPO DE SANGRADO.-

(técnica de Duke):

A. Fundamento:

La lesión de una pared vascular produce vasoconstricción refleja inmediata y temporal, aglutinación de las plaquetas en el sitio de la lesión; las plaquetas liberan serotonina, sustancia que causa una vasoconstricción más prolongada de los vasos lesionados, además de las plaquetas y de los tejidos se libera tromboplastina que desencadena el proceso que termina con la coagulación de la sangre.

B. Material y equipo:

- a) Lancetas desechables
- b) Tiras de papel filtro
- c) Cronómetro de mano.

C. Método:

1. Técnica:

- a) Limpie con una torunda con alcohol el lóbulo de la oreja y espere a que se evapore el exeso de alcohol.
- b) Puncione el lóbulo de la oreja con una lanceta desechable.
- c) Seque la sangre sin tocar la piel cada 15 segundos hasta que cese la hemorragia.

2. Valores Normales:

De uno a tres minutos.

D. Medidas de seguridad y control:

La prueba también puede efectuarse en la yema de un dedo; no se debe apretar la zona puncionada.

E. Bibliografía:

Duke, W.W. : The relation of blood platelets to hemorrhagic disease. J.A.M.A. 55:1195, 1910.

TIEMPO DE COAGULACION DE LA SANGRE COMPLETA.-

(Metodo de Lee y White).

Fundamento:

La prueba suministra un índice aproximado de eficacia — global del mecanismo de la coagulación. La prueba carece de valor para las insuficiencias ligeras de distintos factores, porque, por ejemplo, basta una cantidad pequeña de trombina para producir un coágulo de fibrina.

Método:

Extraer sangre venosa (aproximadamente 3 ml) con una jeringa. Colocar tres tubos delgados y depositar en cada uno aproximadamente 1 ml de sangre. Poner en marcha el cronómetro desde el momento en que entra la sangre a la jeringa.** Tomar el tiempo que tarde en formarse el coágulo en los tubos y hacer un promedio de los tres tiempos, para obtener el resultado.

Valores Normales:

De cuatro a diez minutos.

**NOTA: Durante el tiempo en que se coagula la sangre se deben tener los tubos a temperatura de 37°C en baño María.

RETRACCION DEL COAGULO.-

A. Fundamento:

La rapidéz e intensidad de la retracción del coágulo de pende del número y calidad de las plaquetas y del volumen de los glóbulos rojos.

B. Material y Equipo:

1. Tubos de centrifuga graduados de 15 ml
2. Alambre de hierro de 1.5 mm de diámetro enroscado de manera que tenga 6 vueltas por cada 2.5 cm. La espiral debe tener unos 5 cm de largo.

c. Método:

1. Material Biológico:

5 ml de sangre sin anticoagulante.

2. Técnica:

- a) Se deposita la sangre en un tubo de centrifuga hasta la marca de 5 ml.
- b) Se coloca dentro del tubo de alambre enroscado.
- c) Se incuba el tubo en baño de agua a 37°C y una hora después de haberse formado el coágulo se saca el tubo del baño.
- d) Se quita el alambre permitiendo el drenaje del suero.
- e) El volumen del suero y de las células exprimidas del coágulo se lee directamente en el tubo; el resultado se expresa como porcentaje del volumen inicial de 5 ml de sangre suministraron 3 ml de líquido.

La retracción es de $\frac{3 \times 100}{5} = 60$ por ciento.

3. Valores Normales:

Entre 48 y 64 por ciento.

D. Medidas de control y seguridad:

Se debe tener cuidado de mantener la temperatura a 37°C - ya que esta es la temperatura corporal.

E. Bibliografía:

Ackroyd, J.F.: A simple method of estimating clot retraction with a survey of normal values and the changes that occur with menstruation, Clin. Sc. Lond., 7:231, 1949.

Macfarlane, R.G.: A simple method for measuring clot retraction. Lancet, 1:1199, 1939.

CONTEO DE PLAQUETAS. __

Introducción:

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos de megacariocitos; tienen una función importante en la coagulación y en el mantenimiento de la integridad vascular.

Fundamento:

Prueba diagnóstica que se refiere al conteo directo de los elementos sanguíneos (trombocitos o plaquetas) que toman parte activa en el proceso de coagulación y mecanismo hemostático como ayuda en la detección de trastornos en dicho mecanismo, deficiencias nutricionales (minerales), anemias, trastornos congénitos y hereditarios en las plaquetas.

Material y Equipo:

Pipetas de Thoma (conteo de eritrocitos)
Caja de peltri
Papel filtro

Cámara de Neubauer
Hematocitómetro.

Método de la Técnica:

(Método directo con Oxalato de Amonio)

Reactivo:

Solución de Oxalato de Amónio al 1%
Azul de cresilo brillante 0.05
(0.25 mg/100 ml de solución)

NOTA: La solución debe filtrarse y quedarse en refrigeración.

Material biológico:

1 ml de sangre con anticoagulante.

Procedimiento:

- a) Llenar con sangre hasta la marca 0.5 de la pipeta de Thoma
- b) Agregar líquido diluyente hasta la marca 101.
- c) Agitar de 3 a 5 minutos en el hemocitómetro
- d) Llenar ambos lados de la cámara de Neubauer.
- e) Dejar reposar la cámara dentro de una caja de peltri con un papel filtro húmedo, con el fin de que las plaquetas se sedimenten.
- f) Contar las plaquetas con el objetivo de 40X (en los cuadrados de conteo de glóbulos rojos) en ambos lados de la cámara.

Valores Normales:

De 250000 a 500000 plaquetas/mm³ de sangre

NOTA: Algunos autores toman desde 150000 hasta 450000 Plaquetas/mm³ de sangre como valor normal.

Bibliografía:

- *Borow Manual 1976. Respuestas fisiológicas en la salud, en la enfermedad. Editorial El Manual Moderno, S.A.
- *Todd, Sanford 1980. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Editorial Salvat.
- *Harper, 1976. El Manual de Química Fisiológica. Editorial El Manual Moderno.

TIEMPO DE PROTOMBINA.-

(Técnica de Quick):

A. Fundamento:

La tromboplastina en presencia de iones de calcio actúa sobre la protrombina y produce trombina, la cual actúa sobre el fibrinógeno y lo convierte en fibrina, sustancia que es responsable de la formación del coágulo.

B. Material y equipo:

1. Sustancias:

- a) Tromboplastina con calcio.
- b) Oxalato de sodio.

2. Reactivos:

- a) Anticoagulante para protrombina:
Solución 0.1 M de Oxalato de sodio.
- b) Tromboplastina cálcica:
Reconstituir el frasco según las instrucciones de la casa comercial.

C. Método:

1. Material biológico:

Nueve partes de sangre con una parte de anticoagulante
Ejemplo: 0:25 ml de anticoagulante para protrombina con 2.25 ml de sangre, mezclar por inversiones repetidas.

2. Técnica:

- a) Centrifugue la sangre a 1500 r.p.m. durante 5 minutos.
- b) Fonga 0.1 ml de plasma en un tubo de 10 por 75 mm en baño de agua a 37°C.
- c) Añada 0.2 ml de tromboplastina con calcio y simultáneamente empiece a medir el tiempo con un cronómetro.
- d) Agite el tubo dentro del baño de agua durante dos a tres segundos, después déjelo reposar hasta los 10 segundos.
- e) En seguida examina el tubo hasta que aparezca el coágulo,

en este momento para el cronómetro y anote el número de segundos que marca.

3. Cálculo:

Siempre efectúe la prueba con un plasma testigo normal y el porcentaje de la actividad de la protrombina es igual a:
Tiempo de protrombina del plasma testigo normal (en segundos)
8.7 por ciento.

Tiempo de protrombina del plasma del paciente (en segundos)
8.7

También puede usarse la tabla de convers

4. Valores Normales:

Tiempo de protrombina: de 80 a 100 por ciento de actividad.

D. Medidas de seguridad y control: Tener cuidado en tomar el tiempo correcto y la temperatura de 37°C

E. Bibliografía:

Quick, A.J.: Hemorrhagic disease Philadelphia, Lea and Febiger 1957.

Quick, A.J. y Hussey, C.: Prothrombin and the one stage prothrombin time. Brit. Med. J., 1:934 1955.

Tiempo de protrombina de Owren.-

(técnica de Owren, trombotest)

A Fundamento:

El tiempo de protrombina de Owren depende de la concentración de los factores II, VII, IX, y X; actúe específicamente en la deficiencia de estos cuatro factores que son reducidos por el tratamiento con anticoagulantes orales e indica cual de ellos es el más bajo.

B. Material y equipo:

1. Sustancias:

- a) Trombotest
- b) Cloruro de calcio 0.0032 M

2. Material:

Lancetas
Algodón
Alcohol al 70%
Pipetas 0.1 ml
Cronómetro
Tina de Baño María
Termómetro

C. Metodo en la sangre capilar:

1. Material biológico:

El dedo del paciente o el lóbulo de la oreja se limpian perfectamente y se pican con lanceta estéril. Tomar con una pipeta 0.05 ml de las primeras gotas de sangre.

2. Técnica:

- a) La ampula de trombotest se reconstituye con agua destilada.
- b) Pipetear 0.25 ml de trombotest en cada uno de los tubos y poner en baño de agua a 37°C por lo menos durante tres minutos, pero no más de 60.
- c) Colectar 0.05 ml de sangre capilar como se describió antes. Inmediatamente soplar para que la sangre quede en el tubo que contiene 0.25 ml de trombotest y marcar el cronómetro inmediatamente.
- d) Mezclar la sangre y el reactivo por inclinación del tubo. Dejar el tubo en baño de agua a 37°C por 30 segundos en el caso de pacientes normales o 50 segundos si los pacientes están con terapia de anticoagulantes.
- e) Remover el tubo por intervalos cortos de baño de agua y examinar la formación del coágulo.
- f) Cuando se observe el coágulo, detener el cronómetro y ver el tiempo transcurrido.

Método en la sangre venosa.-

1. Material biológico:

Colectar 4.5 ml de sangre venosa e inmediatamente transferrirla a un tubo silconizado que contenga 0.5 ml de citrato de sodio al 3.13 por ciento.

2. Técnica:

Según el mismo procedimiento que se describió para el método capilar, sustituyendo 0.05 ml de sangre capilar por sangre venosa.

3. Cálculos:

a) Habiendo obtenido el tiempo de coagulación en segundos, el porcentaje de la actividad de coagulación se lee en la curva que acompaña a cada caja del trombotest. Cada curva está marcada con el número de lote que corresponde. Por lo que siempre hay que comprobar que la curva y la ampula del reactivo tengan el mismo número de lote.

La curva superior corresponde a la sangre venosa y la cuva inferior a la sangre capilar.

b) Valores Normales:

70 por ciento a 130 por ciento de actividad.

D. Medidas de seguridad y control:

Tener cuidado de tomar el tiempo correcto y la temperatura de 37°C.

E. Bibliografía:

Owren, P.A.: Trombotest. A new method controlling anticoagulant therapy. Lancet, 11:754, 1959.

Owren, P.A.:Control of anticoagulant therapy. Lancet
11:600, 1960.

TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL.-

A. Fundamento:

Como el extracto de cefalina no coagula el plasma hemofílico tan rápidamente como el normal, se le llamó tromboplastina parcial para diferenciarlo de la tromboplastina completa, la cual coagula ambos plasmas en el mismo tiempo.

Esta prueba es sensible a la deficiencia de todos los factores plasmáticos de la coagulación exep^to el factor VII y el factor plaquetario.

B. Material y Equipo:

1. Reactivos:

- a) Tromboplastina parcial, equipo para 50 pruebas (reconstruya la cefalina de acuerdo con las instrucciones de cada equipo)
- b) Solución de cloruro de calcio 0.03 M
- c) Solución de Oxala o de sodio al 0.1 M

C. Método:

1. Material biológico:

Colocar 4.5 ml de sangre en un tubo de 13 por 100 mm - conteniendo 0.5 ml de anticoagulante para protrombina. Invertir el tubo varias veces para impedir la coagulación.

Centrifugue a 2000 r.p.m. durante 10 minutos, transfiera el plasma a otro tubo y concérvelo entre 0 y 5°C hasta el momento de la prueba, esta debe efectuarse antes de dos horas.

2. Técnica:

- a) Precalentar en baño de agua a 37°C durante tres minutos - los tubos de 10 por 75 mm y el volumen de solución suficiente para el número de pruebas que se va a efectuar (0.1 ml por prueba).
- b) Ponga 0.1 ml de la tromboplastina parcial reconstituida - en uno de los tubos de 12 por 75 mm precalentados.
- c) Añada 0.1 ml del plasma en estudio y mezcle el contenido mediante un giro rápido. Incube a 37°C durante tres minutos, midiendo exactamente el tiempo con un cronómetro.
- d) Añada 0.1 ml de solución de cloruro de calcio 0.02 M precalentada, expulsándola rápidamente de una jeringa tuberculina de 0.25 ml o de una pipeta de 0.2 ml; simultáneamente empiece a medir el tiempo con un cronómetro. Mezcle el contenido del tubo mediante un giro rápido.
- e) Retire el tubo del baño de agua a los 30 segundos aproximadamente, inclínelo con suavidad de un lado a otro con una velocidad no mayor de una vez por segundo. Vigile la aparición de un gel y detenga el cronómetro en el momento final de su formación, no cuando las partículas de caolín estén solo parcialmente unidas entre sí.

3. Valores Normales:

De 30 a 50 segundos

D. Bibliografía:

Proctor, R.R., y Rapaport, S.I.: The partial thromboplastin time with Kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. Amer. J. Clin. Path, 36 212, 1961.

TIEMPO DE TROMBINA.-

A. Fundamento:

La trombina es una enzima derivada de la protrombina, una molécula de protrombina produce una de trombina. Esta se mide por su acción sobre el fibrinógeno. Owren define una unidad de trombina como: La cantidad que en el volumen de 1.0 ml. contienen 0.1 por ciento de fibrinógeno humano libre de profibrina a 37°C, pH de 7.3 y 0.154 M de concentración de cloruro de sodio coagula en 15 segundos.

El tiempo de trombina mide el tiempo necesario para convertir el fibrinógeno en fibrina. Está prolongando cuando -- hay disminución del fibrinógeno, anticoagulante del tipo de la heparina y productos de la degradación fibrinolítica.

B. Material y equipo:

1. Reactivos preparación:

- a) Solución de citrato de sodio al 3.8 por ciento
Citrato de sodio 3.8 gr
Agua destilada c.b.p 100 ml
Disolver a aforar.
- b) Solución de cloruro de sodio al 0.85 por ciento
Cloruro de sodio al 0.85 g
Agua destilada c.b.p. 100 ml
Disolver y aforar
- c) Solución de trombina 0.5 unidades en 1.0 ml
Puede hacerse con dos preparados comerciales el fibrindex y la trombina tópicæ bovina.
Ampula con 50 unidades de trombina: Se reconstituye -- una ampolleta con 1.0 ml de solución de cloruro de sodio al 0.85 por ciento, se mezcla perfectamente, se to

ma una parte de la solución y se hace una dilución 1:20 con solución de cloruro de sodio al 0.85 por ciento, esta dilución habitualmente coagula igual volumen de un plasma normal en 18 o 22 segundos.

Trombina tónica: Se reconstituye un vial con 5000 unidades de trombina tónica bovina con 10 ml de una solución salina al 0.85 por ciento, futuras diluciones se harán con solución de cloruro de calcio 0.025 M hasta obtener una solución de trabajo que coagule igual volumen de un plasma normal en 18 a 22 segundos, una dilución 1:1000 dará una dilución de 0.5 unidades en un mililitro, la cual es satisfactoria. El resto de la solución de trombina disuelta en la solución glicerolada debe conservarse en el congelador y sacarse del recipiente con una aguja y jeringa estériles.

d) Plasma citratado normal (control)

c. Metodo:

1. Material biológico (muestra):

Se hace una punción venosa limpia, se extraen 4.5 ml de sangre y se colocan en un tubo de 12 por 75 que contenga 0.5 ml de solución de citrato de sodio al 3.8 por ciento. Se centrifuga 5 minutos a 3000 r.p.m. y se separa el plasma.

2. Técnica:

Se hace por duplicado con plasma normal y problema.

- a) Se ponen 0.2 ml de plasma en un tubo de 12 por 75 mm que se coloca en baño de agua a 37°C durante tres minutos.
- b) Se añaden 0.2 ml de solución de trombina diluida y se empieza a medir el tiempo con un cronómetro, se mezcla suavemente el contenido del tubo y se espera durante 15 segundos.
- c) Se empieza a observar el tubo en el momento en que se forma el coágulo, se para el cronómetro y se anota el número en segundos.
Normalmente es de 18 a 22 segundos.
- d) Cuando el problema coagula en más de 26 segundos, es decir en más de una relación de 1.3 entonces se hacen diluciones del plasma problema con plasma normal de la manera siguiente:

0.1 ml de plasma problema + 0.1 ml de plasma normal

0.05 ml de plasma problema + 0.15 ml de plasma normal

0.02 ml de plasma problema + 0.18 ml de plasma normal.

Si con las diluciones del tiempo de trombina se corrige a lo normal, se interpreta como deficiencia de fibrinógeno, si no se corrige se interpreta como que existe algún factor antitrombínico.

El plasma problema y el control pueden ser incubados a 37°C por un periodo de dos horas y después se mide el tiempo de trombina; si el tiempo de trombina de plasma es del doble del tiempo de trombina del plasma normal debe pensarse en fibrinólisis y debe efectuarse para prueba de lisis de la euglobulina, que es más segura para descubrir esta anomalía.

3. Valores Normales:

De 18 a 22 segundos.

D. Bibliografía:

Hardisty, R.M. y Ingram, G.I.C.: Bleeding disorders investigation and management. Philadelphia, F.A. Davis Co, 1966, pág. 285

Sirridge M.S.: Laboratoru evaluation of hemostasis Philadelphia, Lea & Febiger, 1967, pág. 133.

QUIMICA SANGUINEA

QUIMICA SANGUINEA

Las sustancias que circulan en la sangre tienen gran importancia biológica en la economía corporal de los individuos, sin embargo en la práctica médica estas sustancias -- tienen valor diagnóstico dándole en el laboratorio el nombre de Analitos. (Bhagavan, 1978).

Estos Analitos los podemos dividir para su estudio en varios grupos donde agrupamos sustancias que tienen características semejantes; así tenemos:

1. Carbohidratos (Glucosa)

2. Compuestos Nitrogenados:

- a) Proteicos (albúmina, globulina)
- b) No proteicos (urea , creatinina, ácido úrico, etc)

3. Lípidos:

- a) Grasas neutras o Triglicéridos
- b) Acidos grasos libres
- c) Colesterol (esterificado, no esterificado)

Desde el punto de vista clínico su importancia radica en que estos elementos al aumentar o disminuir provocan cambios metabólicos que desequilibran la Homeostásis corporal -- traduciéndose en signos ó síntomas de una enfermedad que incluso puede desencadenar la muerte del paciente.

