



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Actualización del manual de prácticas
del laboratorio de Hematología en base
al nuevo plan de estudios de la carrera de QFB.**

TESIS

**Que para obtener el Título de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

Presenta:

MARCOS VELASCO CRUZ

ASESOR:

QFB Georgina Ernestina Ríos Olivera





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Índice

	Pag.
Introducción.....	3
Planteamiento del problema.....	4
Objetivos.....	5
Diseño de investigación.....	6
Módulo I. Procedimientos básicos en el laboratorio de Hematología.....	8
Anticoagulantes.....	9
Toma de muestra.....	13
Módulo II Fórmula roja.....	24
Hematócrito.....	25
Velocidad de sedimentación globular (VSG).....	29
Hemoglobina (Hb).....	34
Recuento de eritrocitos.....	39
Índices eritrocitarios.....	46
Cuenta total de leucocitos.....	49
Recuento plaquetario.....	54
Módulo III. Hematopoyesis. El origen de las células sanguíneas.....	59
Hematopoyesis.....	60
Línea eritroide.....	66
Línea mieloide (Granulocitos, monocitos y megacariocitos).....	75
Línea linfoide.....	85
Módulo IV. Fórmula blanca y pruebas especiales.....	91
Frotis de sangre periférica y cuenta diferencial.....	92
Cuenta de reticulocitos.....	102
Biometría hemática o citometría hemática.....	107
Los autoanalizadores.....	112
Fragilidad osmótica.....	121
Hemoglobinopatías.....	127
Inducción de drepanocitos.....	132
Módulo V. Hemostasia.....	136
Fisiología general de la hemostasia.....	137
Tiempo de sangrado.....	144
Tiempo de coagulación de sangre total.....	146
Retracción del coágulo.....	148
Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa).....	150
Tiempo de protrombina (TP).....	154
Módulo VI. Inmunoematología y Banco de Sangre.....	158
Sistema ABO.....	159
Sistema Rh.....	169
Expresiones débiles del antígeno D (D parcial débil).....	174
La prueba de antiglobulina humana o de Coombs.....	175
Anticuerpos irregulares.....	183
Banco de sangre y las Pruebas cruzadas.....	192
Anexo I. Procedimiento para la operación del sistema ADVIA 120.....	199
Anexo II. Preparación de soluciones.....	201
Bibliografía.....	206

Introducción:

La Hematología es una de las áreas del laboratorio clínico que forma parte importante de los estudios de rutina, por lo cual es de suma importancia que todo laboratorio posea analistas capacitados en esta área. Al ser una ciencia tan basta en información, la actualización constante en esta área es imprescindible, pues día a día se encuentran cosas nuevas referidas a la Hematología, lo cual ofrece información para mejorar las pruebas de laboratorio, optimizar resultados, mejorar costos ante el mercado y sobre todo una mayor cantidad de armas para diagnosticar mejor las patologías hematológicas descritas hasta ahora.

La Hematología dio su primer gran paso con el diseño de técnicas de tinción celular, las cuales dieron las verdaderas bases para el estudio de la sangre. El descubrimiento de la espectrofotometría consintió cuantificar los analitos químicos de la sangre. El diseño de cámaras de contaje permitió estimar la cantidad de células que se tienen en un mililitro de sangre. Estas tecnologías dieron un primer grupo de técnicas para el estudio de la sangre, pero estos procedimientos eran tediosos y empleaban demasiado tiempo. En el afán de mejorar las técnicas hematológicas y consumir menos tiempo de análisis, se diseñó un primer principio de contaje automatizado con base en el descubrimiento, de que las células están provistas de carga eléctrica. Dando con esto un segundo gran paso en el estudio de la sangre. Este hallazgo permitió que se optimizaran los tiempos de análisis y dio base para nuevas tecnologías automatizadas, basadas no solo en principios de interrupción eléctrica (impedancia), sino en métodos ópticos por dispersión de luz (rayo láser) y en la misma bioquímica de las células.

Entonces una de las tareas del QFB en la Hematología es agudizar la vista para definir la morfología celular y relacionarla con la causa de origen (nivel molecular) de la patología, en otras palabras es trasladar la información teórica más reciente de la Hematología al mejoramiento de las técnicas del laboratorio para el estudio de la misma. A partir de esto es que surgió la iniciativa de actualizar la información del manual existente para el laboratorio de Análisis Bioquímico Clínico I Hematología y que hoy con el nuevo plan de estudio pasa a ser únicamente como laboratorio de Hematología.

Marco Teórico

La Carrera Química Farmacéutico Biológica se inicia en la entonces ENEP Zaragoza como resultado de la modificación al plan de estudios de la Carrera de QFB vigente en la Facultad de Química de la UNAM, en septiembre de 1976. Donde se incluía un sistema novedoso de módulos y no asignaturas, para que así el alumno desempeñara un papel activo, es decir, “aprender-haciendo”, generando así una relación teoría-práctica, donde se proponía que el alumno llevara a la práctica los conocimientos teóricos-metodológicos adquiridos en los diferentes cursos que integraban el Plan de Estudios; y que la práctica asimismo retroalimentaría la teoría.

Desde sus inicios la Carrera de QFB se ha ido retroalimentando por las actividades institucionales, por el impacto socioeconómico y el ámbito científico-tecnológico, por lo cual ha sido necesario que el Plan de Estudios se revise y actualice de acuerdo a la situación actual y a la prospectiva, que lleve al QFB a servir a la sociedad responsablemente.

La modificación al Plan de Estudio de la Carrera de QFB se inicio prácticamente desde 1976, sin embargo los primeros reportes se remontan a 1983 cuando el Comité de Carrera comenzó a revisar los objetivos de los módulos, orientándose básicamente a cambiar los contenidos temáticos. La propuesta de modificación fue aprobada en la ENEP Zaragoza hasta el 13 de febrero de 1990, siendo admitido dicho Plan de Estudios hasta el 27 de mayo de 1997 en la sesión ordinaria del H. Consejo Técnico celebrada en dicha fecha. En la primera sesión plenaria extraordinaria del Consejo Académico de las Ciencias Biológicas y de la Salud celebrada el 22 de mayo de 1998 fue aprobada la modificación del Plan de Estudios de la Carrera de QFB con la inclusión de la orientación en Farmacia Clínica. A pesar de la aprobación del nuevo Plan de Estudios el H. Consejo Técnico pide suspender la implantación de la modificación de dicho Plan el 19 de enero de 1999, y no es sino hasta el 28 de febrero del 2003 que se pide la reactivación del Plan de Estudios ya aprobado en 1998. Finalmente el nuevo Plan de Estudios de la Carrera de QFB se implemento por primera vez en el periodo 2005-1 el 10 de agosto del 2004.

Este nuevo Plan de Estudios cuenta con un enfoque fundamentalmente encaminado a la resolución de problemas reales que contribuyan al desarrollo de nuestro país.

En el Plan de Estudios la orientación Bioquímica Clínica tiene un total de 125 horas teóricas y 176 horas prácticas, con 94 créditos de un total de 441.

Con este nuevo Plan de Estudios el Módulo de Análisis Bioquímico Clínico I se transformo en el módulo de Hematología. Impartido en 13 horas a la semana, de las cuales 3 corresponden a la teoría y las 10 horas restantes al Laboratorio. Se obtienen 16 créditos al concluir el módulo.

Este módulo primordialmente se orienta al estudio de la Hematología Básica, disciplina que se encarga del estudio de la sangre y de las funciones de las células sanguíneas en el cuerpo humano, así como de las enfermedades hematológicas primarias y otros padecimientos relacionados que en él suceden. Teniendo un objetivo general¹ dirigido a comprender procesos bioquímicos, fisiológicos, genéticos e inmunológicos involucrados con la hematología para aplicarse en la práctica, y una serie de objetivos específicos que permiten delimitar los conocimientos mínimos que debe adquirir el alumno durante su formación.

Todos los objetivos están planteados de tal manera que no se vean afectados por los nuevos descubrimientos en la materia y que de esta forma el alumno siempre se vea obligado a adquirir los conocimientos recientes para poder apoyar al diagnóstico clínico junto a los médicos.

El cambio de nombre de este módulo llevará a darle la importancia debida a la Hematología en la carrera de QFB impartida en la FES Zaragoza, pues dentro del laboratorio clínico es la 2ª área de mayor demanda de estudios

Planteamiento del problema:

La actualización del manual de Hematología se planteo a partir de que en el periodo 2005-1 se implemento el nuevo plan de estudio para la Carrera de QFB, y era necesario renovar el contenido del manual de prácticas para el laboratorio de Análisis Bioquímico Clínico I por el de manual de prácticas para el laboratorio de Hematología. Para lo cual fue necesario revisar el temario aplicado para impartir la asignatura de Hematología.

¹ Plan de Estudios 1998

Una vez revisado, analizado y cotejado el temario con el manual existente, se observó que no se tenía una organización clara de los módulos de acuerdo al temario, por lo tanto en base al orden de los temas en la teoría se estructurará el manual en 6 módulos para dar el orden adecuado a las prácticas de laboratorio. Los módulos creados para este nuevo manual serán los siguientes:

1. Procedimientos básicos en el laboratorio de Hematología: Donde se describirá el empleo de anticoagulantes, las indicaciones para una buena toma de muestra, incluyendo las áreas adecuadas para la punción, así como los distintos especímenes sanguíneos que pueden extraerse para su análisis.
2. Fórmula roja: Donde se explicaran todas las pruebas relacionadas directamente con los eritrocitos, además del recuento de leucocitos y plaquetas debido a la metodología de estas determinaciones.
3. Hematopoyesis. El origen de las células sanguíneas: Describirá la formación, morfología normal y alteraciones de las células sanguíneas. Para este módulo se emplearan imágenes reales o fotografías de cada célula sanguínea pues las ilustraciones en el manual existente no ofrecen mucha información visual para su identificación.
4. Fórmula blanca y pruebas especiales: Donde se describirá la cuenta diferencial de leucocitos, la automatización en el laboratorio de Hematología, la Biometría Hemática como prueba de rutina y algunas pruebas especiales para dar seguimiento a patologías en los eritrocitos.
5. Hemostasia: Donde se dará una introducción al proceso hemostático y se describirán las pruebas de coagulación más comunes en el laboratorio.
6. Inmunoematología y Banco de sangre: Donde se describirán las pruebas para la tipificación de grupos sanguíneos y las pruebas básicas en el Banco de sangre.

Es necesario también reestructurar la introducción de cada práctica pues año tras año a partir de que se publicó el manual de prácticas para el laboratorio de Análisis Bioquímico Clínico I han surgido nuevos conocimientos sobre la Hematología, por tanto se dará una nueva visión de cada tema con la información bibliográfica más reciente que pueda recavarse. Sin embargo en la metodología de cada práctica no se harán grandes cambios, solo se revisara para eliminar errores textuales y se hará una reestructuración de los fundamentos de las mismas para poder aplicarlos o contrastarlos a la metodología automatizada una vez concluido el curso. El motivo por el cual no se modificaran las metodologías de las prácticas es precisamente a que la mayoría de las técnicas automatizadas se basan en los fundamentos manuales.

Objetivos:

- Actualizar y reestructurar el manual de prácticas existente para el laboratorio de Análisis Bioquímico Clínico I y nombrarse como Manual de Prácticas para el Laboratorio de Hematología.
- Proporcionar la información más reciente de las pruebas del laboratorio de Hematología más comunes en el mercado.
- Proporcionar al alumno la teoría suficiente para comprender las pruebas descritas en este manual y así relacionarla con la clínica.

- Ofrecer al alumno un compendio de información resumida de diversas fuentes recientes para que relacionen la teoría con la práctica y adquieran mejor preparación para su desempeño en el campo laboral.

Diseño de investigación:

El primer paso en este proyecto por tratarse de un trabajo de actualización será recabar la información bibliográfica mediante la búsqueda de la misma en libros de Hematología, Inmunología, Genética y de toda aquella ciencia que se relacione directa o indirectamente con la Hematología; también se buscarán artículos y publicaciones con avances en la investigación de la Hematología, así como la información que publiquen en sitios médicos oficiales de la red. La búsqueda de la información en libros de texto se realizará principalmente en acervos culturales de la UNAM, para que los alumnos puedan tener acceso a estos textos para complementar la información del manual.

Una vez reunida la información, se realizarán resúmenes y ensayos por práctica para actualizar la información contenida en cada tema y se añadirá la metodología del manual vigente con ligeras modificaciones. La estructuración del manual seguirá siendo básicamente la misma, pero las prácticas se dividirán en 6 Módulos, conformados de la siguiente manera:

1. Módulo I: 2 prácticas
 - i. Anticoagulantes
 - ii. Toma de muestra
2. Módulo II: 7 prácticas
 - i. Hematocrito
 - ii. Velocidad de sedimentación globular (VSG)
 - iii. Hemoglobina
 - iv. Recuento de eritrocitos
 - v. Índices eritrocitarios
 - vi. Cuenta total de leucocitos
 - vii. Recuento plaquetario
3. Módulo III: 2 prácticas y 2 seminarios
 - i. Hematopoyesis
 - ii. Línea eritroide
 - iii. Líneas granulomonocítica, megacariocítica. Línea linfoide
4. Módulo IV: 7 prácticas
 - i. Frotis de sangre periférica y cuenta diferencial
 - ii. Cuenta de reticulocitos
 - iii. Biometría hemática o citometría hemática
 - iv. Los autoanalizadores.
 - v. Fragilidad osmótica
 - vi. Hemoglobinopatías
 - vii. Inducción de drepanocitos
5. Módulo V: 5 prácticas y un seminario
 - i. Fisiología general de la hemostasia
 - ii. Tiempo de sangrado
 - iii. Tiempo de coagulación de sangre total
 - iv. Retracción del coágulo

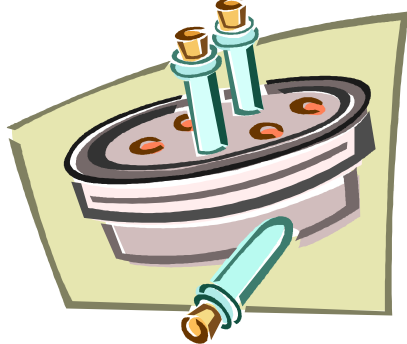
- v. Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)
- vi. Tiempo de protrombina (TP)
- 6. Módulo VI: 5 prácticas
 - i. Sistema ABO
 - ii. Sistema Rh
 - iii. Expresiones débiles del antígeno D (D parcial o débil). La prueba de antiglobulina humana (Coombs)
 - iv. Anticuerpos irregulares
 - v. Banco de sangre y las pruebas cruzadas

El manual estará integrado entonces de 30 temas y 28 prácticas en el mismo orden que se presentan en el manual vigente; eliminando la práctica del tiempo de coagulación del plasma recalcificado porque es una prueba obsoleta hoy en día.

Cada módulo se realizará y se revisará en el orden que se presenta en el cronograma.

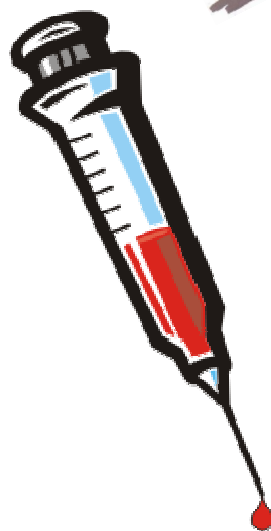
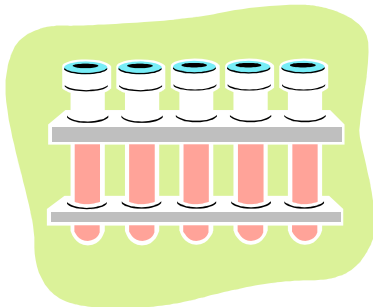
Cronograma:

Actividad	Mes					
	Agosto / 09	Septiembre / 09	Octubre / 09	Noviembre / 09	Diciembre / 09	Enero / 10
Recopilación de información						
Diseño de anteproyecto						
Actualización módulo I y II						
Actualización módulo III y IV						
Actualización módulos V y VI						



MÓDULO I

Procedimientos
básicos en el
laboratorio de
Hematología



ANTICOAGULANTES

La sangre es una suspensión de eritrocitos, leucocitos y plaquetas en un líquido de compleja composición, llamado, plasma. Al impedirse el mecanismo de coagulación sanguínea pueden separarse los elementos formes de este líquido, el cual tiene un color paja claro. Cuando la sangre se coagula se obtiene otro líquido al separar el coágulo formado, a este líquido se le llama suero, el cual es de composición diferente al plasma. La diferencia entre estos dos líquidos obtenidos de la sangre radica en su composición pues, al inhibir la coagulación de la sangre se conserva el fibrinógeno en el plasma, mientras que el suero carece del mismo por su transformación a filamentos insolubles de fibrina por la activación de proteínas coagulantes durante la hemostasia.