Cada Analito tiene una función especial así como diferente lugar de almacenamiento, producción, de degradación; con el fin de una mayor claridad del tema trataremos a cada Analito por separado.

CARBOHIDRATOS.-

Son también llamados hidratos de carbono, ya que están compuestos por elementos Carbono, Hidrógeno y Oxígeno principalmente, y son fuente importante de energía. Químicamente son derivados aldehídicos o cetónicos de polialcoholes.

La glucosa es el carbohidrato o azúcar más importante en la Clínica Médica, ya que el metabolismo de la glucosa es esencial en el seguimiento de la enfermedad Diabetes mellitus. Esta enfermedad que se caracteriza por trastornos en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas.

La función endócrina del páncreas está localizada en los islotes de Langerhans, células epiteliales dispersadas a través del órgano entero. Dos hormonas afectan el metabolismo de los carbohidratos y son producidas por el tejido insular y son: la Insulina (por las células beta) y el glucagon (por las células alfa).

La insulina desempeña un papel importante en el metabolismo general, causando aumento en el metabolismo de los carbohidratos, almacenamiento de glucógeno, síntesis de áci-

dos grasos, captación de aminoácidos y síntesis de proteínas

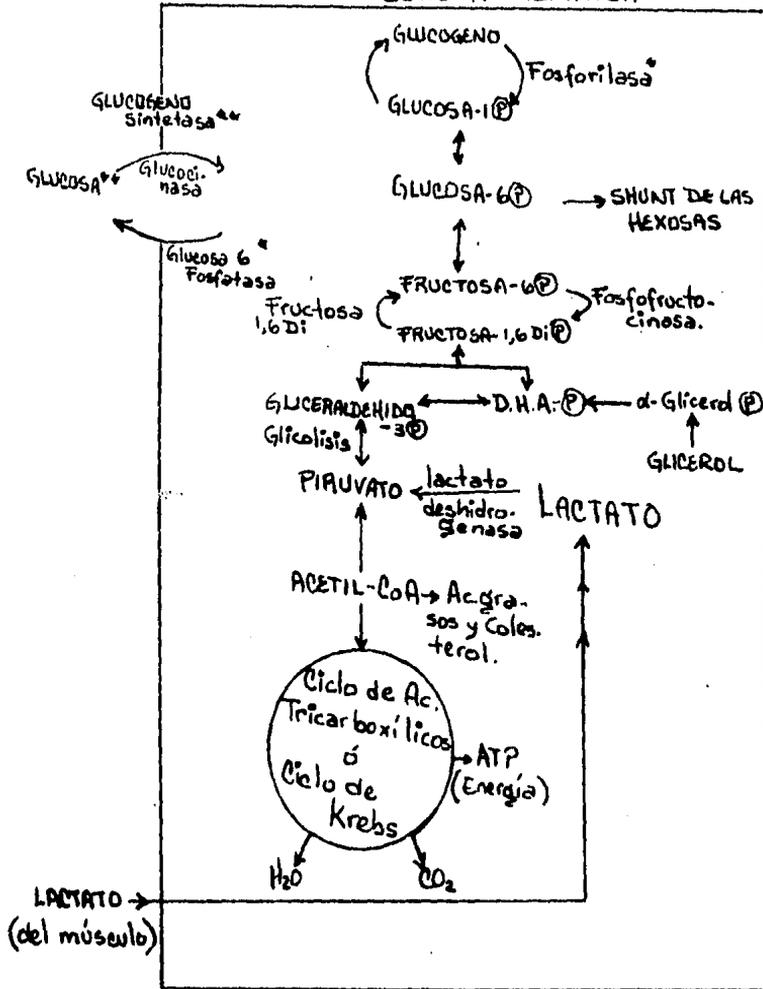
Se requieren aproximadamente 50 unidades de insulina por día y esta es aproximadamente al quinta parte de la almacenada en el páncreas humano.

La Diabetes mellitus se puede caracterizar como insuficiencia de insulina en la relación con los requerimientos de esta hormona por los tejidos. El diabético juvenil tiene poca insulina circulante demostrable y el páncreas no responde a una carga de glucosa. Por otra parte, el diabético adulto puede manifestar una respuesta defectuosa a la glucosa, pero debido a los niveles de éste glúcido continuamente elevados puede, en último término, secretar más insulina para una carga dada de glucosa que un individuo normal. La liberación excesiva de insulina después de una carga de glucosa ocurre en los individuos obesos que no son diabéticos o que solo manifiestan ligeras anomalías en la tolerancia de glucosa. En los individuos prediabéticos no obesos (es decir, personas con antecedentes familiares de diabetes, pero sin anomalías en la tolerancia a la glucosa) la respuesta insulínica a la glucosa es normal o ligeramente defectuosa. Los sujetos cuya diabetes es consecutiva a la acromegalia, enfermedad de Cushing, pueden padecer primordialmente de un defecto periférico del metabolismo de los carbohidratos producido -

METABOLISMO INTRACELULAR DE LA GLUCOSA

SANGRE

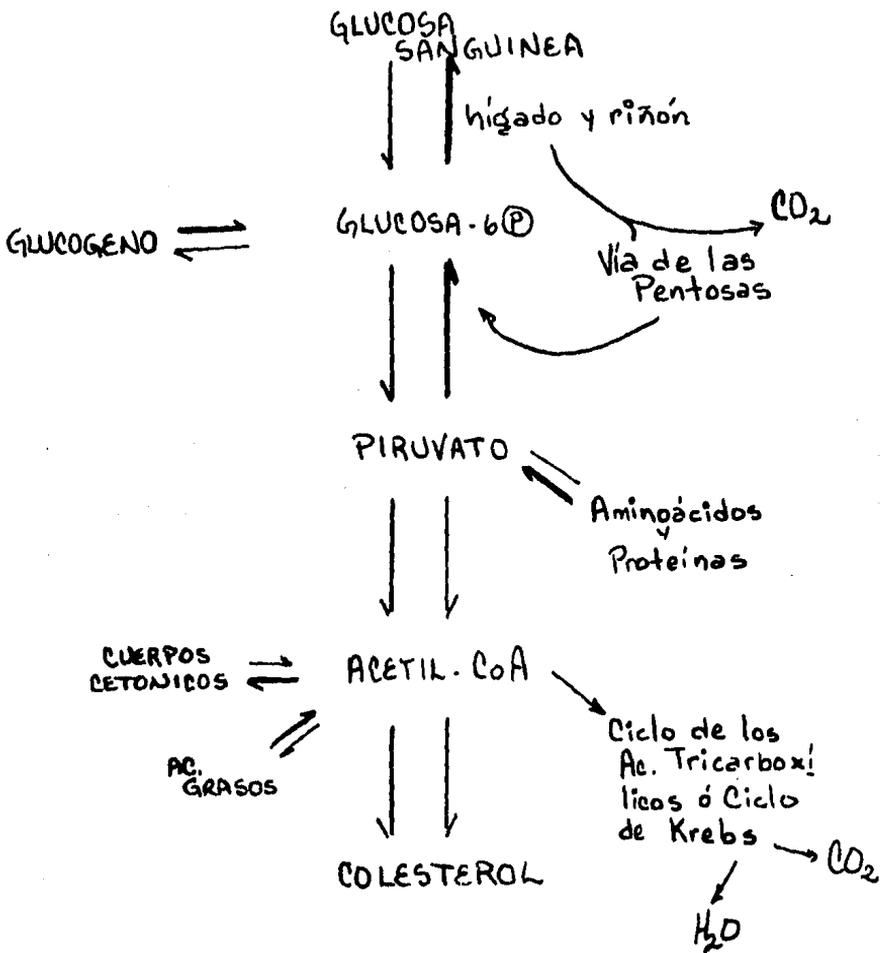
CELULA HEPATICA



* La adrenalina estimula esta reacción.

** La insulina estimula esta reacción.

METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN LA DIABETES



por la hormona del crecimiento, los corticoesteroides o las catecolaminas y, en un esfuerzo compensador, producir cantidades aumentadas de insulina para una carga dada de glucosa.

En general, las principales fuentes de glucosa sanguínea son:

A. De los carbohidratos de la dieta: La digestión de la mayor parte de los carbohidratos de la dieta forman glucosa, galactosa o fructosa. Estas son absorbidas hacia el interior de la vena porta. La galactosa y la fructosa son fácilmente convertidas en glucosa en el hígado.

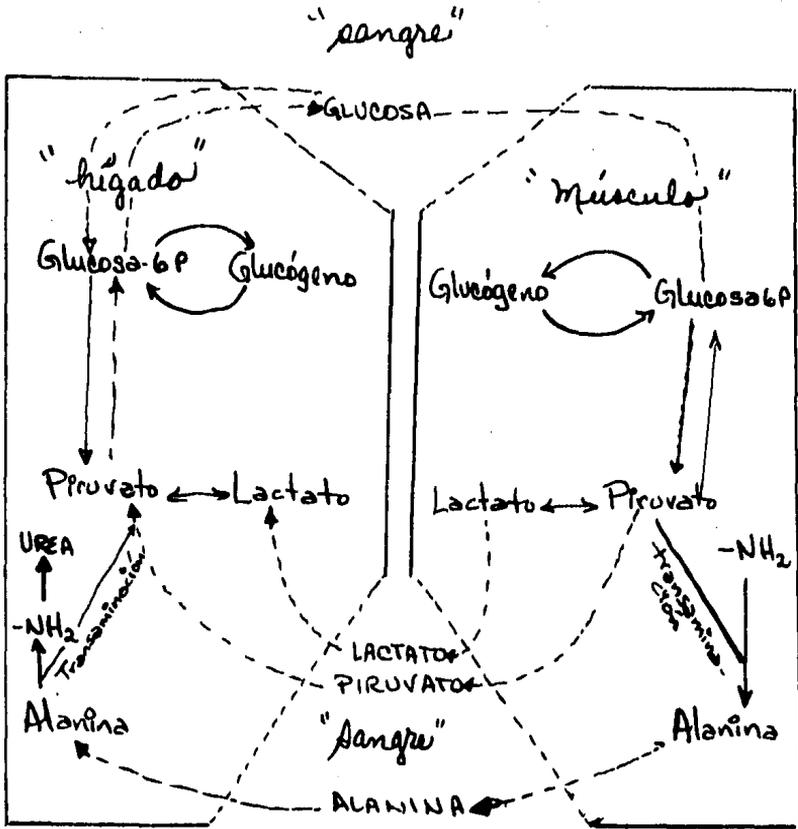
B. De varios compuestos glucogénicos por medio de la gluconeogénesis: Este proceso se conoce con el nombre de Cori o Ciclo del ácido láctico. En este ciclo la energía requerida para la síntesis de glucosa en el hígado a partir del piruvato se deriva de la oxidación de los ácidos grasos. El lactato formado por la oxidación de la glucosa en el músculo esquelético y en los eritrocitos, es transportado al hígado y los riñones, donde vuelve a formar glucosa, la cual queda nuevamente disponible por vía circulatoria para la oxidación en los tejidos. (Harper, 1978; 358).

(Ver ciclo de Cori)

COMPUESTOS NITROGENADOS.-

Las proteínas del organismo continuamente sufren procesos de degradación y biosíntesis a partir de aminoácidos li-

CICLO DE CORTI



bres.

Casi toda la proteína de la dieta se absorbe tras la digestión de los aminoácidos que constituyen el depósito general. (Ver esquema)

La síntesis (anabolismo) y degradación (catabolismo) de las proteínas está íntimamente en relación con este depósito. Los productos específicos de excreción del metabolismo de las proteínas son la urea y el amoníaco. El ciclo de la ornitina que se realiza fundamentalmente a nivel hepático y renal, sirve para eliminar del organismo sustancias tóxicas como el NH_3 en forma de urea. (Ver esquema)

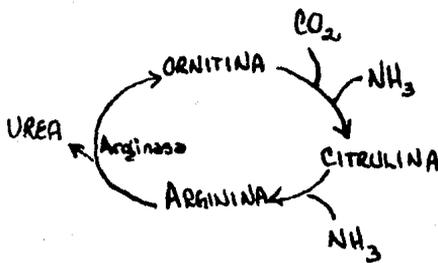
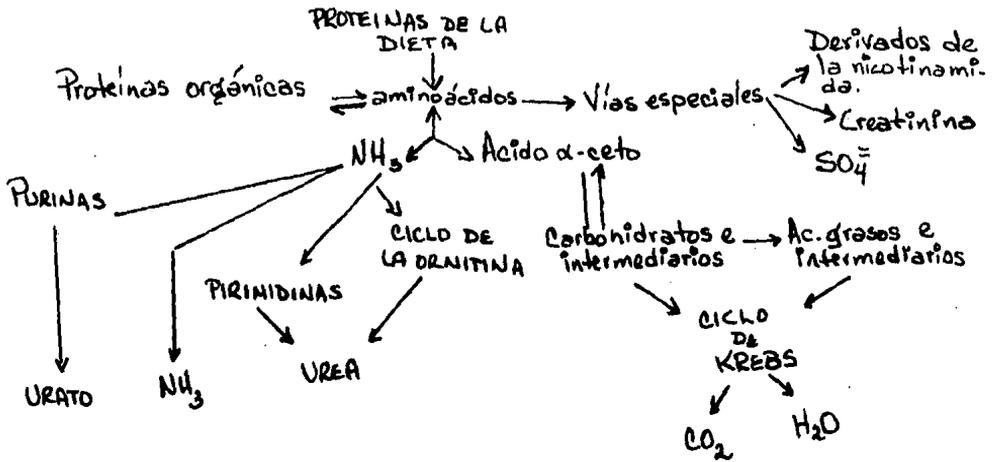
La urea es el producto más importante de desecho del catabolismo proteico y como otros constituyentes NPN (nitrogeno no proteico constituido por urea ácido úrico, creatinina) que están presentes en la sangre y en la orina humanas.

La Creatinina es la forma anhidra de la creatina, se caforma a partir de la fosfocreatina y creatina sobre todo en músculo; esta también se encuentra en la sangre y en la orina humanas.

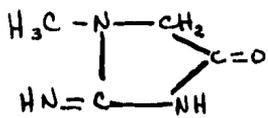
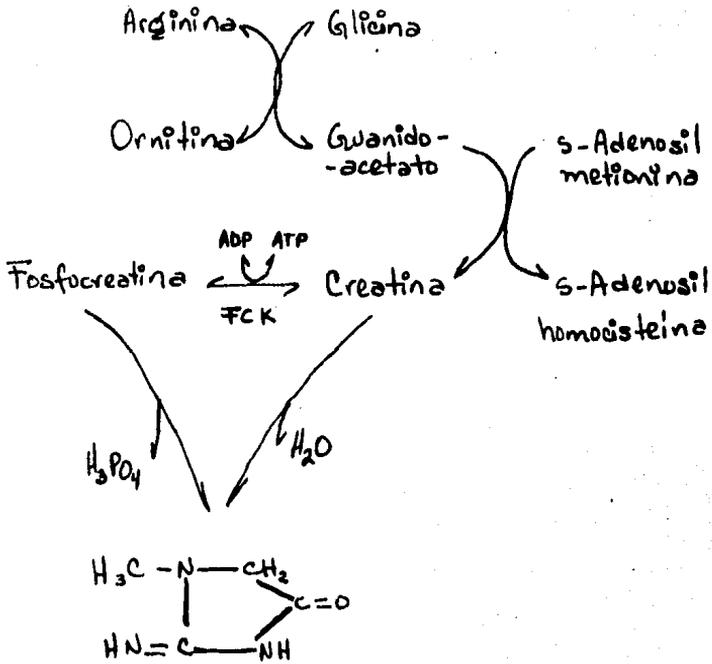
El ácido úrico de la sangre es un producto final del catabolismo de las purinas (ácidos nucleicos) y se excreta en la orina en forma de urato.

La síntesis de la creatinina a partir de la glicina y -

METABOLISMO DE LAS PROTEINAS



CICLO DE LA ORNITINA



F. C. K. FOSFOCREATINCINASA
 CREATINAFOSFOCINASA

parte de otros dos aminoácidos (arginina y metionina) es un proceso en el que hay dos pasos enzimáticos. El acetato de guanidina se forma por la transaminación fundamentalmente en los dos riñones y ésta es una reacción reversible mediada por la transaminasa que está sujeta a una inhibición feedback de la creatina de la dieta (Cantarow y Schepartz, 1967).

El acetato de guanidina (glucociamina), es entonces metilada en una segunda reacción en la que interviene una transmetilasa y la metionina activada, en el hígado para formar creatinina. En condiciones de fisiología normal la creatinina urinaria representa la filtración glomerular y la excreción tubular activa, formándose a partir de la creatina en cantidades bastantes constantes (mujeres 0.6 a 1.5 gr y en hombres 1 a 2 gr en la orina de 24 hrs.) (Ver esquema).

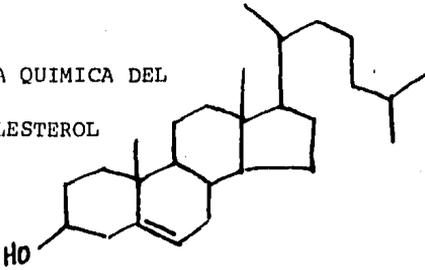
COLESTEROL.-

La dieta promedio (carne, yema de huevo principalmente) contribuyen en una mínima proporción (fuente exógena) a la tasa total del colesterol corporal (endógeno más exógeno).

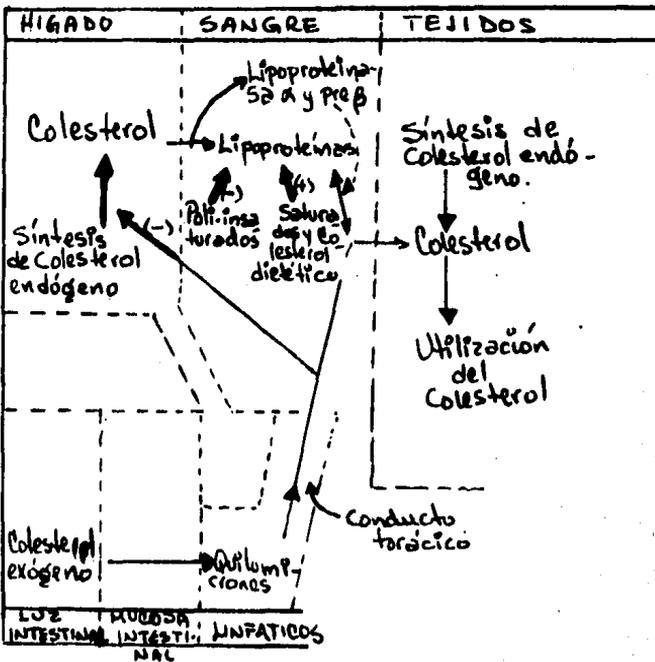
En contraste con la síntesis endógena de alrededor de 1 g/día, la dieta corriente produce unos 0.3 g/día (aportación exógena).