Debido a que la sangre fuera del sistema vascular coagula entre 3 y 7 minutos es necesario el uso de sustancias, tales como los anticoagulantes, que permitan que los elementos formes de la sangre permanezcan en suspensión para su estudio. Los anticoagulantes se utilizan para obtener plasma o muestras de sangre total y así poder realizar los recuentos celulares y estudiar las características morfológicas de las células. Así mismo deben procurar que las células sanguíneas a estudiar se encuentren en el estado más parecido al fisiológico, como cuando se encuentran circulando por el torrente sanguíneo. Para ello los anticoagulantes no deben alterar la morfología de los leucocitos, el tamaño eritrocitario, no producir hemólisis e impedir la agregación plaquetaria, posibilitando al mismo tiempo el máximo período de conservación de la muestra (cerca de 24 horas a 25°C o incluso 48 horas refrigerada a 4° C).

Los anticoagulantes como aditivos para la sangre más ampliamente utilizados son:

EDTA (C₁₀H₁₆N₂O₈)

Sal disódica, dipotásica o tripotásica del ácido etilendiaminotetraacético, actuando mediante un efecto quelante sobre el calcio (Ca⁺⁺), impidiendo el proceso de la coagulación al fijarlo. Este anticoagulante se utiliza fundamentalmente para la realización de recuentos celulares, sobre todo en los autoanalizadores y permite además la realización del hematócrito y del frotis sanguíneo hasta dos horas después de la extracción de la muestra. Las sales de potasio tienen la ventaja con respecto a la de sodio, por ser más fácilmente solubles en sangre cuando las usamos a partir del producto sólido, sin embargo, las tres sales afectan el tamaño del eritrocito, especialmente después del almacenamiento de la sangre anticoagulada por espacio de algunas horas. El International Council for Standardization in Hematology (ICSH) recomienda la sal dipotásica como anticoagulante para recolectar muestras sanguíneas destinadas al recuento y caracterización del tamaño celular y especialmente cuando los valores del hematócrito se requieren para la calibración de los contadores automáticos. El K₂EDTA·2H₂O posee un peso molecular relativo de 404,1g; 1g quela 100 mg de calcio iónico y el pH para una solución al 1% es de 4,8 +/- 1,0. La cantidad de EDTA dihidratado agregada a la sangre debe ser de 1,5-2,2 mg/mL de sangre total. Esta cantidad es un compromiso entre la cantidad requerida para evitar la coagulación y la cantidad a la cual se producen las alteraciones celulares.

Heparina

Es un anticoagulante fisiológico que actúa impidiendo que la protrombina se transforme en trombina. Estructuralmente es un mucopolisacárido ácido. Los frotis realizados con muestras sanguíneas anticoaguladas con heparina producen un color azulado en el fondo del frotis y una pseudovaculización celular por lo tanto no se recomienda para tal fin. La proporción adecuada es de 15-20 UI (0,1-0,2 mg) de heparina por mL de sangre.

Citrato trisódico ($C_6H_5O_7Na_3$)

Actúa impidiendo que el calcio se ionice, evitando así la coagulación. Se utiliza para realizar las pruebas de Hemostasia en una proporción sangre: anticoagulante 9:1; así como para la velocidad de sedimentación (VSG) en una proporción sangre: anticoagulante 4:1. El citrato sódico se utiliza a una concentración de 0,105 M (3,2%) ó 0,129 M (3,8%).

Oxalato sódico ($Na_2C_2O_4$)

Actúa mediante la precipitación del calcio como oxalato de calcio (CaC_2O_4), además de que tiene propiedad para conservar la glucosa. Recomendado en las pruebas de coagulación y su proporción es de 2 volúmenes de solución de oxalato sódico 0,1M en 4 volúmenes de sangre.

Oxalato de amonio y potasio [$(NH_4)_2C_2O_4:K_2C_2O_4$]

Conocido también como mezcla de Wintrobe, fue empleado durante mucho tiempo para la realización de la biometría hemática, sin embargo dejó de emplearse al observar que altera sensiblemente la morfología del eritrocito alterando por tanto el volumen corpuscular medio (VCM). Actúa por precipitación del calcio. Se emplea en forma de polvo, constituido por 3 partes de oxalato de amonio y 2 partes de oxalato de potasio. La proporción recomendada es de 2 mg de mezcla por mL de sangre.

Soluciones anticoagulantes conservadoras

Los factores más importantes que influyen sobre la recuperación eritrocitaria en la sangre conservada es la solución anticoagulante conservadora utilizada. Todas las soluciones que se utilizan hoy en día son anticoagulantes y conservadoras, pero se habla más de su función anticoagulante y se olvida la no menos importante de conservación. Las distintas modificaciones que tienen lugar en la sangre durante el período de almacenaje denominadas lesiones de conservación están en relación tanto con el período de tiempo como con la naturaleza de la solución anticoagulante.

Las soluciones anticoagulantes conservadoras tienen grandes cantidades de glucosa como material energético, y de citratos de sodio que previene la coagulación de la sangre. En la actualidad existen tres soluciones de este tipo, conocidas como:

- Solución Ácido-Citrato-Dextrosa (ACD)
- Solución Citrato-Fosfato-Dextrosa (CPD)
- Solución Citrato-Fosfato-Dextrosa-Adenina (CPDA-1)

La solución ACD se emplea fundamentalmente en Bancos de Sangre para conservar las unidades de sangre y estudios metabólicos eritrocitarios por permitir una buena conservación de los hematíes. Se utiliza en una proporción de un volumen de ACD por cada cuatro volúmenes de sangre. La proporción de la mezcla del anticoagulante es de: Acido Cítrico 0,9 g, Citrato disódico 2 g, Dextrosa 2 g, H₂O destilada 120 mL. Permite conservar los hematíes durante 21 días entre 2-6°C.

La solución CPD desarrollada por Gibson, tiene la ventaja sobre la ACD, de condicionar un pH de 7,1 en la sangre colectada inmediatamente después de la extracción, facilitando la continuación del metabolismo glicolítico celular durante el período de almacenamiento; por otro lado el ión fosfato ayuda a la preservación de los esteres de fosfato dentro del eritrocito, por lo que permite mantener la estabilidad de la membrana (ATP), el transporte de oxígeno y su liberación en los tejidos (2,3-DPG).

La solución CPDA-1 es la fórmula mejorada de CPD, ya que contiene 25% más de glucosa y de 17,3 mg de adenina, lo cual permite la conservación de la sangre 35 días. La adición de Adenina se derivó de experiencias previas en las cuales se había demostrado que esta sustancia podía ser tomada por eritrocito e incorporada en la reserva de nucleótidos celulares, utilizándola para mantener la concentración de ATP en el eritrocito.

La solución de CPD-Adenina ha sido recientemente mejorada al aumentar la concentración de dextrosa y Adenina. Esta nueva versión ha sido identificada como CPDA-2 y los ensayos clínicos muestran que la sangre completa puede conservarse por 49 días con una sobrevida media eritrocítica de 73,6%, en cambio, los eritrocitos concentrados duran 42 días pero su sobrevida es de $77,9 \pm 8,1\%$. No tiene efectos adversos sobre las plaquetas ni sobre los factores plasmáticos. Esta solución es claramente superior al CPDA-1 para la conservación de los eritrocitos concentrados. Su aprobación para ser usada en los bancos de sangre está en consideración.

En la Tabla 1 se muestran los anticoagulantes más comúnmente empleados en hematología, haciendo referencia a su concentración, proporción, pruebas indicadas y contraindicadas, ventajas y desventajas de los mismos.