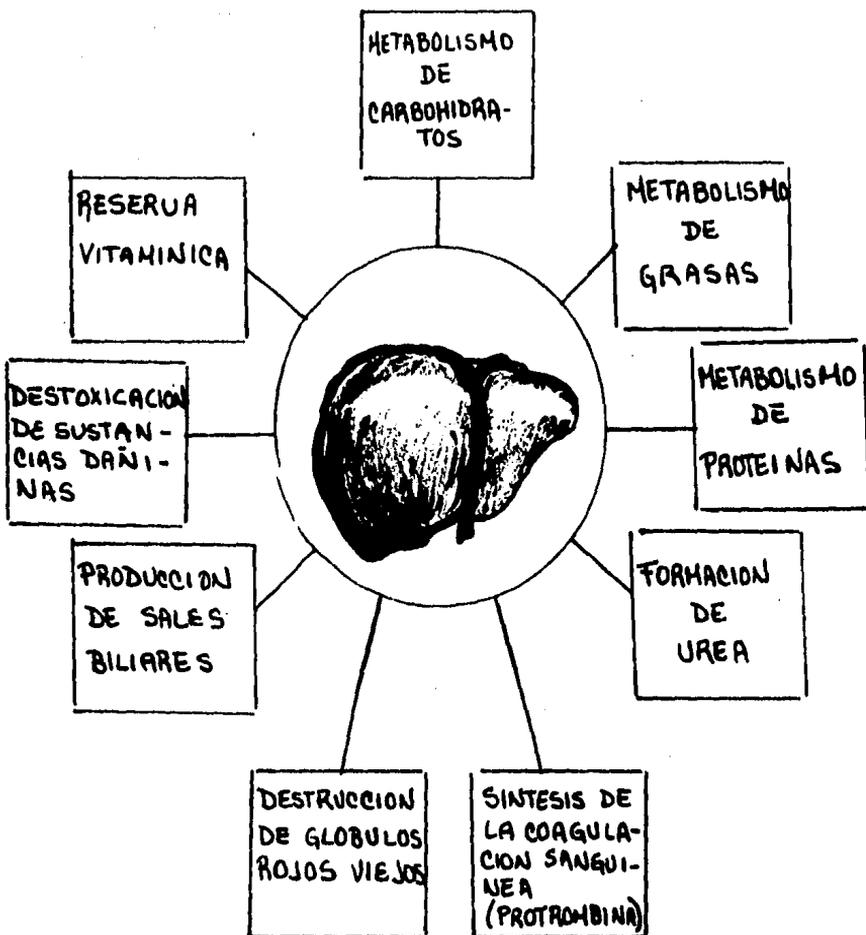
El colesterol en asociación con los quilomicrones, tras su absorción intestinal, pasa a la circulación portal.

ESTRUCTURA QUIMICA DEL
COLESTEROL



**TRANSPORTE Y DISTRIBUCION DEL COLESTEROL
(EXOGENO Y ENDOGENO)**





Papel central del hígado en la función del cuerpo

Nason, D. 1981,

El hígado extrae mucho el colesterol exógeno. Sin embargo, los quilomicrones son distribuidos a los lugares histiocos donde se libera el colesterol a las células.

(Ver diagrama).

La síntesis de colesterol ocurre sobre todo a nivel hepático pero también se realiza en otros tejidos, incluyendo la corteza suprarrenal, aorta, piel, intestinos y testículos (Mayes, 1971).

Su conversión en ácidos biliares, y la excreción de esteroides neutros a través de la bilis y heces es papel fundamental del hígado, que constituye la vía principal (90%) de excreción del colesterol. (Ver diagrama).

La participación intestinal en el metabolismo del colesterol se lleva a cabo a través de la circulación enterohepática del colesterol y sales biliares.

El colesterol es de gran importancia en la síntesis de las hormonas esteroideas, cuyos productos de conjugación y degradación que son eliminados en la orina constituyen una vía menor de excreción de colesterol.

La concentración de colesterol sanguíneo tiene una variación amplia que depende de la edad (aproximadamente de 150 a 300 mg/100 ml de suero). Aunque no puede ser sintetizado en todos los tejidos, el colesterol está distribuido por todas las células y tejidos.

PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPATICO.

BILIRRUBINA.-

El hígado es un órgano complejo que realiza múltiples - funciones metabólicas. Más de 100 pruebas de funcionamiento hepático se han basado en los cientos de reacciones que según se han demostrado, ocurren en el hígado. (Ver diagrama).

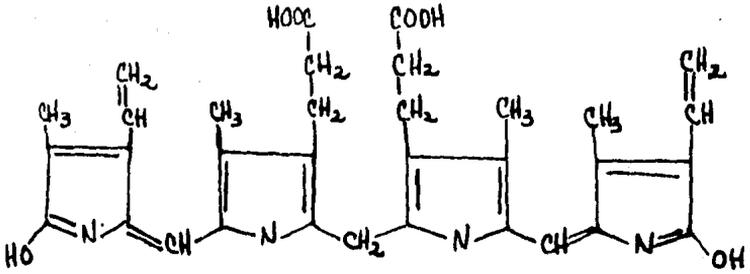
El conocimiento del metabolismo de la bilirrubina es esen cial para el adecuado entendimiento de la enfermedad hepática. La bilirrubina es un producto de la Hb, de la cual se forma en las células del sistema reticulo endotelial. Aquí - se separan la protoporfirina del hierro y las fracciones de globina de la molécula, abriéndose el anillo para formar bilirrubina. Aproximadamente el 85% de la Hb se obtiene de los eritrócitos antiguos. La mayor parte del resto se produce -- por degradación intracorpúscular de la Hb en la médula ósea. (Componente eritropoyético).

Infamas cantidades se derivan de la degradación de las -- proteínas no hemoglobínicas que contienen el grupo Hem (como la catalasa); y quizá de la derivación de los precursores -- Hem directamente a la producción de bilirrubina.

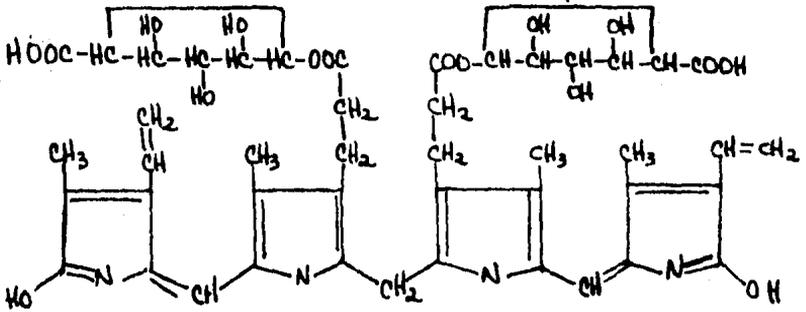
La bilirrubina se transporta a través de la sangre hacia el hígado (íntimamente ligada a la albúmina).

Van den Bergh y Muller fueron los primeros que determinaron el nivel de bilirrubina en el suero; encontrando que - la bilirrubina del suero normal reaccionaba con el diazo rea ctivo de Ehrlich (ácido sulfanílico diazotizado), solamente cuando, se le agregaba alcohol.

ESTRUCTURA QUIMICA DE LA BILIRRUBINA



BILIRRUBINA INDIRECTA
(LIBRE)



BILIRRUBINA DIRECTA
(CONJUGADA)

Van den Bergh denominó Directa a la forma de bilirrubina que reaccionaba con el diazorreactivo Sin adicionar alcohol, e Indirecta a la variedad que reaccionaba Solo en presencia de alcohol. El suero de pacientes con ictericia debida a excesiva hemólisis dá la reacción indirecta; mientras que los aumentos de nivel de bilirrubina en el suero de pacientes con ictericia debida a la obstrucción del arbol biliar dan la reacción directa.

La bilirrubina indirecta está en forma libre (bilirrubina No conjugada) en el camino hacia el hígado desde el --- S.R.E., donde se ha formado. La bilirrubina no conjugada no es polar, y por lo tanto puede reaccionar con el diazorreactivo solo en presencia de un agente (alcohol), en el cual -- tanto ella como el diazorreactivo son solubles.

(Harrow, 1972; Lenhinger, 1972)

La bilirrubina no conjugada esta ten finamente unida -- que no puede filtrarse en el glomérulo y no se conoce que ha ya secreción tubular de bilirrubina. Por esta razón, la bilirrubina no conjugada no se excreta en orina.

La bilirrubina directa o conjugada es un compuesto polar; por tanto es soluble en soluciones de agua, reaccionando con el diazorreactivo directamente y es ca

METABOLISMO DE LA BILIRRUBINA

- SISTEMA RETICULO ENDOTELIAL -

Hb → Bilirrubina + Hierro + Globina

↓
- SANGRE -
Bilirrubina (libre, indirecta)

↓
- HIGADO -
Bilirrubina + 2 UDP Glucuronato

↓ Glucuronil transferasa
Diglucuronato de Bilirrubina (conjugada, directa)

↓
- ARBOL BILIAR -
Diglucuronato de Bilirrubina

↓
- INTESTINO -
Bilirrubina o Diglucuronato de Bilirrubina
Bacterias / Enzimas ↓

UROBILINOGENO → UROBILINAS

↓
- HECES FECALES -

Urobilinógenos y Urobilinas (50-250 mg/día)
[50-300 unidades Ehrlich / 100g]

- SANGRE PORTAL -
Urobilinógeno

↓
- RIÑON -

↓
- ORINA -

Urobilinógeno (1-4 mg/día)

[<1 unidad Ehrlich / 2 horas]

paz de aparecer en orina cuando los niveles en la sangre -- estén aumentados.

La bilirrubina conjugada en parte no está unida a las - proteínas por ello, puede filtrarse en el glomérulo y se excreta por la orina.

LAS ENZIMAS.-

Las enzimas son catalizadores específicos de las reacciones bioquímicas.

Las enzimas son proteínas catalíticas de las reacciones químicas que se realizan en los sistemas biológicos.

La mayoría de las enzimas pueden ser extraídas de las - células sin pérdida de su actividad biológica (catalítica) - y por lo tanto pueden ser estudiadas fuera de las células vivientes.

El contenido enzimático del suero humano puede cambiar importantemente en ciertos estados patológicos, los estudios de los niveles enzimáticos en el mismo proveen un medio de - diagnóstico importante para el médico.

Ciertas enzimas y proenzimas se encuentran en todo tiempo en la circulación de los individuos normales. Los substratos de ellas también se halla en la circulación, ya sea con

tinua o intermitentemente y llevan a cabo una función en la sangre. A éstas enzimas se les llama plasmáticas funcionales como ejemplo de estas tenemos a las enzimas de la coagulación.

Las enzimas se determinan por su actividad, ya que son catalizadores biológicos de las reacciones que se llevan a cabo en el organismo.

Todas las enzimas séricas tienen su origen en las células algunas enzimas se encuentran en numerosos tejidos (como la deshidrogenasa láctica), otras están únicamente concentradas en uno o dos tejidos (como la creatinfosfoquinasa que se encuentra principalmente en músculo esquelético y miocardio).

Sin embargo un aumento en los niveles séricos de una enzima, que esté distribuida en varios tejidos, es un dato bioquímico menos específico con respecto al ciclo de la lesión.

La enzimología sérica proporciona una ayuda para establecer el diagnóstico controlar el curso, y demostrar una enfermedad subclínica.

De acuerdo al valor clínico que nos pueden proporcionar las determinaciones enzimáticas, se hace la siguiente clasificación:

GRUPO I.- Enzimas de alto valor clínico.- Son aquellas que

nos sirven para hacer el diagnóstico preciso del daño en algún órgano en especial por ejemplo:

corazón: TGO, CPK, Aldolasa, DHL.

Hígado: TGO, TGP.

GRUPO II.- Enzimas de poca importancia clínica.- Son aquellas que nos indican un daño sin especificar el lugar (el órgano en especial) por ejemplo: la ~~DESHIDROGENASA~~ LACTICA

GRUPO III.- Enzimas de importancia en investigación pero no de importancia clínica.- Por ejemplo la Gentiltransferasa --- (que solo sirve para cuantificar una determinada reacción) -

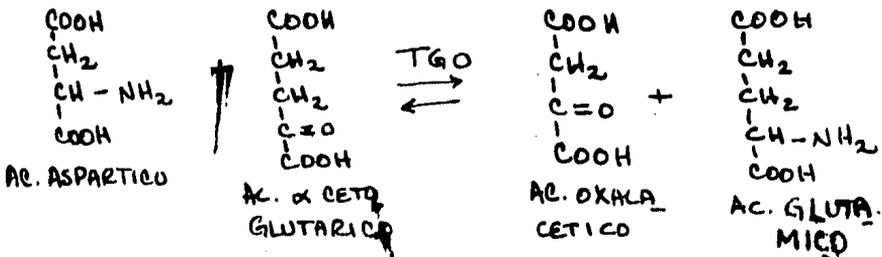
* Estas enzimas son muy caras para el diagnóstico por lo cual no son muy utilizadas.

GRUPO IV.- Enzimas que no tienen importancia clínica.- Son a aquellas enzimas que muy raramente se utilizan en el diagnóstico, por ejemplo Hialuronidasa en líquido seminal.

(Ver cuadros de valores diagnósticos en diferentes situaciones clínicas).

DESCRIPCION:

La TGO (transaminasa glutámico oxalacético) se encuentra en el tejido cardiaco, hepático músculo esquelético tejido renal y cerebro. Cataliza la siguiente reacción:

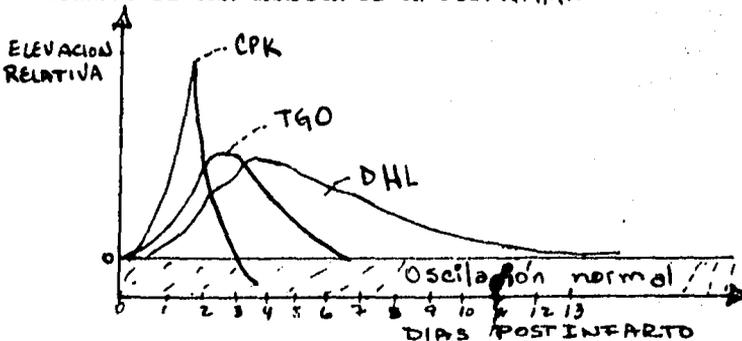


EJEMPLO DE LOS VALORES DIAGNOSTICOS DE LAS ENZIMAS EN ALGUNAS ENFERMEDADES.

	TGO	TGP	DHL	CPK	F.Alc
<u>Dolor torácico</u>					
Infarto al miocardio	**	+/-	**	***	N
Infarto pulmonar	+/-	+/-	**	+/-	N
Insuficiencia cardiaca	+/-	+/-	**	+/-	*
Shock	**	*	**	+/-	N
<u>Enfermedad muscular</u>					
	**	*	**	***	N
<u>Ictericia</u>					
Hepatitis aguda	****	****	*	N	*
Cirrosis	*	+/-	+/-	+/-	*
Ictericia obstructiva	**	**	*	+/-	****
<u>Enfermedad neoplásica</u>					
Carcinoma sin metasis (hígado)	N	N	**	+/-	***
Carcinoma con metasis (hígado)	**	*	**	+/-	***
Leucemia	N	N	**	+/-	N
<u>Anemia</u>					
Megaloblástica	N	N	****	N	N
Deficiencia de hierro	N	N	N	N	N
Hemolítica	N	N	**	N	N

- * Ligeramente aumentada
- ** Aumento moderado
- *** Aumento estable
- **** Demasiado elevadas
- N Concentración normal

EJEMPLO DE UNA GRAFICA DE UN POSTINFARTO

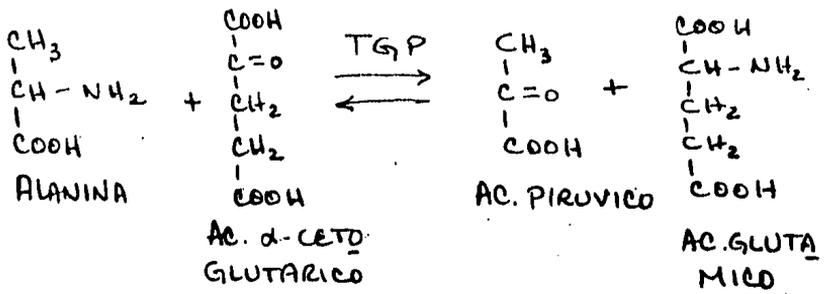


NIVELES ENZIMATICOS ANORMALES EN EL SUERO DE VARIOS PROCESOS

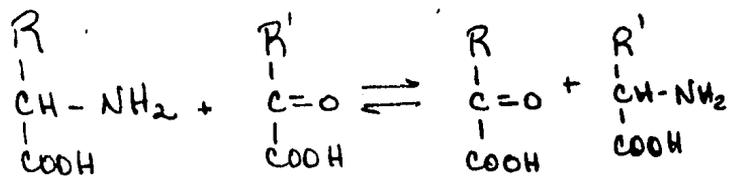
PATOLOGICOS.

	ENZIMA						
	DHL	F.Alc	F.ac	TGO	TGP	CPK	amilasa
Hepatitis	*	*	N	***	***	N	N
Mononucleo- sis infec- ciosa.	**	*	N	**	**	N	N
Cirrosis	*	*	N	*	*	N	N/*
Carcinoma metastásico	**	**	N	*	*	N	N
Ictericia	N/*	***	N	*	*	N	N
Obstructiva							
Insuficien- cia cardia- ca	*	*	N	*	*	N	N
Infarto al micardio	**	N	N	**	N/*	***	N
Distrofia muscular progresiva	**	N	N	**	**	***	N
Obstrucción Biliar	*	****		*	*		±
Hígado	*			****	****		
Corazón	**			**	+	****	
Musculo esq.	**			*	+		*
Páncreas	+			+	+		****
Enfermedad neoplásica	***	De * a ****		**	*		

La TGP (transaminasaglutarámico pirúvico). Se encuentra en hígado, miocardio con baja concentración y es utilizada para diagnosticar la enfermedad hepática. cataliza la siguiente reacción:

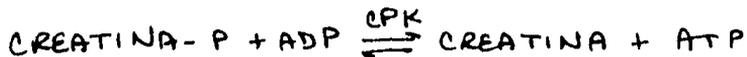


En general las transaminasas catalizan la reacción reversible de un grupo alfa-amino de un aminoácido a un alfa-cetoácido:



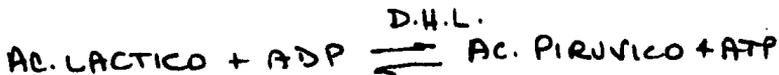
Braunshtein y Kritzman, 1937 denominaron a estas enzimas aminotransferasas (TGO TGP)

La CPK (fosfocreatincinasa) Se encuentra en concentra -
 ción elevada en el músculo esquelético y en el miocardio, se
 le encuentra en cantidades apreciables en el cerebro y no --
 hay en el hígado. Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



La (deshidrogenasa láctica) Se encuentra en miocardio
 riñón, hígado y músculos.

Esta enzima cataliza la reacción de oxidación reversi--
 ble de ácido láctico a ácido pirúvico.



PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO PANCREATICO.