Tabla No. 1 Anticoagulantes como aditivos comúnmente empleados en Hematología

Anticoagulante	Concentración	Proporción	Pruebas indicadas	Pruebas no indicadas	Ventajas	Desventajas
EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈) K ₂ EDTA·2H ₂ O K ₃ EDTA	10%	0.1mL/5mL de sangre 1.5-2.2mg/mL de sangre	-BH -Frotis sanguíneo y de médula ósea		-Muy soluble en la sangre. -No destruye las células. -Poco tóxico -Impide la agregación de plaquetas (en algunos casos no) -No diluye la muestra por emplearse en forma de polvo.	-En muestras con más de 2 horas de haberse tomado, pueden llegar a presentarse diversos cambios en la morfología de los leucocitos y eritrocitos.
Heparina		0.1-0.2mg/mL de sangre 15-20 UI	-Fragilidad osmótica -Degranulación de basófilos -Reducción de NBT	-Leucocitos -Frotis -Fosfatos inorgánicos	-Reduce la hemólisis y la agregación plaquetaria	-Es caro -No recomendable para banco de sangre
Citrato de sodio (C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃)	3.8% (0.129 M) 3.2% (0.105 M)	1 parte:4 partes de sangre 1 parte:9 partes de sangre	-VSG -Pruebas de coagulación -Plaquetas	-BH	-Permite realizar las pruebas de coagulación, por conservar mejor las proteínas coagulantes, debido a su acción anticoagulante.	-Diluye la muestra y no puede emplearse para la BH.
Oxalato de sodio	0.1 M	0.1 M/mL de sangre	-Pruebas de coagulación -VSG	-Nitrógeno en sangre	-Soluble.	-Altera la permeabilidad del eritrocito, ligera hemólisis.
Oxalato de amonio y potasio [(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ ·K ₂ C ₂ O ₄]	3 partes de oxalato de amonio/2 partes de potasio	2mg/mL de sangre	-Fórmula roja -Leucocitos -Pruebas bioquímicas	-Frotis -Nitrógeno en sangre -Determinación de potasio	-Económico. -Fácil de preparar. -No diluye la muestra.	-No se puede emplear en las transfusiones. -Altera la morfología del eritrocito. -Altera el VCM.

TOMA DE MUESTRA

Hace mucho tiempo los griegos establecieron la teoría humoral en la cual la bilis negra y verde, flemas y sangre, eran considerados como los cuatro “humores” del cuerpo humano. Esta teoría fue responsable de la práctica del sangrado (flebotomía). El objeto de invadir una vena con una aguja fijada a una jeringa o a un tubo recolector cerrado al vacío, es obtener un espécimen de sangre para realizar análisis múltiples de sus constituyentes en el laboratorio clínico. La recolección de sangre incluye especímenes: venoso, arterial y cutáneo o “capilar”.

La Asociación Nacional de Flebotomía ha ayudado a promover los conocimientos cada vez más necesarios para que se dé la debida importancia a la recolección de sangre. Además el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) antes NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory), ha escrito varias recomendaciones orientadas a la corrección de métodos para la recolección de especímenes de sangre y al igual ha publicado normas para la recolección de tubos al vacío y para el manejo de transferencia de los especímenes.

Paciente

Muchas pruebas no requieren el ayuno, pero es preferible que los pacientes no tomen alimento por lo menos 4-6 horas antes de la punción venosa. Esto reducirá la posibilidad de lipemia quilomicrocónica, la cual puede interferir en muchos métodos por no estar el suero apropiadamente límpido. Un problema mayor que las interferencias por falta de ayuno es la interferencia por medicamentos; cuando sea posible, deben suspenderse medicamentos con capacidad de interferencia conocida por lo menos 48 horas antes de la recolección de sangre. El consumo de caféina, el alcohol y el uso de tabaco son muy comunes. Eliminando estímulos indeseables es la forma más segura para prevenir la interferencia fisiológica. Por ejemplo, “*Bombear con la mano o apretar los puños durante el proceso de la recolección*”, genera resultados anormales de potasio.

Los pacientes se clasifican en internados y externos o ambulatorios. Se sabe perfectamente que la postura del paciente puede afectar los resultados de algunas pruebas. Un individuo puede tener diferentes resultados para ciertas pruebas, dependiendo si está acostado, sentado o de pie en el momento de la extracción. La *estasis* por el torniquete causa un efecto de hemoconcentración similar al que causa la postura. El torniquete utilizado para una punción venosa no deberá aplicarse tan apretado que el pulso de la arteria radial se pierda y debe permanecer un minuto como máximo. El objeto del torniquete es aumentar el llenado de las venas para que éstas se hagan más prominentes. Bokelund et.al. han establecido que el torniquete contribuye ampliamente a la variabilidad de los resultados.

Un flebotomista debe mantener buena salud e higiene personal, con su ropa, cabello y uñas.

Algunos factores fisiológicos específicos del paciente pueden afectar los resultados de las pruebas de laboratorio, algunos de ellos pueden ser:

- Postura: Un cambio de posición supina (boca arriba) a sentado o acostado genera un paso de agua de los vasos sanguíneos a los espacios intersticiales provocando que la sangre se concentre.

- Ritmo circadiano: El hecho de tomar una muestra durante el día o por la noche provoca un cambio en los resultados.
- Ejercicio: Incrementa el metabolismo de algunos analitos y por lo tanto puede generar resultados erróneos.
- Estrés.
- Dieta: ayuno prolongado o muy corto.
- Habito de fumar: Dificulta las punciones cutáneas por las alteraciones circulatorias que genera.

Zonas de recolección

Especímenes venosos

Las venas superficiales de la cara anterior del antebrazo son las más comunes para la venopunción, las tres venas principales para la recolección son (Figura 1):

1. Vena cefálica, ubicada en la parte superior del antebrazo y en dirección del pulgar de la mano.
2. Vena basílica, ubicada en la parte inferior del antebrazo y en dirección contraria al pulgar.
3. Vena cubital mediana, ubicada en la parte anterior del codo y conecta las venas cefálica y basílica; a esta zona se le llama fosa antecubital. Esta vena es la de elección para los especímenes venosos.