La función exócrina del páncreas es la producción y se-
 creción de jugo pancreático. Los constituyentes más importantes
 del jugo pancreático son: el bicarbonato de sodio, la a-
 milasa , la lipasa y el tripsinógeno. El páncreas normal se--
 creta estas enzimas casi por completo hacia el duodeno, y so
 lo un pequeña fracción llega directamente a la sangre.

Las amilasas constituyen un grupo de enzimas que hidro-
 lizan o desdoblan ciertos polisacáridos como el almidón y el
 glucógeno. Estos carbohidratos estan constituidos por unida-

des de D-glucosa enlasadas en posición alfa 1-4, lugar donde la amilasa ejerce su acción.

Comunmente la amilasa no se encuentra presente en el suero del recién nacido, apareciendo ésta aproximadamente hacia los dos meses de vida y llega a los niveles del adulto al término del primer año.

En el organismo humano la fuente más importante de lipasa es el páncreas aunque es secretada también en alguna cantidad por la mucosa gástrica y células intestinales. Se encuentra actividad de lipasa en el plasma eritrocitos, leucocitos, orina normal y líquido cefalorraquídeo.

Las fosfatasas son enzimas más adecuadamente llamadas -- fosfomonosterasa, incluyen dos tipos principales: la fosfatasa alcalina (F.A.lc.) con pH óptimo de 9, y la fosfatasa ácida (F.a.) con pH óptimo de 5.

(Bennett, 1976; Tood, 1969; Outfreud, 1968; Reed, 1975; Whitaker, 1972; Collins, 1973; Kalinou, 1975).

FILTRADO LIBRE DE PROTEINAS.-

A. Fundamento:

El ácido sulfúrico reacciona con el tungstato de sodio para formar el ácido Tungstico, el cual precipita las proteínas que son separadas por filtración o centrifugación.

B. Material y Equipo:

1. Cristalería:

Matraces erlenmeyer 125 ml
Matraces volumétricos 1000 ml
Pipetas graduadas 1, 5 y 10 ml
Papel filtro
Embudo de vidrio
Piceta con agua destilada
Tubos de ensaye

2. Aparatos:

Balanza granataria
pHímetro

3. Reactivos:

- a) Acido sulfúrico 2/3 N (0.66 N)
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
mezclar aforar y titular
- b) Tungstato de sodio al 10%
Tungstato de sodio 100 gr
agua destilada c.b.p. 1000 ml
Disolver, aforar y guardar en frasco de vidrio ambar tapado.

4. Material biológico:

1 ml de muestra (sangre con anticoagulante; suero; plasma; orina)

C. Técnica:

- 1) Colocar 7.0 ml de agua destilada en un matraz erlenmeyer de 125 ml.
- 2) Añadir 1 ml de muestra gota a gota y agitar.
- 3) Agregar 1 ml de ácido sulfúrico 2/3 N gota a gota y agitar.
- 4) Añadir 1 ml de Tungstato de sodio al 10% gota a gota y agitar.

- 5) Dejar reposar de 3 a 5 minutos filtrar con papel filtro y embudo de vidrio en un tubo de ensaye (se puede centrifugar).

D. Medidas de seguridad:

Se debe tener cuidado con la preparación de los reactivos así como también de agregar en la proporción señalada en el procedimiento. No se debe emplear un filtrado turbio éste - contien aún proteínas.

E. Bibliografía:

Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis 1:32
1963. (libros de consulta 23; 35; 36)

NOTA: Este filtrado nos sirve para efectuar la determinación de glucosa, ácido úrico y creatinina.

PROCEDIMIENTOS DE QUIMICA SANGUINEA.-

Estas determinaciones son de gran utilidad médica ya - que ayudan a disgnosticar alteraciones en los órganos que -- producen o almacenan a los llamados anabolitos.

De acuerdo a su clasificación tenemos:

1. Carbohidratos (glucosa)
- 2 Compuestos nitrogenados (urea ácido úrico creatinina, - proteínas).
3. Lípidos (colesterol cefalín colesterol)

MATERIAL GENERAL -

1. Cristalería:

Matraces erlenmeyer... 25 50 y 100 ml.
Matraces volumétricos ... 50 100 y 1000 ml.

Pipetas graduadas... 0.1 1. 3 5 y 10 ml.
Tubos graduados... de 13 y 25 ml
Tubos de ensaye
Frascos de vidrio
Frascos ámbar con tapón

2. Aparatos:

Centrífuga
Espectrofotómetro
Celdillas
Baño María
Termómetro
Tripié
Mechero
Tela de asbesto
Cronómetro o reloj.

3. Reactivos:

Ver cada técnica

4. Material biológico:

Ver cada técnica

Medidas generales de seguridad en química sanguínea.-

- * Se debe tener cuidado desde la preparación de los reactivos ya que si no están a la concentración adecuada darán falsos resultados.
- * No se deberá trabajar con un filtrado de Follin ~~u~~ turbio.
- * En las técnicas que utilizan suero para sus determinaciones se deberá tener cuidado de no utilizar un suero hemolizado.
- * Hay que tener cuidado en la conservación de los reactivos-ya que algunos se afectan si no tienen refrigeración o si no se conservan en frasco color ámbar.
- * Se deberá tener cuidado del manejo y utilización de los reactivos ya que algunos son tóxicos, corrosivos e irritantes (por ejemplo el reactivo de ortotoluidina en la determinación de glucosa que contiene cianuro, se debe pipetear con perilla, nunca directamente.
- * Para el trabajo de laboratorio siempre deberá de usarse bata y no ingerir bebidas ni alimentos evitando con ello alguna contaminación.
- * En las técnicas en que se requiera una curva de calibración deberá chequearse periódicamente el reactivo estandar así como la fecha de caducidad de los demás reactivos.

DETERMINACION DE GLUCOSA (Follín- Wu)

A. Fundamento:

En solución alcalina caliente la glucosa reduce fácilmente el ión cúprico a cuproso con formación de óxido cuproso. Al agregar ácido fosfomolibdico (ó arsenomolibdico) este es reducido por el ión cuproso con formación de óxidos inferiores del molibdeno, los cuales producen un color azul proporcional a la concentración de glucosa.

B. Material y equipo:

Ver material general de química sanguínea

Reactivos:

a) Solución de sulfato de cobre

Fosfato disódico 19 gr

Tartrato sódicopotásico 40 gr

Hidróxido de sodio 1N 100 ml

Solución de sulfato de cobre pentahidratado (10%) 80 ml

Sulfato sódico anhidro 180 gr

Se disuelve el fosfato disódico y el tartrato en 700 ml de agua se agrega el NaOH, y agitando se agrega la solución de sulfato de cobre. Se agrega el sulfato de sodio anhidro, se mezcla y afora a 1 lt. Se deja en reposo -- por dos días para separar sales de cobre precipitadas.

b) Solución de arsenomolibdato.

Molibdato amónico 50 gr

Acido sulfúrico condensado 42 ml

Arseniato sódico 6 gr

Agua destilada 950 ml

Se disuelve el molibdato amónico en una mezcla de 900 ml de agua y 42 ml de ácido sulfúrico. Se disuelve a parte el arseniato sódico en 50 ml de agua y se agrega este a la primera solución. Se mezcla bien y se incuba a 37° C por 48 hrs.

Se guarda en frasco ámbar a temperatura ambiente. El color debe ser amarillo, si es azul debe desecharse.

c) solución estandar de glucosa:

Solución glucosa estandar al 1%

Se transfiere 1.0 gr de glucosa de grado reactivo, a un matraz seco volumetrico de 100 ml. Se agrega solución de ácido benzoico. Se mezcla bien y se guarda hasta disolución (ácido benzoico al 2%). Se diluye hasta la marca con solución de ácido benzoico. Se mezcla bien y se guarda en un frasco ámbar tapado y en el refrigerador la solución será estable muchos meses. La concentración de glucosa estandar será de 200 mg/100 ml (6 20 mg/ml)

Método:

1. Introducir con pipeta 1 ml de filtrado de Follín- Wu, en Tubo aforado a 25 ml.
2. Agregar 1 ml de solución sulfato de cobre mezclar.
3. Colocarlo en agua hirviendo durante 10 minutos.
4. Enfriar al chorro de agua.
5. Agregar 1 ml de solución de arsenomolibdato y mezclar.
6. Dejar reposar dos minutos y diluir con agua hasta la marca de 25 ml. Mezclar por inversión.
7. Leer a longitud de onda de 490 nm ajustando con blanco de reactivos.

* La solución es estable a una hora.

NOTA: Preparación del estandar de glucosa: De la solución de glucosa 200 mg/100 ml de agua, se toma 1 ml y se diluye 1:10 de ésta dilución tomamos 0.6 ml y le agregamos 0.4 ml de agua destilada, se prosigue desde el paso No. 2.

CALCULO DEL RESULTADO.-

La solución estandar de glucosa 1:10 tiene una concentración de 120 mg/100 ml; haciendo una regla de tres podemos calcular la concentración del problema:

$$\frac{\text{D.O. del problema}}{\text{D.O. del estandar}} \times 100 = \text{mg \%}$$

Valores Normales:

De 80 a 120 mg%

METODO PARA DETERMINAR GLUCOSA - (Ortotoluidina)

A. Fundamento:

La ortotoluidina reacciona específicamente con las aldo — hexosas en solución acética caliente, para formar una mezcla en equilibrio de glicosilamina y la correspondiente base de Schiff. El color verde formado es proporcional a la cantidad de glucosa presente.

B. Materia y Equipo:

(Ver material general de química sanguínea).

Reactivos:

a) Ortotoluidina

Tiourea 1.5 gr

Ortotoluidina 60 ml

Acido acético glacial 940 ml

Disolver la tiourea en ácido acético glacial y agregar la ortotoluidina*.

b) Solución de glucosa (10 mg/ml)

Dextrosa 10 gr

Acido benzoico al 0.2% c.b.p. 1000 ml.

Disolver y aforar

* NOTA: Este reactivo deberá conservarse en frasco ámbar bien tapado y en refrigeración (no debe pipetarse directamente pues es CORROSIVO E IRRITANTE).

Material biológico:

1 ml de muestra (suero, plasma, líquido cefalorraquídeo u orina)

C. Método:

1. En un tubo de ensaye de 16 X 150 ml colocar 0.1 ml de la muestra.
2. Agregar 5 ml del reactivo de ortotoluidina y mezclar.
3. Poner el tubo a baño de agua hirviendo durante 10 minutos.
4. Enfriar al chorro del agua.

5. Leer a longitud de onda de 630 nm contra blanco de reactivo antes de 30 minutos.

D. Curva de calibración:

Colocar respectivamente:

MATRAZ VOLUMETRICO DE 100 ml	ml DE SOLUCION DE GLUCOSA (10 mg/ml)	AGUA DESTILADA c.b.p	GLUCOSA (mg/100 ml)
1	5.0	100	50
2	7.5	100	75
3	10.0	100	100
4	15.0	100	150
5	20.0	100	200

De cada una de estas diluciones tomar 0.1 ml y proseguir la técnica desde el paso No. 2

CALCULOS.--

En caso de que no se disponga de curva de calibración se puede proseguir de la manera siguiente:

Trabajar al mismo tiempo que el problema un estandar que contenga 1 mg de glucosa/ml y tomar 0.1 ml, efectuando la técnica antes descrita.

D.O.: Densidad óptica.--

$$\frac{\text{D.O. del problema}}{\text{D.O. Estandar}} \times 100 = \text{mg \% de glucosa.}$$

Valores Normales:

De 70 a 100 mg%
6 70 a 100 mg/100 ml

E. Bibliografía:

Dobowski, K.M. 1962: Anortotoluidina method for body-fluid glucosa determination. Clin. Chem. 8:215.

PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA.-

A. Fundamento:

Las personas normales metabolizan la glucosa a mayor velocidad que los enfermos diabeticos; estos presentan falta parcial de insulina, lo que ocasiona que los niveles de glicemia despues de ingerir una sobredosis de glucosa sean mayores o persistan más tiempo que en las personas sanas.

B. Material y equipo:

Los mismos para medir la glucosa en la sangre.

C. Método:

1. Preparación del paciente:

Debe:

- a) Ser ambulatorio
- b) Proporcionarle una dieta cuyo contenido de hidratos de carbono sea de 150 a 300 g, lo cual se consigue haciendo que el enfermo ingiera dos rebanadas de pan con mermelada cajeta miel de abeja, etc. despues de cada alimento durante tres días que anteceden al exámen
- c) Estar sin haber ingerido alimento cuando menos ocho horas y cuando más 16 horas antes de la prueba.

No debe:

- a) Haber tenido recientemente traumas quirúrgicos que maduras o enfermedades porque disminuye su tolerancia a la glucosa.
- b) Tomar anticonceptivos, saliciatos ácido nicótico, diuréticos hipoglucemiantes o alcohol cuando menos tres días antes de la prueba.

2. Durante la prueba:

- a) Debe efectuarse durante las 7 y 9 a.m., porque las personas tienen variaciones cardíacas en la tolerancia a la glucosa.
- b) Para detectar la diabetes deben administrarse 100 gr de glucosa disueltos en 300 ml. de agua; ingerir

se en un lapso de 10 minutos y tomar 5 minutos con tiempo cero

c) No debe hacer ejercicio exagerado, ni tomar café o alcohol o fumar.

d) Extraer en el transcurso se 3 horas, 4 tomas de sangre:

1ra. toma en ayunas

2da. toma 60'

3ra. toma 120'

4ta. toma 180'

3. Técnica:

La de Hultman con ortotoluidina.

4. Calibración:

Véase glucosa en sangre.

5. Valores Normales:

En la glucemia aumenta en la ingestión de glucosa y alcanza su máximo a los 30 minutos en el 76% y a los 60 minutos en el 17% de las personas normales. Este valor se mantiene por abajo de 170 mg en 100 ml de sangre total, después desciende a los valores normales en 120 minutos y así persiste; se ha descrito una ligera hipoglucemia entre los 120 y 180 minutos pero que desaparece rápidamente. La tolerancia a la glucosa disminuye después de los 50 años por esta razón se aconseja añadir 10 mg a cada uno de los valores normales de la curva de tolerancia a la glucosa, y 10 mg por cada década después de los 50 años. Los valores, cuando se suministran 40 g de glucosa por m^2 de superficie corporal a 100 g de glucosa como carga total son:

MUESTRA	MILIGRAMOS EN 100 ml DE PLASMA	PUNTUACION SEGUN WILKERSON
Ayuno	130	(130 o más) 1
60 minutos	195	(195 o más) 1/2
120 minutos	140	(140 o más) 1/2
180 minutos	130	(130 o más) 1

MUESTRA	MILIGRAMOS EN 100 ml DE SANGRE	PUNTUACION SEGUN WILKERSON
Ayuno	110	(110 o más) 1
60 minutos	170	(170 o más) 1/2

MUESTRA	MILIGRAMOS EN 100 ml DE SANGRE	PUNTUACION SEGUN WILKERSON
120 minutos	120	(120 o más) 1/2
180 minutos	110	(110 o más) 1

En el sistema de puntuación Wilkerson, cero puntos corresponde a una persona sana; de 1/2 a 1 1/2 puntos inclusive a una persona sospechosa de padecer diabetes y a la persona debe vigilarse; de dos o más puntos permiten clasificar a una persona como diabética.

Resultado en embarazadas (con ingestión de 100 g de glucosa)

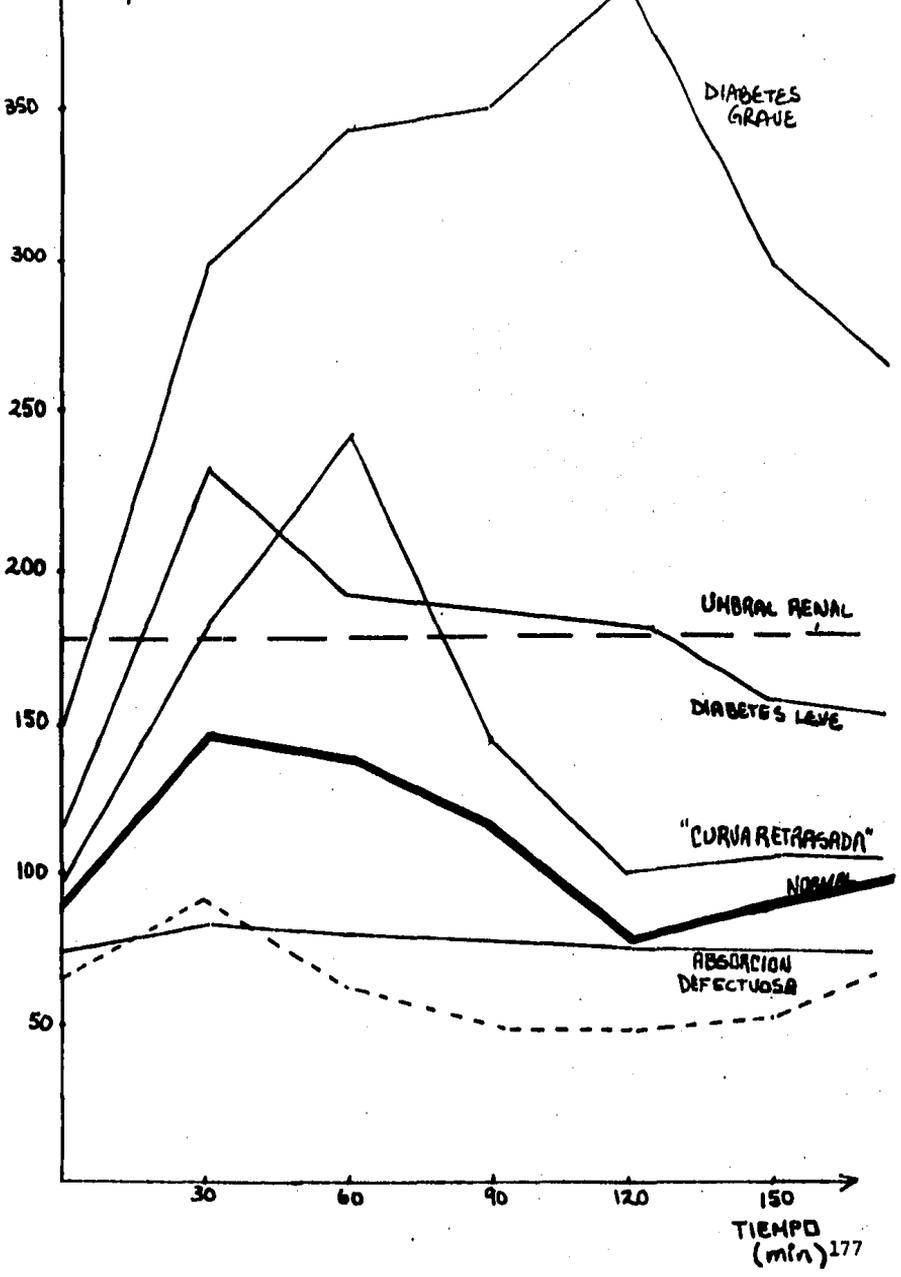
MUESTRA	MILIGRAMOS EN 100 ml DE SANGRE	MILIGRAMOS EN 100 ml DE PLASMA
Ayunas	90	105
60 minutos	165	190
120 minutos	145	165
180 minutos	125	145

Resultados de los niños con ingestión de 1.75 g por kilo de peso.

MUESTRA	MILIGRAMOS EN 100 ml DE SANGRE CAPILAR
60 minutos	175
120 minutos	140
180 minutos	125

CONC. GLUCOSA
(mg/100ml)

Curva de tolerancia a la glucosa.



TIEMPO
(min) 177

E. BIBLIOGRAFIA:

Chaidalia, H.B.: Diagnosis of diabetes. The size and nature of carbohydrate load. *Diabetes*. 19: 863, 1970.

Donawski, T.S. Aarons, J.H. Hydovitz J.D. y Wingert, J.P.: Utility of equivocal glucose tolerances. *Diabetes*. 19: 524, 1970.

Fajans, S.S. y Conn, J.W.: The early recognition of diabetes mellitus *Ann. N.Y. Ac. Sci.* 82: 208, 1959.

Fritzgerald, M.G. y Keen, H.: Diagnostic classification of diabetes. *Brit. Med J.* 2:1568, 1964.

Klint, Ch.R. Prout, th. E., Bradley, R.F. FISHER G.,
Gastineau, C., Marks H. Meinert, C.L. y Shumacher, O.P.: Standarization of the oral glucose tolerance test.
Report of the Committee on Stastics of the American Diabetes Association. June 14, 1968.

Kobdaling J., y Creutz Feldt, W.: Comparison of different methods for the evaluation of the oral glucose tolerance test. *Diabetes*. 19: 870, 1970.

Klachko, D.M. Lie. T.H. Cunningham, E.J., Chase, G.R. y Burns, T.W.: Blood glucosa levels during walking in normal and diabetic subjects. *Diabetes* 21:89 1972.

Lipman, R.L.: Glucose intolerance during decrease physical activity in man. *Diabetes* 21: 101, 1972.

Mc. Donald, G.W., y O'Sullivan. J.B.: Screening for diabetes mellitus. *Diabetes Mellitus Diagnosis and Treatment*: Vol II Cap. XVII. pág. 95, 1971.

National Center for Healt Statistics: Glucose tolerance test of adults 1960-1962 U.S. Public Healt Service Publication 1,000 Series II Number 2, 1964.

Remein, Q.R. y Wilkerson, H.L.C.: The efficiency of screening test for diabetes *J. Chron. Dis.* 13: 6 1961.

Reubin, A.: Effect of age in interpretacion of glucose and tobutamide tolerance test. *Diabetes Mellitus. Diagnosis and Treatment*. Vol. III Cap. XX pas. 115, 1971.

Seltzer, H. : Oral glucose tolerance test. *Diabetes Mellitus Diagnosis and Treatment*, Vol III, Cap. XVIII, pág. 101, 1971.

UREA -

(Técnica de Berthelot-Chaney-Marbach)

A. Fundamento:

La urea se hidroliza a la urea en amoníaco y anhídrido carbónico el amoníaco liberado reacciona con el fenol y el hipoclorito para formar la p-quinonacloramina; esta con una segunda molécula de fenol, produce un compuesto indofenólico - de color azul, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de urea presente. La reacción se activa en presencia de nitrato de sodio.

B. Material y equipo:

1. Solución estandar de urea al 1%

Urea q.p.	1.0 g	
Agua destilada c.b.p.		100 ml

2. EDTA sal disódica 1.0 g

Agua destilada c.b.p.	90 ml
-----------------------	-------

Disolver el EDTA en los 90 ml de agua destilada, ajustar el pH a 6.5 con hidróxido de sodio 0.1 N, aforar a 100 ml con agua destilada.

3. Solución de hidróxido de sodio 5 %

Hidróxido de sodio	200 gr
--------------------	--------

Agua destilada	1000 ml
----------------	---------

Disolver aforar y titular.

4. Solución de hipoclorito de sodio 0.14 %

Hipoclorito de sodio	200 ml
----------------------	--------

Agua destilada	1000 ml
----------------	---------

Mezclar aforar y titular con tiosulfato de sodio.

5. Solución de fenol al 85%
Fenol 85 gr
Agua destilada 100 ml
Mezclar
6. Solución de nitroprusiato de sodio
Nitroprusiato 20 ml
Solución de fenol al 85% 5 ml
Agua destilada, Aforar a 150 ml
Disolver y mezclar. * Esta mezcla es estable de 3 a 4 días en frasco ámbar.
7. Solución de hipoclorito de sodio 0.14 n e hidróxido de sodio 5
Mezclar volúmenes iguales.
8. Solución de ureasa
Ureasa 20 mg
Solución amortiguadora de EDTA pH 6.5 25 ml
Agua destilada c.b.p 50 ml
Disolver la ureasa en la solución amortiguadora de EDTA. aforar a 50 ml con agua destilada; esta solución es estable de 3 a 4 semanas a la temperatura de 0 a 4°C.

C. Método:

1. Material biológico:

1 ml de muestra (suero, plasma u orina)

2. Técnica:

- a) Colocar en un tubo de ensaye de 13 X 100 ml, .01 ml de la muestra.
- b) Añadir 0.5 ml de la solución de ureasa mezclar y dejar reposar 30 minutos.
- c) Agregar 3.5 ml de solución fenolada de nitroprusiato de sodio y agitar.
- d) Se añade 0.5 ml de la mezcla a volúmenes iguales de hipoclorito de sodio e hidróxido de sodio. Se deja reposar 10 minutos.
- e) Leer a longitud de onda de 550 nm ajustando a 100% de transmitancia con blanco de reactivo.

3. Curva de Calibración.-

Disolver en 5 matraces aforados las cantidades siguientes:

MATRAZ AFORADO A 100 ml	MILILITROS DE SOLUCION DE UREA (al 1.0%)	AGUA DESTILADA c.b.p.	MILIGRAMOS EN 100 ml.
1	2.5	100	25
2	5.0	100	50
3	10.0	100	100
4	15.0	100	150
5	20.0	100	200

De cada una de estas diluciones se toman 0.01 ml y se pro
sigue como indica la técnica a partir del paso b.

Valores Normales:

de 16 a 35 mg/100 ml

D. Medidas de seguridad y control:

Debe evitarse la contaminación del medio ambiente con va
pores de amoniaco.

Cuando las lecturas son altas puede diluirse con agua des
tilada hasta tres veces sin necesidad de repetir la prueba.

F Bibliografía:

Weller H. 1962: Clinical Importance and determination of —
blood lipid especially critical observation on colesterol —
determination. Rontgen as indophenol blue by chloramine-T i-
xidation. Physiol. Chemic 320:241.
Stegemann, H.: y Noeschke; V.: 1962: Microdetermination of —
nitrogen as indophenol blue by chloramine-T ixidation. Physi
ol. Chemic 320:241
Kaplan, A. 1965: Urea nitrogen and urinary ammonia, in "Stan-
dard Methods of clinical Chemistry" Academic Press New York
5:245-246.

ACIDO URICO.-

(Técnica de Caraway)

A. Fundamento:

El ácido úrico reduce al fosfotungstato en medio alcalino, se produce un compuesto de color azul cuya intensidad es proporcional a la cantidad de ácido úrico presente.

B. Material y equipo:

Reactivos:

1. Tungstato de sodio al 10 %
Tungstato de sodio 100 gr
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
Disolver y aforar
2. Acido sulfúrico 2/3 N
Acido sulfúrico 1.85 ml
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
Mezclar aforar y titular.
3. Solución de ácido tungstico
Tungstato de sodio al 10 % 50 ml
Acido ortofosforico 0.05 ml
Acido sulfúrico 2/3 N 50 ml
Agua destilada 800 ml
Al agua destilada se le agrega mezclando el tungstato de sodio el ácido ortofosfórico y el ácido sulfúrico.
4. Solución de carbonato de sodio al 10%
Carbonato de sodio anhidro 10 gr
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
Disolver y aforar
5. Reactivo de Acido fosfotungstico Follin y Denis
Tungstato de sodio libre de molibdato 50 gr
Agua destilada 400 ml
Acido ortofosfórico 40 ml
Disolver el tungstato de sodio y mezclarlo con el ácido ortofosfórico poner a reflujo durante 2 hrs. enfriar a temperatura ambiente y aforar a 500 ml con agua destilada

6. Acido fosfótungstico diluido
Medir 10 ml del reactivo Föllin y Denis, aforar a 100 ml con agua destilada.

7. Solución de ácido úrico 100 mg/100 ml
Acido úrico 1 gr
Carbonato de litio 0.60 gr
Formaldehído al 40% 20 ml
Acido sulfúrico 25 ml
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
Disolver el ácido úrico en la solución de carbonato de litio agregar el formaldehído y el ácido sulfúrico mezclar y aforar.

C. Metodo:

Material biológico:

1 ml de muestra (suero o plasma)

Técnica:

- a) Colocar en un tubo de ensaye 1 ml de muestra
- b) Agr g r 9 ml de solución de ácido tungstico mezclar fil - trar o centrifugar.
- c) Marcar dos tubos B (blanco) y P(problema)
- d) En el tubo p poner 5 ml de filtrado, y en el tubo B me--- dir 5 ml de agua destilada.
- e) Añadir a cada tubo 1 ml de la solución de carbonato de sodio al 10% y mezclar.
- f) Dejar reposar durante 10 minutos
- g) Agregar a cada tubo 1 ml de ácido fosfotúngstico diluido mezclar y dejar reposar durante 30 minutos.
- h) Leer en longitud de onda de 700 nm ajustando al 100% de transmitancia con el tubo B.

Curva de calibración:

De la solución de ácido úrico (100 mg/100 ml) medir tres mililitros en un matraz volumétrico de 200 ml y aforar con agua destilada. La concentración que se obtiene. es de 1.5 mg /100 ml.

TUROS	AGUA DESTILADA	SOLUCION DILUIDA DE ACIDO URICO 1.5 mg/100 ml	mg/100 ml DE ACIDO URICO
1	4	1	3
2	3	2	6
3	2	3	9
4	1	4	12
5	0	5	15

Con 1 ml de cada tubo proseguir desde el paso b.

Valores Normales:

Hombres: de 3 a 7 mg/100 ml

Mujeres: de 2 a 6 mg/100 ml

Bibliografía:

Caraway, W.T. 1963. Uric acid in standar methods of clinical chemistry. New York Academic press 4:239.

CREATININA.-

(Técnica de Bonsnes y Taussky)

A. Fundamento:

El picrato en solución alcalina dá una coloración amarilla naranja con la creatinina cuya intensidad es proporcional a la concentración de creatinina.

B. Material y equipo:

Reactivos:

- Solución de ácido picrico 0.04 M
Acido picrico 10 gr
Agua c.b p. 1000 ml
Disolver en agua caliente y aforar.
- Hidróxido de sodio 0.75 N
Hidróxido de sodio 30 gr
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
Disolver aforar y titular.
- Solución de creatinina (1 mg/ml)

Creatinina 1 gr
 Acido clorhídrico 0.1 N c.b.p. 1000 ml
 Disolver y aforar

4. Solución diluida de creatinina 0.1 mg/ml
 De la solución 3 tomar 10 ml y llevarlo a 100 ml con -
 solución de ácido clorhídrico 0.1 N
 Mezclar.

5. Solución de Acido clorhídrico 0.1 N
 Acido clorhídrico 3.65 gr
 Agua c.b.p. 1000 ml
 Mezclar aforar y titular.

C. Método:

Material biológico:

3 ml de filtrado de Follin-Wu

- a) Colocar 3 ml de filtrado de follin en un tubo de ensaye -
de 15 X 150 mm con aforo a 10 ml.
- b) Añadir 1 ml de ácido picrico y 1 ml de hidróxido de sodio
mezclar y dejar reposar durante 15 minutos.
- d) Leer a una longitud de onda de 540 nm

Curva de Calibración:

TUBO No.	SOLUCION DE CREATININA 0.1 mg/ml	AGUA DESTILA DA C.B.P.	CREATININA mg/100 ml en SANGRE.
1	1	100	1
2	2	100	2
3	3	100	3
4	4	100	4
5	5	100	5
6	6	100	6

De cada una de estas diluciones tomar 3 ml ponerlos en sus -
 respectivos tubos y proseguir como se indica en la técnica a
 partir del paso b.

Valores Normales:

De 0.5 a 1.5 mg/100 ml de sangre.

Bibliografía:

Bonsnes, R.W. y Taussky, H.J.: On the Colorimetric Determination of Creatine by the Jaffe Reaction. J. Biol. Chem. 158: 581, 1945.

PROTEINAS TOTALES Y FRACCIONES A/G

(Biuret)

A. Fundamento:

Las proteínas dan coloración violeta en presencia de iones cúpricos en solución alcalina, proporcional a la cantidad de proteínas presentes. La reacción es de enlace peptídico.

B Material y equipo:

Reactivos.

1. Cloruro de sodio 0.85%

Cloruro de sodio 8.5 gr

Agua c.b.p. 1000 ml

Disolver y aforar

2 Reactivos de Biuret

Sulfato de cobre 1.5 gr

Tartrato de sodio y potasio 6 gr

Yoduro de potasio 1 ml

Agua c.b.p 1000 ml

En un matraz volumetrico de 1000 ml poner sulfato de cobre y el tartrato de sodio y potasio, agregar aproximadamente 500 ml de agua destilada y agitar hasta disolución; agregar con agitación constante 300 ml de hidróxido de sodio 2.5 N y mezclar. Agregar el yoduro de potasio y agitar -- hasta disolución.

NOTA: Aforar a 1 litro y conservar en frasco obscuro.

La estabilidad del reactivo es grande pero debe descartarse si se forma un precipitado negro o rojizo.

3. Hidróxido de sodio 2.5 N

Hidróxido de sodio 100 gr

Agua libre de CO₂ c.b.p. 1000 ml

Disolver y aforar.

Diluir 20 ml de esta solución a 100 ml y titular con ácido

Clorhídrico 0.5 N, usando fenolftaleína como indicador. Para 20 ml de la dilución deben gastarse 20 ml de la solución de ácido clorhídrico 0.5 N.

4. Sulfato de sodio 26.8%
Sulfato de sodio 268 g
Agua c.b.p. 1000 ml
Disolver y aforar

C. Método:

Material biológico:

1.0 ml de suero sanguíneo

Técnica:

- a) en un tubo de ensaye 9.5 ml de cloruro de sodio al 0.85% y 0.5 ml de suero problema, agitar para mezclar.
- b) En un tubo de ensaye de 18 X 150 mm poner 2 ml de la muestra diluida.
- c) En otro tubo de ensaye de 18 X 150 mm que servirá de blanco, poner 2 ml de cloruro de sodio al 0.85%
- d) A cada tubo agregar 8 ml de reactivo de Biuret y mezclar por inversión.
- e) Dejar 30 minutos a temperatura ambiente y leer a una lóngitud de onda de 540 nm.
- f) Ajustar a 100% de transmitancia con blanco de reactivos.

SEROALBUMINA.-

En un tubo de ensaye de 15 X 125 mm poner 9.5 ml de sulfato de sodio al 26.8% agregarle 0.5 ml de suero, tapar el - tubo, agitarlo bien y poner en estufa a 37°C por espacio de 24 hrs. Agregar éter sulfúrico anhidrido 2 ml. Centrifugar - a 2500 r.p.m. 10 minutos , del líquido inferior que debe es- tar transparente tomar 2 ml y añadirle 8 ml de reactivo de - Biuret. Leer a longitud de onda de 540 nm. Antes de leer de-

jarse a temperatura ambiente por 30 minutos.

Con el sulfato de sodio se precipita la globulina quedando en solución las albúminas séricas, restando el valor de las proteínas totales al de seroalbúminas se obtiene por diferencia el valor de las seroglobulinas.

3. Calibración:

De un versatol que contenga 7g/100 ml de proteínas totales, tomar 1.0 ml y llevarlo a 10 ml con solución salina 0.85% obtener la concentración de 7 g/100 ml.

TUBO	SOLUCION SALINA ml	VERSATOL DILUIDO ml	PROTEINAS g/100 ml
1	2.0	0.0	0
2	1.5	0.5	3.5
3	1.0	1.0	7.0
4	0.5	1.5	10.5
5	0.0	2.0	14.0

Proseguir como se indica en la técnica a partir del paso d

4. Valores Normales:

Proteínas totales: 6 a 8 g/100 ml de suero
Seroalbúminas: 3.6 a 5 g/100 ml de suero.

E Bibliografía:

Reinhold J.G. 1953: Standard Methods of clinical chemistry
New York, Academic Press 1:88

DETERMINACION DEL COLESTEROL.-

Metodo de Schoenheirmer, Zak y Ferro Ham.

A. Fundamento:

El ácido acético, el anhídrido acético y el ácido sulfúrico

co producen con el colesterol un compuesto de color verde -
cuya intensidad es proporcional a la concentración de Cole-
sterol existente.

B. Material y Equipo:

Reactivos:

- 1) Reactivo de colesterol
 - Anhídrido acético 450 ml
 - Acido acético 450 ml
 - Acido sulfúrico 100 ml
 - Mezclar y conservar en el refrigerador

- 2) Digitonia al 1 %
 - Digitonina 10 g
 - Alcohol metílico c b.p. 1000 ml
 - Disolver y aforar.

- 3) Solución de colesterol 400 mg/100 ml
 - Colesterol 4 g
 - Acido acético glacial c.b.p. 1000 ml
 - Disolver y aforar.

C Método:

1. Material biológico:

0.6 ml de suero sanguíneo.

2. Técnica.

- a) medir 0.1 ml de suero en un tubo de ensaye
- b) Agregar 5 ml del reactivo de colesterol
- c) Mezclar suavemente hasta que la turbiedad se haya disper-
sado.
- d) Colocar los tubos en un baño a 37°C durante 10 minutos
- e) Sacar los tubos de baño y mezclar.
- f) Leer a 625 nm
- g) Llevar a 100% de transmitancia con blanco de agua.

3. Técnica para colesterol libre.

- a) Medir 0.5 ml de suero en un tubo de ensaye.
- b) Agregar 4.5 ml de alcohol isopropílico, tapar y agitar vigorosamente, dejar reposar durante 5 minutos y volver a agitar Centrifugar a 2500 r.p.m durante 10 minutos.
- c) Medir 1 ml del sobrenadante en un tubo de ensaye.
- d) Agregar 0.5 ml de la solución digitonina al 1 por ciento y 0.5 ml de agua destilada dejar reposar durante 10 minutos. Mezclar y centrifugar a 2500 r.p.m. durante 10 minutos.
- e) Eliminar el líquido sobrenadante cuidadosamente evitando arrastrar al precipitado.
- f) Agregar al precipitado 3 ml de acetona y mezclar perfectamente.
- g) Centrifugar a alta velocidad durante 10 minutos, eliminar el líquido sobrenadante y drenar el tubo.
- h) Evaporar el precipitado en baño de agua hirviendo y continuar como se indica en la técnica para colesterol total a partir del paso b.