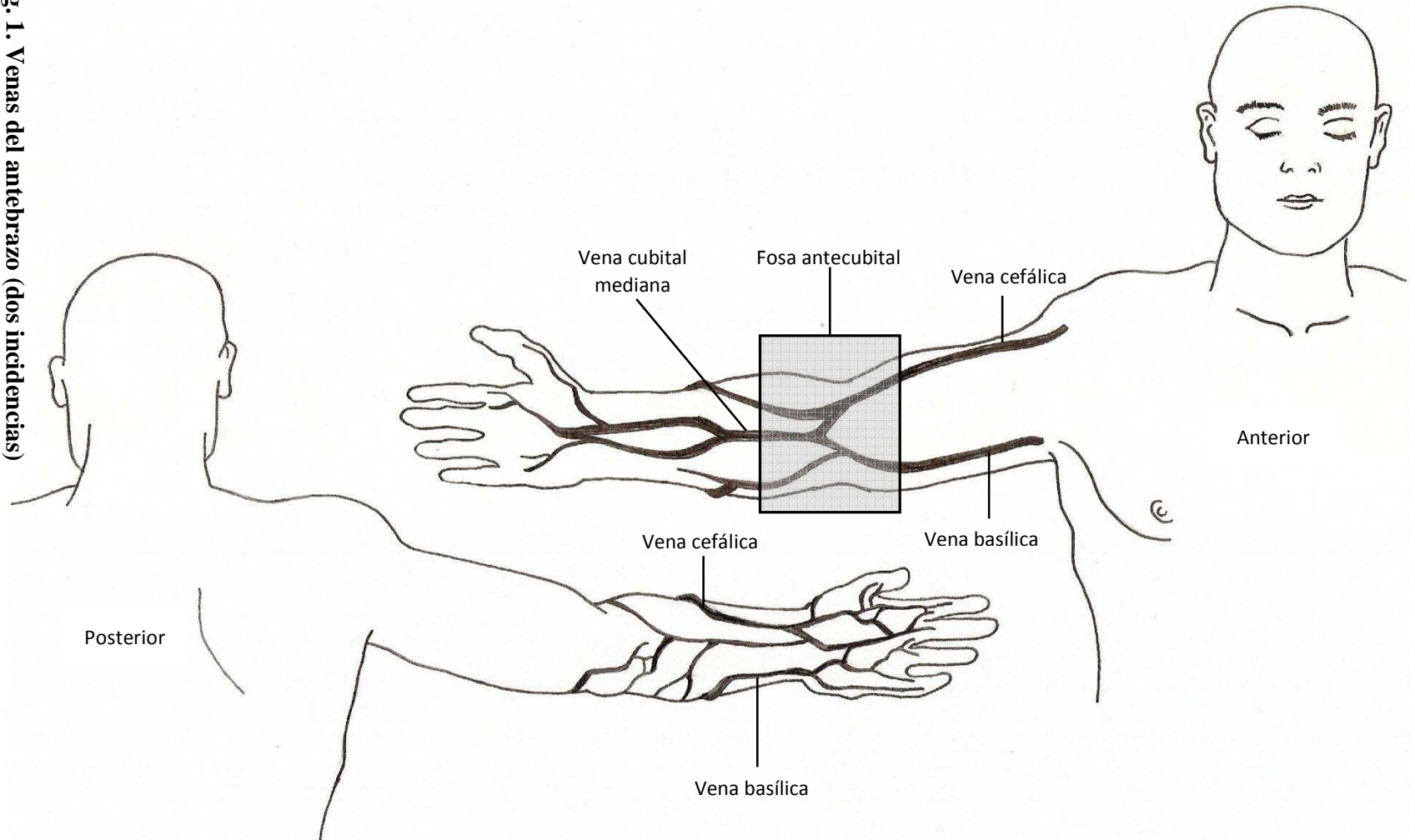
Especímenes capilares o cutáneos

Debido a que este tipo de sangre difiere ligeramente en la composición de la sangre venosa, su obtención queda restringida a casos especiales, tales como, pacientes pediátricos, personas obesas a las cuales no se les pueda localizar una vena y en pacientes quemados o con quimioterapia. También este tipo de sangre es empleada para algunos tipos de estudios, por ejemplo, tiempo total de coagulación y tiempo de sangrado.

Existen tres zonas para poder obtener estos especímenes sanguíneos (Figura 2):

1. Yema de los dedos
2. Lóbulo de la oreja
3. Talón (solo neonatos)

Fig. 1. Venas del antebrazo (dos incidencias)





Las líneas punteadas indican la zona adecuada para la punción en la planta del pie

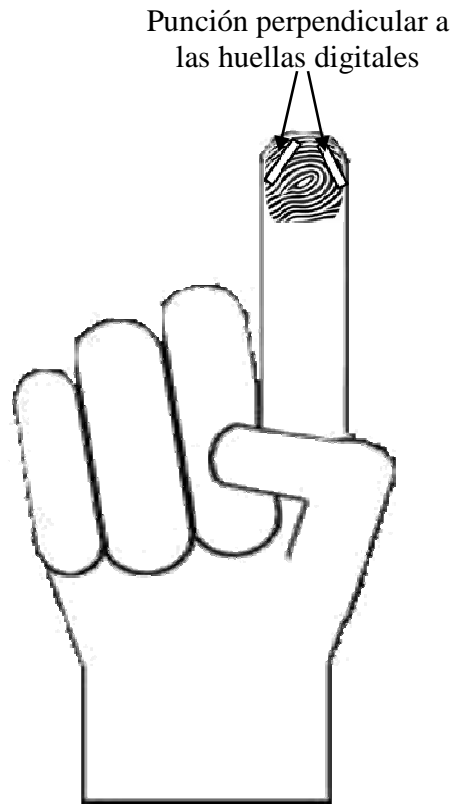


Fig. No. 2. Sitios de punción cutánea (sangre capilar).

Especímenes arteriales

Este tipo de sangre rara vez se emplea para estudios de rutina, pero esto no la descarta de emplearse para cualquier tipo de estudio, sin embargo su principal empleo es para la determinación de gases sanguíneos. Debido al riesgo que conlleva la obtención de tales especímenes, estos únicamente deberán ser obtenidos por un médico, un químico o una enfermera con entrenamiento especial.

Los sitios habituales para obtener sangre arterial son (Figura 3):

1. Arteria radial
2. Arteria braquial o humeral
3. Arteria femoral

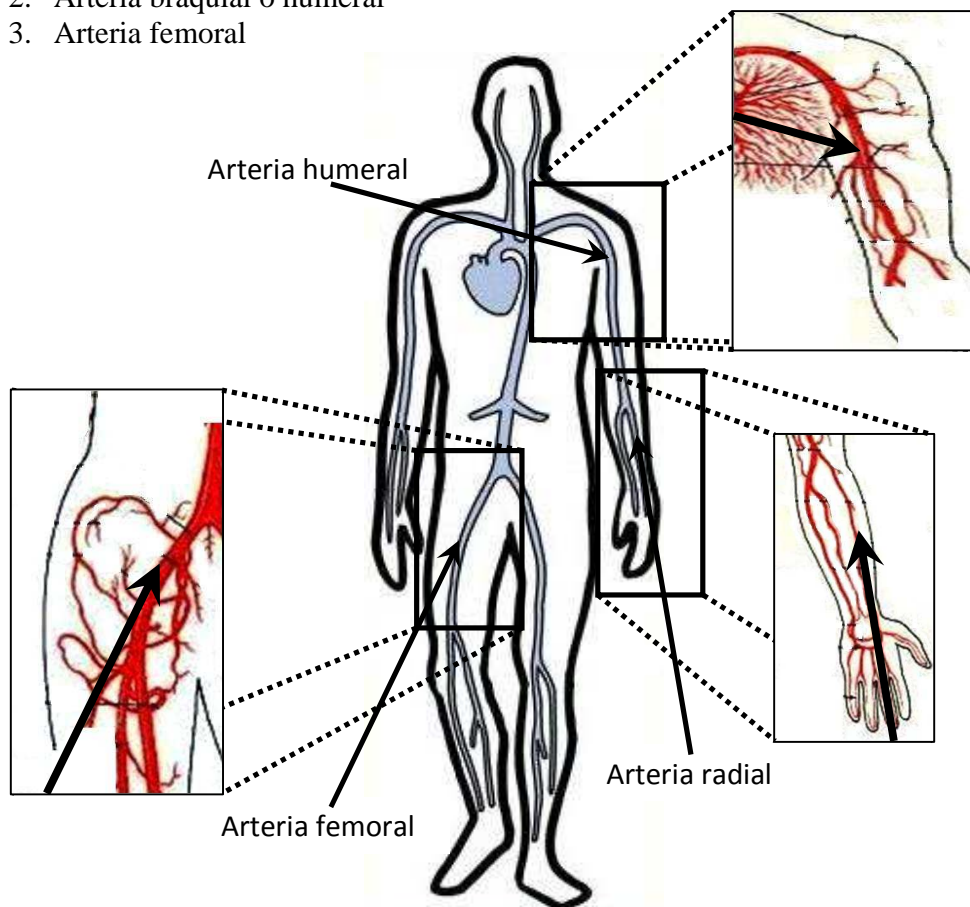


Fig. No. 3. Principales sitios de punción arterial

Instrumentos para recolección

Torniquete

Se emplea como barrera contra el flujo de sangre venosa, con el objetivo de visualizar una vena con mayor facilidad. Puede ser una tira o manguera de látex, una correa de velcro o bandas ajustables. En la actualidad existen una gran variedad de formas para los torniquetes, las cuales dan una mejor presentación, pero sobre todo mayor comodidad tanto para el paciente como para el flebotomista.

Solución para la asepsia de la piel

La solución aséptica más común es el alcohol isopropílico al 70%. Debe aplicarse con torundas empapadas de esta solución. Pueden emplearse también soluciones de etanol al 70% (ya no es recomendable), cloruro de benzalconio (cloruro de zefirán) o soluciones antisépticas comerciales.

Jeringas

Son sistemas integrados por un cilindro graduado en mililitros, un embolo y una aguja con punta en un solo extremo y una base para montarse en el cilindro de la jeringa (Figura 4). Las agujas para jeringa son de toma única. Deben emplearse en la extracción de sangre en pacientes pediátricos, geriátricos o en caso de pacientes con venas frágiles o diminutas que no puedan resistir la presión negativa del sistema al vacío.