4. Calibración:

Colocar en matraces aforados lo siguiente:

MATRAZ AFORADO 100 ml	SOLUCION DE COLESTEROL (4 mg/ml)	AC. ACETICO GLACIAL c.b. p. 50 ml	COLESTEROL mg/ 100 ml
1	10 ml	50	80
2	20 ml	50	160
3	30 ml	50	240
4	40 ml	50	320

De cada una de las diluciones tomar 0.1 ml y continuar como se indica en la técnica a partir del paso b.

5. Valores Normales:

Colesterol total: de 150 a 310 mg/100 ml

Esteres de colesterol: de 50 a 70% del colesterol total

Esteres del colesterol = colesterol total-colesterol libre.

D. Bibliografía:

B. Zak R.C. Dickenman, E.E. White, H.1954:Rapid estimation of free and total cholesterol. Amer. Journal Clin of pathology 24:1307.

Ferro, P.V. y Ham A.B. 1960:Rapid determination of total and free cholesterol in serum. Amer Journal of clinical pathology 33:545.

Schoenheimer. R. y Sperry W.M. 1934: Amicromethod for --

the determination of free and combined cholesterol. J. Biol. Chem. 106:745.

CEFALIN COLESTEROL.-

(Técnica de Hanger)

A. Fundamento:

Esta prueba se basa en la propiedad que tiene la gamaglobulina de provocar la floculación de las soluciones de cefalín-colesterol cuando la concentración de sero-albúminas se encuentra disminuída.

B. Material y equipo:

Reactivos:

1. Solución de NaCl al 0.85%
Cloruro de sodio q.p. 8.5 g
Agua c.b.p. 1000 ml
Disolver y aforar
2. Antígeno de cefalín colesterol
(Reconstruir de acuerdo a las intrucciones del frasco).
3. Reactivo diluído de cefalín colesterol.
En matraz de 50 ml colocar 35 ml de agua destilada y calentar a 70°C añadir 1.0 ml. de antígeno, hervir lentamente hasta reducir el volumen a 30 ml.

C. Método:

Material biológico:

1.0 ml de suero sanguíneo.

Técnica:

- a) En un tubo de 13 X 10 mm colocar 0.2 ml de suero (la prueba debe hacerse dentro de las tres horas siguientes de haber sido extraída la sangre).
- b) Añadir 4 ml de solución de NaCl al 0.85% y 1.0 ml de reactivo diluído de cefalín colesterol.

c) Agitar y tapar. Dejar reposar en la obscuridad.

4. Valores Normales:

Normalmente no debe de haber floculación, si la hay se --
marcará una a cuatro cruces.

D. Bibliografía:

Marjoire K. 1958; Standar Methods of clinical Chemistry.
New York N.Y. Academic Press Inc. 2:12.

TIMOL.-

(Turbiedad y floculación)
(Técnica de Maclagan)

A. Fundamento:

El suero de pacientes con enfermedades hepáticas parenqui-
matosas produce turbiedad y floculación al ser mezclado con
timol en solución amortiguadora barbitúrica, por la forma--
ción de un complejo de proteína-timol-fosfolípido.

B. Material y equipo:

Reactivos:

1. Solución amortiguadora de timol
Barbital sódico 2.6 g
Acido dietilbarbitúrico 2.76 g
Timol al 10 por ciento 10 ml
Agua c.b.p. 1000 ml
Disolver. mezclar y aforar
Ajustar el pH de 7.5 a 7.6
2. Cloruro de Bario 0.0962 N
Cloruro de Bario 11.73 g
Agua c.b.p. 1000 ml
Disolver y aforar.
3. Acido sulfúrico 0.2 N
Acido sulfúrico q.p. 9.8 g
Agua c.b.p. 1000 ml
Mezclar. aforar y titular.

C. Método:

Material biológico:

1.0 ml de suero sanguíneo

Técnica:

- a) Añadir a 0.1 ml de suero 6 ml de solución amortiguadora de timol.
- b) Mezclar por inversión.
- c) Leer a los 30 minutos a una longitud de onda de 650 nm.
- d) Después de leer la turbiedad dejar reposar los tubos 23 hrs. Si hay floculación hacer las anotaciones con cruces.

3 Calibración:

Preparación estándar:

En un matraz aforado de 100 ml colocar 5 ml de $BaCl_2$ 0.0962

N con H_2SO_4 0.2 N.

TUBO No.	ACIDO SULFURICO 0.2 N (ml)	CLORURO DE BARIO 0.0962 N (ml)	UNIDADES
1	10.0	0.0	0
2	8.65	1.35	5
3	5.95	4.05	15
4	3.25	6.75	25
5	0.55	9.45	35

4. Valores Normales:

Turbiedad: de 0 a 5 Unidades

Floculación: Negativa.

D. Bibliografía:

Maclagan, N.F. 1944. The Thymol Turbidity Test as an Indicator of Liver Disfunction Brit. J. Exper. Phat 25:234

Shank, R.E. y Hoagland. C.L. 1946: A Modified Method for the Quantitative determination of Thymol turbidity reaction of - serum. J. Biol. Chem. 162:133

Reinhold: J.G. 1960 Advances in clinical chemistry, Nueva York, H. Sobotka and Steward Academic Press 3:84.

DETERMINACIONES SERICAS.

BILIRRUBINAS.-

(Técnica de Malloy-Evelin)

A Fundamento:

El ácido sulfanílico diazotado se une con la bilirrubina para formar la azobilirrubina de color rosa, proporcional a la cantidad de bilirrubina presente.

B. Material y equipo:

Reactivos:

1. Reactivo diazo blanco

Acido clorhídrico 15 ml
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
Mezclar aforar y titular.

2. Reactivo diazo A

Acido sulfanílico 1 g
Acido clorhídrico 15 ml
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
Disolver el ácido sulfanílico, añadir el ácido clorhídrico y aforar.

3. Reactivo diazo B

Nitrito de sodio 500 g
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
Disolver y aforar.

4. Solución diluída de bilirrubina 0.02 mg en 1.0 ml

Diluir el versatol pediátrico de 20 mg en 100 ml uno a 10

5. Diazo reactivo Ehrlich

Reactivo diazo A 10 ml
Reactivo diazo B diluído 0.3 ml
Mezclar.

NOTA: Debe prepararse en el momento de usarse.

C. Método:

Material biológico:

0.4 ml de suero.

Técnica:

- a) Diluir 1 ml de suero con 9 ml de agua destilada.
- b) Marcar 4 tubos de ensaye con los números 1 2 3 y 4.
- c) En los tubos 1 y 2 colocar 5 ml de Agua destilada.
- d) En los tubos 3 y 4 colocar 5 ml de alcohol metílico.
- e) Agregar 1 ml del reactivo de diazo blanco a los tubos 1 y 3.
- f) Añadir 1 ml del diazo reactivo de Ehrlich a los tubos 2 y 4.
- g) Agregar a los cuatro tubos, 4 ml de suero diluido y mezclar
- h) Dejar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- i) Leer a longitud de onda de 540 nm
- j) Poner el 100% de transmitancia con los tubos 1 y 3.

3. Calibración:

Reconstituir un versatol pediátrico de concentración 20 mg en 100 ml.

TUBOS	AGUA DESTILADA ml	ALCOHOL METILICO ml	VERSATOL PE DIATRICO DI LUIDO 0.02 mg en 1 ml.	mg/100
1	4.0	5.0	0.0	0
2	3.5	5.0	0.5	2.5
3	3.0	5.0	1.0	5.0
4	2.5	5.0	1.5	7.5
5	2.0	5.0	2.0	10.0

Agregar a cada uno de los tubos 1 ml de diazo reactivo.
Dejar reposar durante 20 minutos leer en longitud de onda de 540 nm ajustando a 100% de transmitancia con el tubo No. 1.

4. Valores Normales:

Bilirrubina directa: 0 mg/100 ml

Bilirrubina indirecta: de 0.2 a 0.8 mg/100 ml

D. Bibliografía:

Malloy, H.T. y Evelyn K.A. 1937: The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter, J. BIOL. Chem. 119:431.

Henry, R.J. 1964: Clinical chemistry. Principles and technics New York Hoeber Medical Division, Harper and Row Publishers pag. 559.

CREATIN FOSFOCINASA.-

A. Fundamento:

La enzima CPK cataliza la transferencia de un grupo fosfato del 5-trifosfato de adenosina a la creatina formando 5-difosfato de adenosina y fosfato de creatina. En una doble reacción la piruvatocinasa cataliza la transferencia del grupo fosfo-enol-piruvato al 5-difosfato de adenosino, formando 5-trifosfato de adenosina y piruvato, este piruvato reacciona con la 2, 4-dinitrofenilhidrazina e hidróxido de sodio y forma la hidrazona de color amarillo, cuya intensidad es proporcional a la actividad de la enzima.

B. Material y equipo:

Reactivos:

1. Sustrato de creatinafosfoquinasa
2. Solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico
3. Sustrato de creatina
4. Solución de ácido fosfoenolpirúvico y creatina.
5. Solución de piruvato 0.5 μ moles/ml
6. Solución de hidróxido de sodio EDTA.
Hidróxido de sodio 4 N y EDTA.
7. Solución de hidróxido de sodio EDTA.

Pasar cuidadosamente el contenido del frasco a un matraz volumétrico de 1 litro y aforar con agua destilada.

Mezclar y guardar en frasco de polietileno; la solución resultante es EDTA en solución de hidróxido de sodio 0.4 N.

C. Método:

Material biológico:

0.1 ml de suero sanguíneo.

Técnica:

Se preparan dos soluciones, el sustrato de CPK y el blanco del sustrato.

- a) Se reconstituye el sustrato de CPK con 5.5 ml de sustrato de creatina si se efectúan más de 5 pruebas y con 1.2 ml de sustrato de creatina si se efectúan menos de 5 pruebas.
- b) Se reconstituye el sustrato de CPK con 5.5 ml de ácido fosfoenolpirúvico y creatina (reactivo 4) o con 1.2 ml dependiendo del número de pruebas que se vayan a efectuar.
- c) Colocar en tres tubos de 18 X 150 mm:

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
Sustrato de CPK 1 ml	Reactivo 4 1 ml	Reactivo 4 1 ml

Poner los tubos a 37°C durante 5 minutos.

Suero problema 0.1 ml	Suero problema 0.1 ml	Agua destilada 0.1 ml
--------------------------	--------------------------	--------------------------

Incubar a 37°C durante 30 minutos.

Añadir 1 ml de reactivo 2

Dejar reposar 20 minutos

Añadir 10 ml de reactivo 7

Mezclar perfectamente

Dejar reposar 15 minutos

Leer en cubetas de 19 X 105 mm, filtro 440

Llevar con el blanco se sustrato a 100% de transmitancia

Leer el blanco del problema

Leer el problema

Curva de Calibracion:

TUBO No.	St. CREATININA FOSFOCINASA Reac. No. 5	AGUA DESTI LADA	UNIDADES CPK ACTIVIDAD U.I.
1	0 ml	1.1 ml	0
2	0.2 ml	0.9 ml	33
3	0.4 ml	0.7 ml	67
4	0.6 ml	0.5 ml	100
5	0.8 ml	0.3 ml	133

Trazar la curva de calibración en papel semilogarítmico

Calculos:

Determinar las unidades del problema y del blanco en la curva, restar a las unidades problema las unidades del blanco y se obtienen las unidades de CPK.

Valores Normales:

Hombres: hasta 35 U.I. (Promedio 17)

Mujeres: hasta 25 U.I. (Promedio 12)

Medidas de seguridad y control:

El suero no debe estar hemolizado

Bibliografía:

Nutall, F.Q. y Wedin, D.S. 1966: A simple rapid colorimetric method for determination of creatine kinase activity Journal of Lab. and clinical Medicine. 68:324.

TRANSAMINASA GLUTAMICA OXALACETICA.-

(Técnica de Reitman-Frankel)

A. Fundamento:

La TGO cataliza la transferencia del grupo amino del ácido aspártico al ácido alfa-cetoglutarico, formando como uno de los productos ácido oxalacético que reacciona con la ---
2 4-dinitrofenilhidrazina, dando origen al acetohidrazona -

que en presencia del hidróxido de sodio produce una coloración café intensa proporcional a la cantidad de ácido presente en la muestra.

B. Material y equipo:

Reactivos:

1. Substrato para TGO
Acido alfa-cetoglutarico 0.292 g
Acido DL-aspartico 26.6 ml
Hidróxido de sodio 1 N 200 ml
Buffer fosfato 0.1 M pH 7.4 c.b.p. 1000 ml
Disolver las sustancias en el hidróxido de sodio ajustar el pH y aforar.
2. Solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina
2 4-dinitrofenilhidrazina 0.198 g
Acido clorhídrico 1 N c.b.p. 1000 ml
Disolver y aforar.
3. Hidróxido de sodio 0.4 N
Hidróxido de sodio 16 g
Agua c.b.p. 1000 ml
Disolver, aforar y titular.
4. Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4 :
 - A. Solución de fosfato disódico
Fosfato disódico 14.2 g
Agua c.b.p. 1000 ml
Disolver y aforar
 - B. Solución fosfatomonopotásico
Fosfatomonopotásico 13.609 g
Agua c.b.p. 1000 ml
Disolver y aforar
Mezclar 840 ml de la solución A y 160 ml de la solución B, si es necesario ajustar el pH a 7.4

Método:

Material biológico:

0.2 ml de suero sanguíneo.

Técnica:

- a) A 1 ml de sustrato TGO preclentado 5 minutos a 37°C, añadir 0.2 ml de suero: mezclar.
- b) Incubar a 37°C durante 60 minutos
- c) Añadir 1 ml de 2 4-dinitrofenilhidrazina mezclar y dejar a temperatura ambiente 20 minutos.
- d) Agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0.4 N mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- e) Leer a longitud de onda de 505 nm
- f) Ajustar a 100% de transmitancia con blanco de reactivo.

NOTA: Si la concentración es mayo de 200 Unidades hay que -- diluir el suero 1:10 con agua destilada y el resultado se -- multiplica por 10.

CURVA DE CALIBRACION.-

TUBO no.	SUSTRATO TGO ml	SUERO PA__ TRON ml	AGUA DESTI LADA ml	UNIDADES
1	10	0	0.2	0
2	0.8	0.2	0.2	65
3	0.7	0.3	0.2	97.5
4	0.6	0.4	0.2	130.0
5	0.5	0.5	0.2	162.5

Continuar como se indica en la técnica a partir del paso b
Reconstituir un versatol E con concentración de 331 Unidades de acuerdo con las instrucciones del fabricante tomar 2 ml y llevarlos a 10 ml con agua destilada.

TUBO No.	SUSTRATO TGO ml	DILUCION DE VERSATOL ml	AGUA DESTI LADA ml	UNIDADES
1	1	0	0.2	0
2	0.8	0.2	0.2	66.2
3	0.7	0.3	0.2	99.3
4	0.6	0.4	0.2	132.4
5	0.5	0.5	0.2	165.1

Continuar como se indica en la técnica a partir del paso b

Valores Normales:

De 8 a 40 Unidades

Bibliografía:

Reitman, S. y Frankel S. 1957: A Colorimetric Method for the determination of serum glutamic Pyruvic Transaminase. Am J. Clin Pat. 28:36

White W. y Frankel S. 1965: Chemistry for medical technologist 2º Ed. 247.

TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA.-

(Técnica de Reitman-Frankel):

La TGP cataliza la transferencia de un grupo amino de la DL-alanina, el alfa-cetoglutarico, formando como uno de los productos de la reacción ácido piruvico que reacciona con la 2 4-dinitrofenilhidrazina y dá origen a la cetohidrazona que en presencia de hidróxido de sodio producen una coloración café intensa que es proporcional a la cantidad de ácido piruvico presente en la muestra.

B. Material y equipo.

Reactivos:

1. Substrato para TGP

Acido alfa ceto glutárico 0.292 g

DL-alanina 17.8 g

Agua destilada 200 ml

Solución amortiguadora fosfato

pH 7.4 c.b.p. 1000 ml

Disolver las sustancias con el agua, ajustar el pH y aforar.

2. Solución de 2 4-dinitrofenilhidrazina

2 4-dinitrofenilhidrazina 0.198 g

Acido clorhídrico 1 N c.b.p. 1000 ml

Disolver y aforar.

3. Hidróxido de sodio 0.4 N
Hidróxido de sodio 16 g
Agua c.b.p. 1000 ml
Disolver, aforar y titular

4. Solución amortiguadora fosfato.

A. Solución de fosfato disódico
Fosfato disódico 14.2 g
Agua c.b.p. 1000 ml

B. Solución de fosfato monopotásico.
Fosfato monopotásico 13.609 g
Agua c.b.p. 1000 ml
Disolver y aforar.

Mezclar 840 ml de la solución A y 160 ml de la solución B si es necesario ajustar el pH a 7.4

C. Método:

Material biológico:

0.2 ml de suero sanguíneo

Técnica:

- a) A 1 ml de sustrato TGP precalentado a 37°C añadir 0.2 ml de suero del paciente, mezclar.
- b) Incubar a 37°C durante 30 minutos
- c) Añadir 1 ml de 2 4-dinitrofenihidrazina mezcla dejar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- d) Agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0.4 N mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- e) Leer a una longitud de onda de 505 nm ajustando al 100% de transmitancia con blanco de reactivos.

NOTA: Si la concentración es mayor a 100 unidades hay que diluir el suero 1:10 con agua destilada y el resultado se multiplica por 10.

Curva de calibración:

Reconstruir un suero de referencia multienzimático con concentración de 65 unidades Reitman-Frankel.

TUBO No.	SUSTRATO TGP ml	SUFERO PATRON ml	ACUA DESTI LADA ml	UNIDADES
1	1.0	0	0.2	0
2	0.8	0.2	0.2	65
3	0.7	0.3	0.2	97.5
4	0.6	0.4	0.2	130
5	0.5	0.5	0.2	162.5

Continuar como se indica en la técnica a partir del paso b

Valores normales:

de 8 a 40 unidades

Bibliografía:

Reitman. S. y Frankel 1957: A colorimetric method for determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic - transaminases. Am. J. Clin. Path. 28:36

White W. y Frankel S. 1965: Chemistry for medical technologist 2a. ed. pag 247.

DESHIDROGENASA LACTICA.-

(Técnica de Cabaud y Wrolewski):

A. Fundamento:

La DL reduce al ácido pirúvico en presencia de DPNH (dihidropiridinnucleotidoreducido) y lo convierte en ácido láctico. Después de esta reducción el resto del ácido pirúvico se hace reaccionar con dinitrofenilhidrazina y forma un piruvato-dinitrofenilhidrazona, esta con una solución alcalina forma un compuesto cuyo color es proporcional a la cantidad de pirúvico presente.

La dinitrofenilhidrazina detiene la acción de la deshidrogenasa del ácido láctico. Mientras mayor sea la actividad de la deshidrogenasa menor será la cantidad de pirúvico

que quede sin ser convertido a láctico.