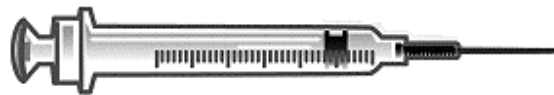


Fig. No. 4. Esquema de una jeringa

Sistema al vacío (Figura 5)

1. **Agujas:** Son estériles y presentan varias longitudes y anchos (calibre o apertura). Diseñadas para encajar en el sistema de sujeción del tubo al vacío mediante una rosca. Son consideradas de toma múltiple por el capuchón de goma en el extremo posterior al bisel para impedir la salida de sangre. Calibre para adultos: 21, longitud de 1 pulgada (2.4 cm). Ejemplos de agujas, son la aguja Eclipse Blood Collection Needle (BD) y el dispositivo Vacu-Pro Venipuncture Needle Protection Device (Concord Portex).
2. **Dispositivo de sostén:** Son bases plásticas diseñadas para sujetar las agujas, son desechables y de uso único, pero pueden limpiarse sumergiéndolas en solución de lavandina al 10%. Ejemplos: sostén BD Pronto Quick Release Needle Holder, dispositivo Safety-Lok Needle Holder (BD) y Saf-T Clic (Winfield Medical).
3. **Tubos al vacío:** Son de plástico o vidrio, contienen una cantidad preestablecida de un aditivo sellado al vacío. El vacío corresponde al volumen indicado en la etiqueta. Por lo general están recubiertos con silicona para disminuir las posibilidades de hemólisis. Estos tubos se manejan por código de colores en el tapón, el cual depende del aditivo que contiene en su interior, en la Tabla 2 se muestra el color del tapón y el aditivo que contienen los tubos más empleados en Hematología.



Fig. No. 5. Elementos empleados en los sistemas al vacío.

Tabla No. 2 Código de colores para tubos al vacío

Color del tapón Vacutainer	Aditivo	No. de inversiones
Rojo con negro Dorado (Hemogard)	Gel separador y activador de la coagulación	5
Verde con negro Verde claro (Hemogard)	Gel separador y heparina de litio	8
Rojo	Activador del coágulo	0
Amarillo con negro Anaranjado (Hemogard)	Trombina	8
Azul militar (Hemogard)	Heparina sódica Na ₂ EDTA Ninguno	8 8 0
Verde	Heparina sódica Heparina de litio	8
Gris	Oxalato de potasio y fluoruro de sodio Fluoruro de sodio Fluoruro de sodio/K ₂ EDTA	8 8 8
Tostado (Hemogard)	Heparina sódica (vidrio) K ₂ EDTA	8
Amarillo	Polianetolsulfonato de sodio (SPS) Ácido citrato dextrosa (ACD)	8 8
Lavanda o lila	K ₂ EDTA líquido (vidrio) K ₂ EDTA desecado (plástico)	8 8
Rosa (Hemogard)	K ₂ EDTA desecado	8
Celeste	Citrato de sodio 0.105 M =3.2% Citrato de sodio 0.129 M =3.8%	3-4

Equipos de infusión alados (mariposas = butterflies)

Dispositivos intravenosos que presentan una aguja corta y una sonda delgada con alas plásticas adheribles (Figura 6). Pueden conectarse a los dispositivos de sostén Vacutainer, jeringas o frascos para hemocultivo con adaptadores especiales. Son empleados en la toma de muestra de niños o pacientes internados difíciles de extraerles sangre.

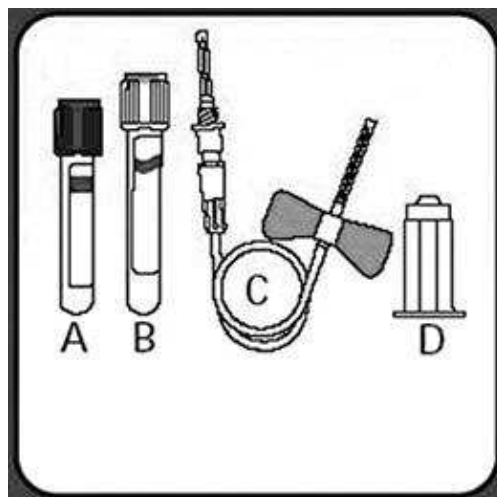


Fig. No. 6. Elementos empleados en los equipos alados. A y B: Tubos al vacío; C: Sistema alado; D: Dispositivo de sostén.

Tubos Microtainer

Los tubos Microtainer (Figura 7) están destinados a la extracción, transporte y procesamiento de muestras de sangre capilar en neonatos, niños, pacientes geriátricos y pacientes en estado crítico. Las líneas de nivel de volumen impresas en los tubos, aseguran una relación sangre/anticoagulante apropiada; la línea inferior (200 μ L) indica la cantidad mínima de sangre que puede recolectarse y la línea superior (800 μ L) la cantidad máxima de sangre que puede contener.



Fig. No. 7. Tubo Microtainer.

Actualmente se recomienda evitar el uso de la jeringa debido al elevado riesgo de exposición que supone el proceso de transferencia de la sangre desde la jeringa hasta el tubo colector. En su lugar se recomienda el uso de los sistemas al vacío, sin embargo el instrumento de recolección que se deba emplear en cada toma dependerá de la situación de la misma. El CLSI ha estandarizado el procedimiento de la punción venosa, por lo cual cuando se trate de una toma múltiple debe seguirse un orden:

A. Método de tubos al vacío²:

² Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Approved Standard-Fifth Edition. **NCCLS Approved Standard Document H3-A5**, Vol. 23 No. 32, p. 17. 2003.

- a. Tubos estériles para hemocultivo
 - b. Tubo tapón rojo (sin aditivo)
 - c. Tubo tapón celeste (citrate de sodio)
 - d. Tubo tapón rojo con negro (gel separador y activador de la coagulación)
 - e. Tubo tapón verde o verde con negro (heparina)
 - f. Tubo tapón lavanda o lila (EDTA)
 - g. Tubo tapón gris (oxalato de potasio y fluoruro de sodio)
 - h. Tubo tapón amarillo (ACD)
- B. Método de jeringa²:
- a. Tubos estériles para hemocultivo
 - b. Tubo tapón celeste
 - c. Tubo tapón verde
 - d. Tubo tapón lavanda o lila
 - e. Tubo tapón gris
 - f. Tubo tapón amarillo
 - g. Tubo tapón rojo

En el caso de que sólo se requiera muestra para pruebas de coagulación por el método de tubos al vacío, primero debe obtenerse sangre en un tubo de tapón rojo para evitar contaminación con tromboplastina tisular. En el caso de sistemas alados debe obtenerse primero un tubo de tapón rojo para asegurarse de llenar toda la cánula de extracción del sistema.

Fundamento

Los resultados de un examen de laboratorio como toda prueba analítica consisten de tres etapas; preanalítica, analítica y postanalítica, por lo tanto la etapa preanalítica es la de mayor importancia pues de la calidad del espécimen sanguíneo dependerá el resultado final del examen realizado. Para que el resultado de un examen sea idealmente significativo, el espécimen de sangre debe reflejar el estado fisiológico del paciente en el momento de la recolección. La exactitud y precisión de los datos de un laboratorio, dependen fundamentalmente de la calidad del espécimen.

Material

- Torniquete (Ligadura)
- Hisopos o torundas de algodón humedecidas en isopropanol al 70%
- Jeringas de plástico estériles (5 mL) o tubos al vacío
- Agujas (calibre 22)
- Agujas para toma múltiple (Vacutainer®)
- Soporte para el sistema Vacutainer®
- Recipiente de plástico que contenga cloro al 0,5% como desactivador

Reactivos

- Isopropanol al 70%
- Cloro al 0,5%

Procedimiento

1. Preparar la orden de ingreso.
2. Identificar al paciente mediante la confirmación de su nombre.
3. Verificar el protocolo de trabajo y selección de los tubos.
4. Etiquetar los tubos con la identificación correspondiente del paciente.
5. Posicionar al paciente para que esté cómodamente sentado o recostado.
6. Seleccionar el sitio adecuado para la venopunción.
7. Limpiar la zona con una torunda humedecida en isopropanol al 70%, de manera circular de adentro hacia afuera o verticalmente en un solo sentido y asegurándose de girar la torunda.
8. Aplicar un torniquete en la parte superior del brazo con la ligadura de goma 5 cm arriba de la zona de punción. Que no exceda de un minuto entre la aplicación del torniquete y la punción.
9. Después de haber limpiado y antes de realizar la punción, permítase secar el lugar elegido. Esta precaución previene la hemólisis y reduce el dolor por la punción.
10. Realizar la punción fijando la vena con el pulgar 2,5 a 5 cm por debajo de la zona e insertar la aguja, con el bisel hacia arriba, con un ángulo entre 15-30° entre la aguja y la piel
11. Se insertan los tubos al vacío en el orden correcto de extracción. Si el tubo contiene anticoagulante, mezclarlo perfectamente bien con la sangre hasta su total homogenización. En el caso de emplear jeringa se retira un poco el émbolo de la jeringa, para que la sangre comience a fluir.

12. Se retira el torniquete una vez extraída la cantidad de sangre requerida.
13. Colocar la torunda sobre la zona de punción, sin presionar y se retira la aguja o la jeringa. Presionar ligeramente sobre la zona una vez retirada la aguja hasta que deje de fluir sangre.
14. En el caso de extracción con jeringa se vierte la sangre en los tubos en el orden correcto. Vaciar la sangre por las paredes del tubo de 13 x 100 mm que contenga o no anticoagulante, según se requiera.
- 15. El material punzocortante generado durante la extracción de sangre, debe colocarse en recipientes de colecta apropiados para jeringas, agujas etc., en caso de que por el momento no se cuente con estos contenedores, colocar las jeringas y agujas separadamente en un recipiente de plástico que contenga solución de cloro al 0.5% durante una hora.**
- 16. Para el lavado final de tubos con sangre y material que haya tenido contacto con el tejido sanguíneo, también debe colocarse en los recipientes desactivadores de Cloro al 0.5% por lo menos 1 hora antes de ser lavados. El empleo de guantes de látex es obligatorio para el lavado de todo este tipo de material.**

Nota: Estos dos últimos pasos del procedimiento se deben efectuar de manera sistemática en cada una de las prácticas que se realizaran en este módulo de Hematología y que *siempre* deberán de seguir aquí y en el futuro de sus procedimientos de Laboratorio Clínico.

NO SE VOLVERÁN A INDICAR AL FINAL DE CADA PROCEDIMIENTO.

Precauciones

Toda muestra de sangre y cualquier otro tipo de muestra biológica debe manipularse con extremo cuidado para evitar la contaminación del analista y del área de trabajo. Por lo cual se deben emplear guantes durante todo el proceso y algún otro tipo de protección, como, goggles o gabinetes de seguridad cuando el proceso lo requiera; así como seguir en todo momento las reglas de seguridad del laboratorio.

Actividades

Adquirir los conocimientos para la adecuada recolección de sangre y las aplicaciones de los procedimientos de *seguridad* que se deben aplicar en el Laboratorio.

MÓDULO II

Fórmula roja



HEMATÓCRITO

La determinación del hematócrito se realiza para medir el volumen que ocupan los eritrocitos en muestras de sangre capilar o venosa. Se mide por medio de centrifugación y se expresa como fracción decimal. Se consideran sinónimos las siguientes expresiones: volumen de paquete globular (VPG), fracción del volumen de los eritrocitos y valor del hematócrito.

La determinación del hematócrito es un método sencillo y confiable para detectar presencia o ausencia de anemia o policitemia y presencia de paquetes leucocitarios y plaquetarios anormales. En realidad, el hematócrito medido por centrifugación es más confiable para el “monitoreo” de pacientes con policitemia que los calculados con muchos de los contadores automáticos existentes en el mercado.

Para la determinación del hematócrito existen dos métodos a escoger: el Micrométodo y el Macrométodo. Estos métodos han sido seleccionados por su amplio uso y por sus niveles aceptables de exactitud y precisión, empleando equipo relativamente sencillo.

En ambos métodos se centrifuga una columna de sangre, sin embargo, tanto en el Micrométodo, como en el Macrométodo, el plasma permanece atrapado entre los eritrocitos centrifugados e incrementa la longitud aparente de la columna de eritrocitos en 2% en la sangre normal y aún más en ciertas condiciones anormales, principalmente en la deficiencia de hierro, talasemia, esferocitosis y la enfermedad conocida como “sickle cells” (células falciformes o drepanocitos). Esto debe de tomarse en cuenta cuando se requiere un alto grado de exactitud. Existe un método de referencia para corregir el porcentaje de plasma atrapado, pero requiere de mucho tiempo y pericia, por lo que es poco práctico para su uso ocasional en los laboratorios de rutina. Para lo cual el Consejo Internacional para la Estandarización en Hematología (ICSH) desarrolló un método de referencia alternativo, que resulta práctico para la calibración de equipos automatizados.

Fundamento

En el macro y micro métodos se centrifuga una columna de sangre dentro de un tubo uniforme cerrado en uno de los extremos, hasta obtener un paquete de eritrocitos en el fondo del tubo. La centrifugación se prolonga hasta que el paquete celular este tan apretado que al volver a centrifugar en las mismas condiciones se obtenga la misma columna inalterada.

Material e instrumentos

- Sangre venosa con anticoagulante (Macrométodo)
- Sangre capilar o venosa con anticoagulante (Micrométodo)
- Capilares de vidrio especiales de banda roja (Micrométodo)
- Sellador (plastilina)
- Mechero Bunsen
- Microcentrífuga
- Centrífuga clínica
- Tubo de Wintrobe (Macrométodo)
- Pipeta Pasteur con bulbo o jeringa equipada con aguja larga

Procedimiento

Macrométodo

1. Recolectar 5 mL de sangre venosa con anticoagulante.
2. Homogenizar perfectamente bien la sangre con el anticoagulante por inversión del tubo (Figura 8).
3. Llenar el tubo Wintrobe de la parte inferior hacia arriba con sangre empleando una pipeta Pasteur, teniendo cuidado de no formar burbujas. En caso de que se formen burbujas, vaciar el tubo con la misma pipeta y llenarlo nuevamente.
4. Después de retirar la pipeta o la aguja, la columna de sangre debe quedar en la marca de 100 mm.
5. Centrifugar durante 10 minutos a 2000-2300 g (Ver Tabla 3). En la mayoría de los casos no se completa el empaquetamiento en este periodo, por tanto es necesario extender el tiempo de centrifugación hasta 60 minutos.

Tabla No. 3. Revoluciones por minuto requeridas para alcanzar aproximadamente 2000-2300 g a varias distancias del eje

RADIO (cm)	REVOLUCIONES POR MINUTO	
	2000g	2300g
15	3400	3600
20	2900	3100
25	2600	2800

6. Retirar los tubos de la centrifuga. La altura de la columna de eritrocitos es expresada como una fracción de la longitud original de la columna de sangre (100mm=100%), se lee la columna excluyendo la capa de leucocitos y plaquetas.
7. Para la limpieza de los tubos de Wintrobe, deben de vaciarse de la misma manera que fueron llenados y con la misma pipeta Pasteur, cada tubo se limpia forzando el agua hasta el fondo y desplazando la suciedad hacia afuera. Esta operación debe hacerse repetidas veces hasta que el tubo quede limpio.

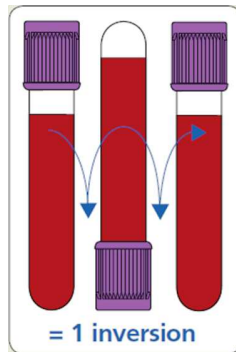


Fig. No. 8. Forma adecuada de mezclar la sangre con el aditivo del tubo.

Micrométodo

1. Mezclar la sangre por inversión del tubo.
2. Los capilares de vidrio se llenan con sangre hasta las dos o tres cuartas partes de su longitud total.
3. Sellar el extremo seco y opuesto al orificio de llenado con plastilina o mediante el calor de una flama (en este caso procurar que no se estreche el cuello del capilar y que esté quede plano en la punta).
4. Colocar los capilares en los rieles de la microcentrífuga y asegurarlos, registrar el número de la posición que ocupan los capilares.
5. Centrifugar de 10000 - 15000g por 5 minutos (en la mayoría de los casos las microcentrífugas ya tienen calibrada esa velocidad durante los 5 minutos que indica la perilla de la centrifuga).
6. Sacar los capilares de la microcentrífuga. Los capilares se miden uno por uno. Si no se van a medir inmediatamente, se colocan de manera vertical hasta que se lean.
7. Las mediciones se hacen con respecto a la longitud de la columna de eritrocitos y pueden hacerse colocando el tubo capilar contra papel milimétrico, o contra una regla. Las capas de plaquetas o leucocitos se excluyen tanto como sea posible.
8. Cuando la prueba se hace por duplicado con fines de control de calidad, los dos resultados no deben diferir más de 2% (0.02 L/L).