B. Material y Equipo:

Reactivos:

1. Equipo para determinar deshidrogenasa láctica (Dade)
- 2 Hidróxido de sodio 0.4 N

C. Método:

Material biológico

0.1 ml de suero

Técnica:

- a) Colocar en un tubo de 15 X 150 mm 1 ml de sustrato (que se prepara en el momento de usarse) se disuelve el DPNH del frasco en 1 ml de solución amortiguadora de piruvato.
- b) Incubar en baño de agua a 37°C durante 5 minutos
- c) Agregar 0.1 ml de suero diluido 1:6 con agua destilada.
- d) Incubar en baño de agua a 37°C durante 30 minutos.
- e) Agregar 1 ml de 2 4-dinitrofenilhidrazina.
- f) Dejar reposar 20 minutos.
- g) Agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0,4 N mezclar y esperar 5 minutos.
- h) Leer en longitud de onda de 505 nm ajustando al 100% de transmitancia con un blanco de agua destilada.
- i) Convierta el porciento de transmitancia a unidades de deshidrogenasa láctica/ml en la tabla de calibración.
Si el resultado es mayor de 2000 unidades la determinación se repite con una dilución de 1:5 de la dilución del suero del paso c y el resultado se multiplica por 5.

Curva de calibración:

Todas las soluciones deben estar a temperatura ambiente.

Se preparan las siguientes soluciones:

TUBO No.	REACTIVO No. 5 ml	AGUA ml	UNIDADES DE DESHIDROGENASA LACTICA EN 1.0 ml DE SUERO
1	1.0	0.1	0
2.	0.8	0.3	280
3	0.6	0.5	640
4	0.4	0.7	1040
5	0.2	0.9	1530
6	0.1	1.0	2000

Añadir a cada tubo 1 ml de reactivo revelador de color DPNH y mezclar dejar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Añadir a cada tubo 10 ml de solución de hidróxido de sodio mezclar y dejar a temperatura ambiente 5 minutos.

Leer en longitud de onda de 505 nm ajustando a 100% de transmitancia con agua.

Valores Normales:

de 200 a 500 unidades/ml de suero

Bibliografía:

Cabaud, P.C. y Wroblewski. F. 1958: Colorimetric measurement of lactic dehydrogenase activity of body fluids. Am. J. Clin. Path. 30 234.

FOSFATASA ALCALINA.-

(Técnica de Bessey Lowry-Brock)

A. Fundamento:

La fosfatasa libera el grupo fosfato del p-nitrofenilfosfato, con formación del p-nitrofenol que en medio alcalino se transforma en ion nitrofenolado de color amarillo, cuya -

intensidad es proporcional a la actividad de la enzima. La -
reacción se efectúa en 30 minutos exactamente y se detiene -
por la adición del hidróxido de sodio que inactiva a la enzi-
ma. La unidad de fosfatasa alcalina se define como el número
de milimoles de p-nitrofenol formado en 60 minutos en un li-
tro de suero.

B. Material y equipo:

Reactivos:

1. Solución amortiguadora alcalina pH 10.3
Glisina 75 g
Cloruro de magnesio exahidratado 0.095 g
Hidróxido de sodio 1 N 85 ml
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
Disolver la glisina y el cloruro de magnesio agregar el -
hidróxido de sodio aforar con agua destilada.
2. Substrato amortiguador alcalino pH 10.3 debe prepararse -
en el momento de usarse.
Disolver una tableta de paranitrofenilfosfatodisódico en
1.2 ml de agua destilada y añadir igual cantidad de solu-
ción amortiguadora alcalina pH 10.3
3. Hidróxido de sodio 0.2 N
Hidróxido de sodio 8 g
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
Disolver, aforar y titular.
4. Hidróxido de sodio 0.02 N
Tomar 100 ml de la solución anterior y agregarle agua des-
tilada c.b.p. 1000 ml
5. Solución de paranitrofenol al 0.05mM
Paranitrofenol 0.1391 g
agua destilada c.b.p. 100 ml
Disolver y aforar.

C. Método:

Material biológico:

0.1 ml de suero

Técnica:

- a) Marcar dos tubos con los números 1 y 2 y agregarles 1 ml de sustrato amortiguador alcalino pH 10.3 precalentado -- a 37°C cada uno.
- b) Añadir 0.1 ml de suero al tubo marcado con el número 2 y 0.1 ml de agua al tubo marcado con el 1. Incubar a 37°C - durante 30 minutos exactamente.
- c) Añadir a cada tubo 10 ml de hidróxido de sodio 0.02 N y - mezclar por inversión.
- d) Leer en longitud de onda de 415 nm ajustando al 100% de transmitancia con el tubo 1 y anotar la lectura del tubo 2.
- e) Añadir 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado a cada tubo y mezclar por inversión.
- f) Volver a leer ajustando a 100% de transmitancia con el tubo 1.

Calculos:

Unidades de fosfatasa alcalina =

unidades de la primera lectura-unidades de la segunda lectura

Curva de calibración:

TUBO No.	AGUA DESTILADA	HIDROXIDO DE SODIO 0.2 N ml	SOLUCION DE PARANITROFENOL 0.05 nM	UNIDADES
1	10	1.1	0	0
2	8	1.1	2	2
3	6	1.1	4	4
4	4	1.1	6	6
5	2	1.1	8	8
6	0	1.1	10	10

Seguir la técnica con cada tubo y leer en longitud de onda de 415 nm.

Valores Normales:

Adultos de 0.8 a 2.3 unidades
Niños de 2.8 a 6.7 unidades.

Bibliografía:

Bessey O.A. Lowry O.H. and Brock, M.J. 1946: A method for - rapid determination of alkaline with five cubic milimeters - of serum J. Biol. Chem. 164:321

Tech Bull No. 104 Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. 1960

Berger L. y Rudolph G.N. 1963: Alkaline and phosphatase in standar methods of clinical chemistry S. Meltes, Ed New York Academis Press.

FOSFATASA ACIDA.-

(Técnica de Bassey Lowry-Brock)

A. Fundamento:

La fosfatasa libera al grupo fosfato del paranitrofenilfosfato con formación del paranitrofenol que en medio alcalino se transforma en ion nitrofenolado de color amarillo su intensidad es proporcional a la actividad de la enzima.

La reacción se efectúa en 30 minutos exactamente y se de tiene con la adición del hidróxido de sodio que inactiva la enzima.

B. Material y equipo:

Reactivos:

1. Solución amortiguadora ácida pH 4.8

Acido cítrico 18.907 g

Hidróxido de sodio 1 N 180 ml

Acido clorhídrico 0.1 N 100 ml

Agua destilada c.b.p. 1000 ml

Disolver al ácido cítrico agregar el hidróxido de sodio y el ácido clorhídrico aforar con agua destilada a 1000 ml.

2. Substrato amortiguador ácido pH 4.8

Debe prepararse en el momento de usarse.

disolver una tableta de para nitrofenilfosfatodisódico - en 1.2 ml de agua destilada y agregar igual cantidad de solución amortiguadora ácida pH 4.8.

3. Hidróxido de sodio 0.1 N
Hidróxido de sodio 4 g
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
Disolver aforar y titular.
4. Hidróxido de sodio 0.2 N
Hidróxido de sodio 8 g
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
Disolver aforar y titular
5. Solución de paranitrofenol 10 mM
Paranitrofenol 0.1391 g
Agua destilada c.b.p. 100 ml
Disolver y aforar.
6. Solución de paranitrofenol 0.05 mM
De la solución anterior tomar 5 ml y agregarle agua destilada c.b.p. 1000 ml

C. Método:

Material biológico:

0.2 ml de suero

Técnica:

- a) Marcar tres tubos con los números 1, 2 y 3 y poner 1 ml de sustrato amortiguador ácido pH 4.8 precalentado a 37°C en los tubos 1 y 2.
- b) Agregar 0.2 de suero al tubo 2 y 0.2 ml de agua al tubo 1
- c) Incubar a 37°C durante 30 minutos exactamente.
- d) En el tubo tres mezclar 5 ml de hidróxido de sodio 0.1 N y 0.2 ml de suero.
- e) Agregar 4 ml de hidróxido de sodio 0.1 N a los tubos 1 y 2 mezclar por inversión.
- f) Leer en longitud de onda de 415 nm ajustando a 100% de transmitancia con el tubo 1 y leer el tubo 2.
- g) Leer el tubo 3 llevando a 100% de transmitancia con hidróxido de sodio 0.1 N.

Cálculos:

Unidades de fosfatasa ácida =
unidades del tubo 2 - unidades del tubo 3

Curva de calibración:

TUBO No.	AGUA DESTILADA ml	HIDROXIDO DE SODIO 0.2 N ml	SOLUCION DE PARANITROFENOL 0,05 mM	UNIDADES
1	10	1.1	0	0
2	8	1.1	2	0.47
3	6	1.1	4	0.94
4	4	1.1	6	1.40
5	2	1.1	8	1.87
6	0	1.1	10	2.34

Llevar a 100% de transmitancia con el tubo número 1

Leer a longitud de onda de 415 nm

Valores Normales:

Hombres de 0.13 a 0.63 unidades

Mujeres de 0.01 a 0.56 unidades.

D. BIBLIOGRAFIA:

Berger L. y Rudolph, G N. 1963, Alkaline and acid phosphatase in standar methods of clinical chemistry. S. Meites Ed. New York Academic Press.

Bessey O.A. Lowry O.H. 1960, J.Biol. Chem. Tech Bell No. 104 Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. 164: 321.

FRACCION PROSTATICA DE LA FOSFATASA ACIDA

(Método de Fishman Modificado)

A. FUNDAMENTO:

Para medir la fracción prostática de la fosfatasa

ácida se mide la fosfatasa ácida total en ausencia y en ---- presencia de L-tartrato, la diferencia es la fracción prostá tica de la fosfatasa ácida.

El paranitrofenilfosfato disódico es hidrolizado por la fosfatasa presente en el suero y produce fosfato de sodio y paranitrofenol este compuesto es de color amarilli en soluci ón alcalina, la intensidad del color es proporcional a la ac tividad de la enzima. La fracción prostática se inactiva con el L-tartrato, pero no inactiva la fosfatasa ácida de otro o rigen, la diferencia es la actividad de la fracción prostáti ca.

B. Material y Equipo.-

Reactivos:

1. Substrato en solución amortiguadora ácida
Solución amortiguadora ácida (Solución A)
Acido cítrico 18.907 g
Hidróxido de sodio 1 N 180 ml
Acido clorhídrico 0.1 N 100 ml
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
Solución de paranitrofenilfosfatodisódico 0.4 g% (solución B)
Paranitrofenilfosfatodisódico 0.4 g
Agua destilada c.b.p. 100 ml
Mezclar volúmenes iguales de soluciones A y B y ajustar a pH de 4.8 a 4.9 si es necesario. Almacenar alicuotas de 1 ml y guardar en el congelador.
2. Solución de hidróxido de sodio 0.1 N
Hidróxido de sodio 4 g
Agua destilada c.b.p. 1000 ml

3. Acido clorhídrico 0.1 N
 Acido clorhídrico concentrado 8.3 ml
 Agua destilada c.b.p. 1000 ml

4. Tartrato 0.2 M
 Acido tartárico 3.002 g
 Agua destilada 50 ml
 Hidróxido de sodio 1 N 35 ml
 Ajustar el pH a 4.9 y llevar hasta 100 ml con agua destilada.

C. Método:

Material biológico:

0.5 ml de suero.

Técnica:

Se procede de la manera siguiente:

TUBOS	BLANCO	PROBLEMA "A"	PROBLEMA "B"	TESTIGO
Substrato	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	...
Agua Destilada	0.2 ml	0.1 ml	0.1 ml
Tartrato 0.2 M	0.1 ml
Suero	...	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Incubar a 37°C durante 30 minutos				
NaOH 0.1 N	1.9 ml	1.9 ml	1.0 ml	2.4 ml

NOTA: Se leen los tubos A y B contra blanco y el testigo contra NaOH 0.1 N a una longitud de onda de 415 nm. Se resta el valor del testigo del valor de los problemas A y B el resultado del tubo A es la fosfatasa ácida total la diferencia --

del tubo A menos el resultado del tubo B es la fracción prostática.

Valores Normales:

Fosfatasa ácida: Hombres = 0.13-0.63 unidades
total Mujeres = 0.01-0.56 unidades
Fracción prostática de 0 a 0.15 unidades.

Bibliografía:

Frankel S. 1970: Enzimes, chapter 10 in Gradwohl's Clinical Laboratory methods in diagnostic, Seventh edition Saint Louis The C.V. Mosby Company pag. 114.

DETERMINACION DE AMILASA

(Método Yodimétrico)

A. Fundamento:

Este método se basa en la medición de la disminución en la concentración del sustrato (almidón). Es decir, las moléculas de almidón que poseen más de 30 unidades de glucosa dan un color azul intenso con yodo, las moléculas formadas de 8 a 10 unidades de glucosa dan un color rojo metálico y las -- constituidas de 4 a 6 unidades glicosidas no dan ningún color, por lo tanto, la disminución del color azul intenso del almidón, después de un periodo arbitrario de incubación, sirve como una medida de la actividad amilástica.

B. Material y equipo:

NOTA: Con excepción de la heparina, todos los anticoagulantes comunes inhiben la actividad de la amilasa. Por consiguiente

solo habrán de efectuarse determinaciones de amilasa en suero.

Las muestras de suero y orina son estables a temperatura ambiente durante un mínimo de una semana y en refrigeración por más de dos meses.

NOTA: Hay que tener gran cuidado el pipetear la muestra y -- los reactivos para no contaminar el problema con saliva, pues tiene un contenido de amilasa aproximadamente 700 veces superior al de suero.

C. Procedimiento:

1. Rotular 2 tubos de ensaye con las letras C (control) y P (problema), respectivamente.
 2. Pipetear en cada tubo de ensaye 2,25 ml de sustrato de almidón amortiguado y colocarlos en baño maría a 37°C durante 10 minutos.
 3. Añadir 0.25 ml del suero problema al tubo P anotar este tiempo e incubar los 2 tubos a 37°C durante 30 minutos exactamente. (Tanto el tubo C como el P contiene 30 mg de almidón en el tiempo cero).
 4. Al final del periodo de incubación 0.5 ml de HCl 1 N a cada tubo y mezclar bien.
 5. Pipetear 0.25 ml de suero al tubo marcado con la letra C.
 6. De la misma manera que los tubos de ensaye, rotular 2 matraces de aforado con las letras C y P respectivamente y que contengan cada uno aproximadamente 17.5 ml de H₂O destilada y 0.5 ml de HCl 1 N.
 7. Pipetear 0.25 ml del contenido del tubo P al matraz de aforado marcado con la letra P y 0.25 ml del tubo C al matraz correspondiente. Mezclar bien.
 8. Añadir a cada matraz 0.5 ml de la solución de trabajo de yodo y aforar hasta la marca con agua destilada. Mezclar perfectamente.
 9. Medir las absorbencias de C y P frente a un blanco de agua destilada a una longitud de onda de 620 nm.
- NOTA: Si el problema tiene un color verde-amarillo signi-

fica que el almidón ha sido hidrolizado totalmente y por lo tanto habrá de repetirse el análisis con suero diluído 1:4 con solución salinal).

Calculos:

El nivel de amilasa en unidades/100 ml es:

$$\frac{\text{Absorbancia de C} - \text{Absorbancia de P}}{\text{Absorbancia de C}} \times 600$$

NOTA: El factor 600 solo es válido si la absorbancia de C representa 30 mg de almidón.

Valores Normales:

De 50 a 140 unidades/100 ml

DETERMINACION DE LIPASA EN SUERO.-

A. Fundamento:

Se incuba una porción o alicuota de suero con una emulsión de aceite de oliva tamponada con fosfato a pH 8 durante 3 hrs a 37°C, luego se titulan los ácidos grasos liberados con --- NaOH 0.05 N hasta color azul claro con fenoftaleína como indicador.

NOTA: Las muestras de suero utilizadas no deben de tener hemólisis, pues la hemoglobina inhibe la actividad de la lipasa incluso en un 50%.

Método:

1. Rotular dos tubos con: B (testigo) y P (problema). Pipetear a cada tubo 1.25 ml de agua destilada, 5 ml de emulsión de aceite de oliva y exactamente 0.5 ml de solución de amortiguados TRIS.

2. Se introducen los tubos en baño María a 37°C durante 10 - minutos.
3. Agregar al tubo problema 0.5 ml de suero, tapar el tubo - y agitar bien; se introducen en baño María a 37°C duran- te tres horas.
4. Transferir el contenido de los tubos a dos matraces erlen meyer de 50 ml. Enjuagar los tubos con 1.5 ml de tanol al 95% y vertirlos a los matraces correspondientes. Se agre- ga entonces 0.5 ml de suero problema al tubo testigo, se mezcla el contenido de cada matraz por fuerte agitación.
5. Se agregan a cada matraz 5 gotas del indicador de fenofta leína al 1% y se titula el contenido de cada matraz con NaOH 0.05 N, se anotan los volúmenes de NaOH gastados pa- ra la titulación del testigo y del problema.

Cálculos:

En unidades comunes Cherry-Crandall (Tietz-Fierek):
unidades Cherry-Crandal/ml = problema-testigo

En Unidades internacionales

1 unidad de Cherry-Crandall = 277 m UI/ml

Valores Normales:

De 0.05 a 1 unidad Cherry-Crandall/ml ó

De 14 a 280 m U.I./ml

Bibliografía:

Frankel, S. 1970: Enzimez chapter 10 in Gradwohl's Clinical Laboratory methods in diagnostic, Seventh edition Saint Louis The C.V. Mosby Company pag. 114.

GRUPOS SANGUINEOS

GRUPOS SANGUINEOS

Los eritrocitos de un individuo son fuertemente aglutinados cuando se mezclan con el suero normal de otros individuos, y se incuban a temperatura corporal, este fenómeno se conoce con el nombre de isohemaglutinación.

Existen cuatro grupos principales de sangre en la clasificación de Landsteiner; nomenclatura que designa a los grupos sanguíneos según la presencia de aglutinógenos en los eritrocitos.

Los anticuerpos normales a estos aglutinógenos son anti-A y anti-B

Los sueros tienen aglutininas para combinarse con el aglutinógeno de los hematíes y formar la reacción de aglutinación.

Las características A y B de los glóbulos rojos son heredadas según las leyes Mendelianas y se conocen como dominantes estrictos.

El conjunto de los genes heredados de la madre y del padre; se llaman genotipo, y puede determinarse con pruebas de laboratorio. El fenotipo es el tipo o grupo sanguíneo que puede demostrarse directamente por métodos inmunológicos.

El factor Rh es un aglutinógeno, descubierto por Landsteiner y Wener, fué llamado así debido a que la sangre que -

lo contiene se aglutina con antisuero que se produce inyectando conejos con eritrocitos del mono Macacus Rhesus, denominado Rh positivo en los individuos que lo poseen, y negativo a los que carecen de él. Los hematíes del 85% aproximadamente de los individuos contienen este aglutinógeno.

El factor Rh es muy importante para la determinación -- del tipo sanguíneo en el momento en que se requiera de una transfusión.

La transfusión es un procedimiento clínico que le dá al paciente una compensación de su líquido perdido.

REACCIONES Y COMPLICACIONES DE LA TRANSFUSION.-

Factores etiológicos.-

- A) Incompatibilidad dentro del sistema ABO
- B) Sensibilidad Rh (Anti D)
- C) Otros factores y grupos sanguíneos
- D) Aglutinación de los hematíes del receptor por el plasma - del donador.
- E) Pacientes con anticuerpos.
- F) Administración de sangre hemolizada.

Reacciones que presentan:

- 1 Incompatibilidad o hemolítica.- Es la más grave de todas y se produce cuando se administra sangre a un paciente. de un grupo sanguíneo que no es el suyo.

La gravedad del cuadro clínico que presenta el paciente depende en parte de la cantidad de sangre administrada y en parte también de la receptibilidad del paciente.

Síntomas del paciente.-

Puede presentar dolor agudo lumbar, malestar general, taquicardia, palidez, hipotensión, sudor frío, fiebre, todos - estos dependiendo de la cantidad de sangre que se le haya inyectado.

2. Reacciones pirógenas.- Este tipo de reacciones se ha controlado más desde que se dispone de apartos y donantes exentos de pirógenos los síntomas del paciente son parecidos a - los de las reacciones hemolíticas.

3. Reacciones alergicas.- Su sintomatología usual es la urticaria, no son graves y puede presentarse a la media hora de la aplicación en forma de plurito generalizado, edemas, y algunas crisis de asma.

4. Ictericia.- Pueden ser debidas a:

a) hemolisis de los glóbulos del donador antes de la transfusión. Esta se debe a la muerte temprana de los glóbulos por deficiente conservación o manipulación de la sangre.

b) Hemolisis de los glóbulos después de la transfusión -- por incompatibilidad. Se debe a hemolisis de los glóbulos del donante por anticuerpos (aglutininas) existentes en el plasma del receptor.

- c) Hepatitis por suero homólogo. Este no es un proceso hemolítico, sino una hepatitis causada por el virus transmitido con la sangre, el plasma o suero del donador.
- d) Reacciones por el factor Rh.- Esta es creada por embarazos anteriores, transfusiones o hemoterapia.
- e) Reacción por factores raros y transfusiones múltiples. Estas son debidas a factores como Kell-Cellano, C, B, M, N, duffi, etc. generalmente se presentan en pacientes con anemias crónicas que han recibido repetidas transfusiones algunas de las cuales han creado la sensibilización.
- f) Reacciones febriles.- Algunos enfermos de anemia hemolítica o de tipo inmunológico presentan autoanticuerpos específicos, y la administración de sangre de su mismo tipo les causa tales reacciones.
- g) Reacción por administración de sangre hemolizada por demaciado tiempo de conservación, mal estado de solución conservadora o alteración en la temperatura de conservación.

Determinación de grupos sanguíneos (A, B, O) .-

A. Fundamento:

Para identificar los grupos sanguíneos de los individuos se ponen en contacto los antígenos A, B y Rh (antisueros reactivos) con los anticuerpos que recubren los eritrocitos del individuo llevándose a cabo una reacción de aglutinación.

B. Material y equipo:

Material:

jeringa con aguja

Lanceta

Torundas de algodón impregnadas con alcohol etílico al 70%

Placa de vidrio y palillos.

Reactivos:

Antisero reactivo A

Antisero reactivo B

Antisero reactivo D (Rh)

C. Método.-

Material biológico:

1 ml de sangre

Técnica:

- a) Colocar en la placa de vidrio tres gotas de sangre bien separadas entre sí.
- b) Agregar a la primera gota de sangre una gota de antisero reactivo A y mezclar con el palillo.
- c) Agregar a la segunda gota de sangre una gota de antisero reactivo B y mezclar con el palillo.
- d) Agregar a la tercera gota de sangre una gota de antisero reactivo D y mezclar con el palillo.

Interpretación:

Pueden ocurrir dos tipos de reacciones antígeno-anticuerpo:

1. Aglutinación.- Ocurre cuando aparecen granulaciones dife
renciables y observables.

2. Hemólisis.- Cuando se hace una mezcla homogénea y no hay
granulación aparente.

NOTA: La reacción que nos interesa en la determinación de --
grupo sanguíneo es la aglutinación.

Posibles resultados:

ANTI A (primera gota)	ANTI B (segunda gota)	ANTI D (tercera gota)	GRUPO SANGUI NEO
aglutinación	*****	aglutinación	A +
aglutinación	*****	*****	A -
*****	aglutinación	aglutinación	B +
*****	aglutinación	*****	B -
aglutinación	aglutinación	aglutinación	AB -
aglutinación	aglutinación	*****	AB -
*****	*****	aglutinación	O +
*****	*****	*****	O -

NOTA: El Rh se reporta:

Reacción de aglutinación + (positivo)

Hemolisis - (negativo)

Bibliografía:

Imsford, I. y Bowley, C.C. 1955: Techniques in bloos grouping
Oliver & Boyd. Edinburgh.

The determination of the ABO and Rh (D) bloos groups for tran
sfusion M.R.C. Memorandum No. 36 Her Mejesty's Stationary O-
ffice, London 1958.

Race, R. y Sanger, R. 1958: Blood groups in man 3th ed, Char
les C. Thomas, Springfield Illinois.

Delaney. J.W. 1960: Handbook of hematological and blood tran
sfusion technique Butterworth & Co., London.

Mollison, P.L. 1956: Blood transfusion in clinical medicine
2nd. ed. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.

Prueba de Coombs directo.-

A. Fundamento:

Los eritrocitos sensibilizados por un anticuerpo son aglutinados por el suero antigamaglobulina o suero de Coombs.

B. Material y equipo:

Reactivos:

Suero de Coombs
Solución salina isotónica

Material:

Tubo de ensayo de 10 X 75 mm
Pipeta Pasteur
Centrífuga
Papel filtro

C. Método:

Material biológico:

1 ml de sangre con anticoagulante.

Técnica.

Depositar una gota de sangre en un tubo de 10 X 75 mm con pipeta Pasteur. añada solución salina y centrifugue 1 minuto a 3500 r.p.m. repita tres veces el lavado con solución salina, en el último lavado deje escurrir el tubo o seque con papel filtro, desprenda el precipitado y añada una gota de suero de Coombs; centrifugue 20 segundos exactos a 3500 r.p.m. Leer macroscópicamente si existe o no aglutinación.

Valores Normales:

No existe aglutinación (negativa)

Bibliografía:

Docie, J.V. Crookston, J.H. y Christenson, W.N. 1957: In - complete Cold Antibodies role of potentially Haemolytic antibodies. Brit. J. Haemat 3:77.

PRUEBAS CRUZADAS.-

A. Fundamento:

Se ponen en contacto los glóbulos rojos del donador y el suero del receptor, y los glóbulos rojos del receptor con el suero del donador.

Si hay alguna aglutinina en el suero del receptor aglutinarán los glóbulos rojos del donador, y si hay aglutinina en el suero del donador aglutinarán los glóbulos rojos del receptor.

Método:

Material biológico:

a) Sangre del donador.- Todos los frascos de sangre para transfundir llevan sujeto al cuello un tubo "piloto" que contiene la muestra de sangre coagulada aproximadamente 10 ml.

Vaciar la sangre piloto en un tubo de 12 X 75 mm y marcarlo como tubo D.

b) Sangre del receptor.- Un tubo con 5 o 10 ml de sangre coagulada es suficiente para varias pruebas.

NOTA: Es importante anotar el nombre completo de la persona receptor.

Técnica:

a) Los tubos del donador y del receptor se centrifugan 5 min a 1500 r.p.m., para separar el suero del coágulo. El tubo -- del receptor se coloca en el extremo izquierdo de la gradilla con capacidad para 6 tubos.

El tubo del donador se coloca en el extremo derecho de la gradilla, entre ellos se colocan 4 tubos de 10 X 75 mm, los dos próximos al tubo receptor se marcan con la letra R y el número de la gradilla los dos próximos al tubo del donador se marcan con la letra D y el número de la gradilla.

b) Se colocan dos tubos de 12 X 75 en la segunda hilera de -- la gradilla, estos tubos se marcan con las letras RB y DB.

c) A los tubos R y D ponerles 1 ml de solución de cloruro-- de sodio al 0.85%.

d) Con una pipeta Pasteur se extrae el suero del tubo recep-- tor y se colocan dos gotas en el tubo DB y dos gotas en el tu-- bo D vacío.

e) Con la misma pipeta se saca del fondo del tubo receptor -- una cantidad de glóbulos rojos y se deposita en el tubo R -- con solución de cloruro de sodio al 0.85% para hacer una sus-- pensión de glóbulos rojos al 5%.

f) De esta suspensión se coloca una gota en el tubo R vacío y una gota en el tubo RB vacío.

g) Se repite el proceso con la sangre del donador con una pipeta Pasteur se pasan dos gotas de suero del tubo D al tubo R vacío y dos gotas al tubo RB vacío, con la misma pipeta se toman glóbulos rojos del tubo del donador y se pasan al tubo D con solución de cloruro de sodio al 0.85% para hacer una suspensión de globulos rojos al 5%. De esta suspensión se pasa una gota al tubo D y otra al tubo DB.

De esta manera tendremos en el tubo R glóbulos rojos del receptor más suero del donador, esta prueba se llama prueba menor.

En el tubo D tendremos glóbulos rojos del donador más suero del receptor, a esta prueba se le llama prueba mayor por ser la que tiene mayor importancia en las pruebas de compatibilidad.

h) A los tubos RB y DB se les agrega una gota de solución de bromelina, se agitan suavemente los cuatro tubos D,R,DB y RB hasta homogenizar la suspensión.

i) Los tubos R y D se centrifugan a 1000 r.p.m. durante 1 minuto y se observa macroscópicamente si hay aglutinación.

j) Los tubos RB y DB se incuban 15 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se centrifugan a 1000 r.p.m. durante 1 minuto y se observan macroscopicamente.

Resultado:

Al terminar este proceso si no hay aglutinación en ninguno de los dos tubos puede enviarse la sangre para su aplicación.

Bibliografía:

Allen F.H. Jr. 1959: Von Bercken, T. y Boyce S.J.: Cross-matching of blood for massive transfusion Bull. Amer. Ass. Blood Banks 12:267.

Standards for blood transfusion service Joint Blood Council y Amer. Ass. Blood Banks 3ra. Ed. pag. 14, 1962.

BIBLIOGRAFIA DE LOS LIBROS DE CONSULTA:

- 1) Bennett, W. Clois 1976; Serología Clínica ,Ed. Médica Panamericana.
- 2) Byrd, S. Leavell 1978; Hematología, 4a. Edición, Ed. Interamericana.
- 3) Bhagavan, N. 1978; Bioquímica, Ed. Interamericana.
- 4) Castellanos 1965; Hematología Práctica. Ed. Panamericana, Argentina.
- 5) Fettra, B. Robert 1971; Sistemas de Control de Calidad, Ed. Ateneo.
- 6) Freeman, H. James; Beeler, F. Myrton 1974; Laboratory Medicine Clinical Microscopy , Lea & Febiger Philadelphia.
- 7) Ganong, F. Williams 1980; Manual de Fisiología Médica 7a. edición, Ed. El Manual Moderno.
- 8) Gordon, H. 1975; Electroforesis de Proteínas en Gels de poliacrilamida y de almidón, Ed. El Manual Moderno.
- 9) Gordon, S. Albert 1976; Fisiología de las células sanguíneas, Ed. C.F.C.S.A.
- 10) Gross 1973; Medicina Interna Ed. Médica Panamericana, Argentina.
- 11) Ham, W. Artur 1975; Tratado de Histología 5a. edición, Ed. Interamericana.
- 12) Ham, W. Artur 1977; Histología, 7a. edición Ed. - Interamericana.
- 13) Harper, Martin 1982; Química Fisiológica, 8a. edición, Ed. El Manual Moderno.
- 14) Harrow, Mazur 1972; Bioquímica Básica. 10a. edición, Ed. Interamericana.
- 15) Iovine, E.; Selva, A. 1979; El laboratorio en el diagnóstico de las enfermedades, Ed. Médica Panamericana, Argentina.
- 16) Jimenes J. 1975; Fisicoquímica Fisiológica, 4ta. Ed. Editorial Interamericana.
- 17) Koepeb, A. Jhon, 1971; Diagnóstico Clínico del Laboratorio, Ed. Interamericana.
- 18) Leeson, Roland 1978; Histology, 2da. Edición Mac Millan Publisher.
- 19) Leeson, Roland 1975; Anatomía Humana, Ed. Interamericana.
- 20) Lenhinger, Albert 1972; Biochemistry, 6a. Edición Ed Whosth Publiser.
- 21) Limman, James 1975; Hematología, Mc. Millan Publisher
- 22) Loeb, Cecil 1977; Tratado de Medicina Interna, 14a. - Edición. Ed. Interamericana.
- 23) Lynch, J.; S. Raphael 1972; Metodos de Laboratorio, -- 2a. Edición. Ed. Interamericana.
- 24) Medina, Aguilar 1973; Banco de Sangre, Ed. Rampa Médica Mexicana.
- 25) Medina George 1974; Técnicas de Bioquímica aplicada -

- Ed. Interamericana.
- 26) Ogilvit F. 1960; Histopatología, 5a. Edición Ed. Interamericana.
 - 27) Palmer D. 1978; Manual de Gastroenterología Clínica Ed. El Manual Moderno.
 - 28) Platt R. 1972; Atlas de Hematología, Ed. Jims
 - 29) Rodin D. 1975; Analisis Automatizado de Enzimas. Ed. El Manual Moderno.
 - 30) Siggarrd 1980; Estudio Acido-Base de la sangre, 4a. Edición Ed. Panamericana.
 - 31) Sniwely 1980; Líquido y Electrolitos, Ed. Panamericana - Argentina.
 - 32) Soderman, W. 1978; Fisopatología Clínica 5a. Edición Ed. Interamericana.
 - 33) Stanley, W. 1976; Anatomía y Fisiología Humana Comparada 3a. Ed. Editorial Interamericana.
 - 34) Tietz, N. 1972; Química Clínica Moderna, Ed, Interamericana.
 - 35) Tood & Sanford 1978; Diagnóstico Clínico por el Laboratorio 6a. Edición Ed. Salvat.
 - 36) Tood W. 1969; Bioquímica Médica 4a. Ed. Editorial Interamericana.
 - 37) Weldy N. 1973; Líquidos y Electrolitos en el organismo - Ed. Medica Panamericana. Argentina.
 - 38) Widmann , K. 1981; Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio 2a. Edición Ed. Jims.
- Bibliografía disponible en la Biblioteca de Campo 1 de la Facultad de Estudios Superiores para el Area de Química Clínica.
- 39) Gradwohl, R. 1970; Clinical Laboratory Methods and Diagnosis Editorial Sam Frankel 7a. Saint Louis,
 - 40) Goodale R. 1976; Interpretation Clinical Editorial Barcelona Jims
 - 41) Levinson S. 1969; Clinical laboratory Diagnosis 7a. Edición Philadelphia Lea & Febiger.
 - 42) Bacells G. 1978; La Clínica y el Laboratorio 11a. Ed. -- Barcelona, Marin.
 - 43) Wyatt, G. 1976; Manual para asistentes Médicos Ed. Mcgraw-hill, México.
 - 44) Carpenter P. 1982; Inmunología y Serología 2a. Edición - Ed. La Prensa Médica Mexicana.
 - 45) Dowben R. 1971; Cell biology New York Ed. Harper & Row
 - 46) Giese a. 1975; Fisiología celular y general. 3a. Edición Ed. Interamericana.
 - 47) Weiss, L. 1977; The blood cells and hematopoyetic tissues Editorial Macgraw-Hill.;
 - 48) Carpenter 1967; Molecular and cells biology Ed. Belmont
 - 49) Ambrose E. 1977; Biología Celular Ed. Lhambra

- 50) Brown W. Varian 1974; Textbook of cytology 2a. Ed. Saint Louis.
- 51) Dyson Robert 1974 Cell biology a molecular Approach - Ed. Boston Allyn and Bacon.
- 52) Junqueira L. 1976 Biología Celular Ed. La Prensa Médica Mexicana
- 53) Simpson P. 1973; Compuestos organometálicos de elementos de grupos principales Ed. Madrid Alhambra.
- 54) Goldberger Emanuel 1974 Síndrome del equilibrio electrolítico agua y ácido-base. Ed. Barcelona Jims.
- 55) Symposium on Electrolytes 1962; Electrolytes; proceedings Oxford Symposium publication division Pergamon.
- 56) Cutfreud. H 1968 Introducción al estudio de las enzimas. Ed. Barcelona Omega.
- 57) Reed Gerald 1975 Enzymes in food processing 2a. Ed. -- New York Academic Press
- 58) Whitaker Jhon 1972 Principles of enzymology for the -- food sciences Ed. New York M. Dekker.
- 59) Lowe Christopher 1974 Affinity Chromatography Ed. New York M. Dekker.
- 60) Block sey mous Stanton 1977 Di sinfection Sterilizati-- on and preservation Ed. Seymous S. Block 2a. Ed. Philadelphia Lea & Febiger.
- 61) Makin H. 1975 Biochemistry steroid hormones Oxford Blackwell Scientific.
- 62) Bender David A. 1975 Aminoacid metabolism Ed. J. Wiley
- 63) Mann Charles Kenneth 1974 Instrumental Analisis Ed. New York Harper and Row
- 64) Rouviere Henri 1976; Compendio de Anatomía Ed. Salvat
- 65) Tobin Charles 1973 Basic Human Anatomy Ed. McGraw-Hill
- 66) Weiss Leon 1977 The blood cells and hematopotentia McGraw Hill New York
- 67) Peters John Punner 1946 Quantitative Clinical Chemistry Williams and Wilkins Baltimore.
- 68) George N. Papanicolaou 1963 Atlas of Cytology Mass Harvard University
- 69) James L. Bennington Robert A. Fouty 1976 El laboratorio En el diagnóstico clínico Prensa Mexicana México.
- 70) Collins R. Douglas 1973. Illustrated Manual of Laboratory Diagnosis Lippincott Philadelphia
- 71) Gradwohl Rutherford Birchard Hayes 1970 Clinical laboratory Methods and diagnosis Musby Saint Louis
- 72) Kalinou A. 1975 El laboratorio y su interpretación serológica López Buenos Aires.
- 73) Shih, U.E. 1973 Laboratory Techniques for the detection of hereditary metabolic disorders. CRC Press Cleveland

- 74) Thomas George H. 1973. Selected Screening Test for genetic metabolic diseases. Year Book Medical Chicago.
- 75) Bayley William Robert 1973. Diagnóstico Microbiológico Panamericana Buenos Aires.
- 76) Kark- Lawrence and Colls, 1979. Manual práctico del urianálisis 2a. edición. Editorial La Prensa Médica Mexicana.
- 77) Borow- Maxwell, 1976. Respuestas fisiológicas en la salud y enfermedad. Ed. El Manual Moderno S.A.
- 78) Castelazo, Luis, 1974. Manual de procedimientos clínicos del IMSS. México, D.F.
- 79) Enciclopedia Salvat 1971, Tomo II Barcelona.
- 80) Nason D. 1981. Biología Ed. Limusa México D.F.

mes de mayo de 1985.