Valores de referencia*

A nivel de la ciudad de México los valores de referencia oscilan entre:

* Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología (AMEH)

Hombres: 46-56% (0,46-0,56 L/L)

Mujeres. 39-50% (0,39-0,50 L/L)

Los valores del hematócrito dependen del sexo, de la edad y altura del sitio de residencia. De conformidad con las recomendaciones ICSH/IFCC/WASP para el uso de unidades SI en las mediciones del laboratorio clínico debiera expresarse como una fracción.

Actividades

En la realización de esta práctica, se procederá a efectuar solamente el Micrométodo para el hematócrito.

VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN GLOBULAR (VSG)

La VSG es una prueba sencilla, barata e inespecífica empleada desde hace muchos años para contribuir al diagnóstico de enfermedades inflamatorias, incluyendo infecciones, cáncer y enfermedades autoinmunes. La VSG es un prueba inespecífica porque sus aumentos indican un probable proceso inflamatorio, degenerativo o necrobiótico, pero no el sitio donde se está desarrollando y mucho menos la causa, además de que otras causas diferentes a la inflamación pueden llevar a un aumento de la VSG. Es por ello que esta prueba no se puede emplear aisladamente.

La VSG constituye una medida indirecta del grado de inflamación presente en el organismo. Mide la velocidad de caída (sedimentación) de los eritrocitos en el plasma, por lo cual esta velocidad depende de tres factores principalmente:

1. La composición proteínica del plasma (alteración en la concentración de las proteínas plasmáticas, así como el aumento de fibrinógeno o alteración en la proporción entre las distintas fracciones proteicas).
2. El tamaño, forma y carga de los eritrocitos.
3. La concentración de los eritrocitos.

Los resultados se expresan como milímetros de plasma transparente que quedan en la parte superior de la columna después de que haya transcurrido una hora. Normalmente, los glóbulos rojos van cayendo lentamente, dejando poca cantidad de plasma transparente. El hecho de que exista una concentración elevada de ciertas proteínas (como el fibrinógeno o las inmunoglobulinas) provoca que los eritrocitos caigan más precipitadamente, debido a que se ve afectado el potencial Z (carga negativa) de su membrana por la presencia de las cargas positivas de estas proteínas.

Se ha observado que los eritrocitos sedimentan con más rapidez en la sangre de las mujeres que en la de los hombres y mucho más de prisa después del tercer o cuarto mes de embarazo. La aceleración empieza a las diez o doce semanas y aumenta moderada y progresivamente para normalizarse alrededor de un mes después del parto.

La sedimentación de los eritrocitos se acelera en la tuberculosis y en otras enfermedades infecciosas crónicas tales como: endocarditis bacteriana subaguda, espondilitis anquilosante, lupus eritomatoso diseminado y en proporción a la actividad del padecimiento, también en varias de las llamadas enfermedades del tejido conjuntivo como la fiebre reumática, carditis reumática y la artritis reumatoide. En el cáncer, va a depender de acuerdo con la extensión del proceso maligno. En las inflamaciones agudas localizadas, donde la velocidad parece aumentar en relación con el número de leucocitos, así como también en las disproteinemias, como por ejemplo, el mieloma múltiple. Además el embarazo, la menstruación y el uso de anticonceptivos orales también son causa de aumento de la VSG.

Se han empleado principalmente dos métodos para medir la VSG: el método de Wintrobe y el método de Westergren, siendo este el método recomendado por el CLSI debido a que permite un tiempo de caída libre más largo en comparación con el método de Wintrobe.

En la actualidad existen pipetas de sedimentación para realizar el método de Westergren. Estas pipetas consisten en un tubo calibrado de cristal o material plástico (más recomendable) desechable con medidas de longitud (300 ± 1.5 mm) y calibre ($2,55 \pm 0,15$

mm) bien definidas, montadas sobre un soporte que puede enroscarse al tubo para inmovilizar la pipeta en posición estrictamente vertical.

Existen en el mercado equipos automatizados que permiten obtener resultados en 20 minutos comparables con los obtenidos con el método de Westergren en 1 hora, ejemplo de estos equipos es el sistema Ves-Matic que posee un sensor optoelectrónico que mide el cambio de la opacidad de una columna de sangre a medida que se produce la sedimentación de la sangre. La aceleración de la sedimentación se logra al colocar los tubos en un ángulo de 18° con respecto al eje vertical.

La mayoría de los métodos automatizados diseñados sólo están enfocados a reducir el tiempo de proceso y las manipulaciones intermedias de la muestra al emplear el mismo tubo de extracción como base para introducir la pipeta. Existen algunas microtécnicas, tales como, Crista, Hellige-Vollmer y la Relación Z de sedimentación.

Fundamento

Dado que la sangre es una suspensión de elementos formes en plasma, cuando se deja sangre total anticoagulada en reposo dentro de un tubo perpendicular a temperatura ambiente, los eritrocitos descienden hacia el fondo del tubo debido a su mayor peso sobre los demás componentes de la sangre. La determinación de los milímetros que los eritrocitos sedimentan se realiza durante un periodo de tiempo dependiendo del método empleado. Durante este tiempo se observan tres fases:

1. Periodo inicial de agregación. Durante esta fase se produce el apilamiento y la sedimentación es bastante lenta. Dura unos 10 minutos en un período de observación de 1 hora.
2. Período de sedimentación rápida. Durante este período, la velocidad de sedimentación es constante y dura unos 40 minutos.
3. El período final de concentración. Persiste hasta el final de la hora y luego más tiempo aún.

Material

- Tubos de Wintrobe
- Pipetas Pasteur de punta larga o jeringas equipadas con aguja larga
- Bulbos para pipeta Pasteur
- Soporte para tubos Wintrobe
- Sangre venosa con EDTA

Procedimiento

Método de Wintrobe

1. Recolectar 5 mL de sangre venosa en un tubo con tapón lila, mezclar por inversión (Figura 8).
2. Llenar el tubo de Wintrobe desde el fondo hacia arriba con sangre empleando una pipeta Pasteur de punta larga o una jeringa equipada con aguja larga, teniendo cuidado de no formar burbujas de aire.
3. La sangre debe quedar en la marca superior marcada como 0.
4. Colocar el tubo Wintrobe en posición perfectamente vertical en un soporte para tubos de Wintrobe y cuya posición sea fija. Una vez colocado el tubo en el soporte este no debe ser sometido a movimientos ni vibraciones.
5. Activar un cronómetro o tomar el tiempo inicial.
6. Al finalizar la hora de sedimentación se lee la longitud de la columna de plasma que queda por el desplazamiento de los eritrocitos hacia abajo. La lectura se toma de arriba hacia abajo y cada marca del tubo corresponde a 1mm.

Nota: Procurar que la prueba sea realizada a una temperatura constante, pues variaciones en la misma pueden alterar la VSG.

Interpretación

No se han establecido muchos aspectos de la VSG. Está demostrado que es mayor en las mujeres que en los hombres y que aumenta con la edad. Esto no parece estar relacionado con niveles más bajos de hematíes o, por lo menos en los hombres, tampoco con cambios en las proteínas del plasma. Según la interpretación más común, la VSG acelerada es una respuesta inespecífica a un daño de los tejidos. Esto es tan sólo una indicación de la presencia de la enfermedad y no refleja muy exactamente la gravedad. Su utilidad mayor consiste en demostrar la remisión de un proceso inflamatorio. Hay que servirse de la prueba con sumo cuidado. Es sumamente útil para seguir la evolución de ciertos procesos inflamatorios, por ejemplo, la tuberculosis y la fiebre reumática.

Valores de referencia

Método de Wintrobe

Hombres	0 – 7 mm	4 mm
Mujeres	0 – 15 mm	10 mm
Niños	1 – 15 mm	5 – 10 mm

Actividades

- Realiza la determinación del hematócrito (Macrométodo).
- En caso de que el hematócrito haya resultado por debajo de los valores de referencia, efectuar la *corrección* de la lectura según el Gráfico de Wintrobe – Landsberg (Figura 9).

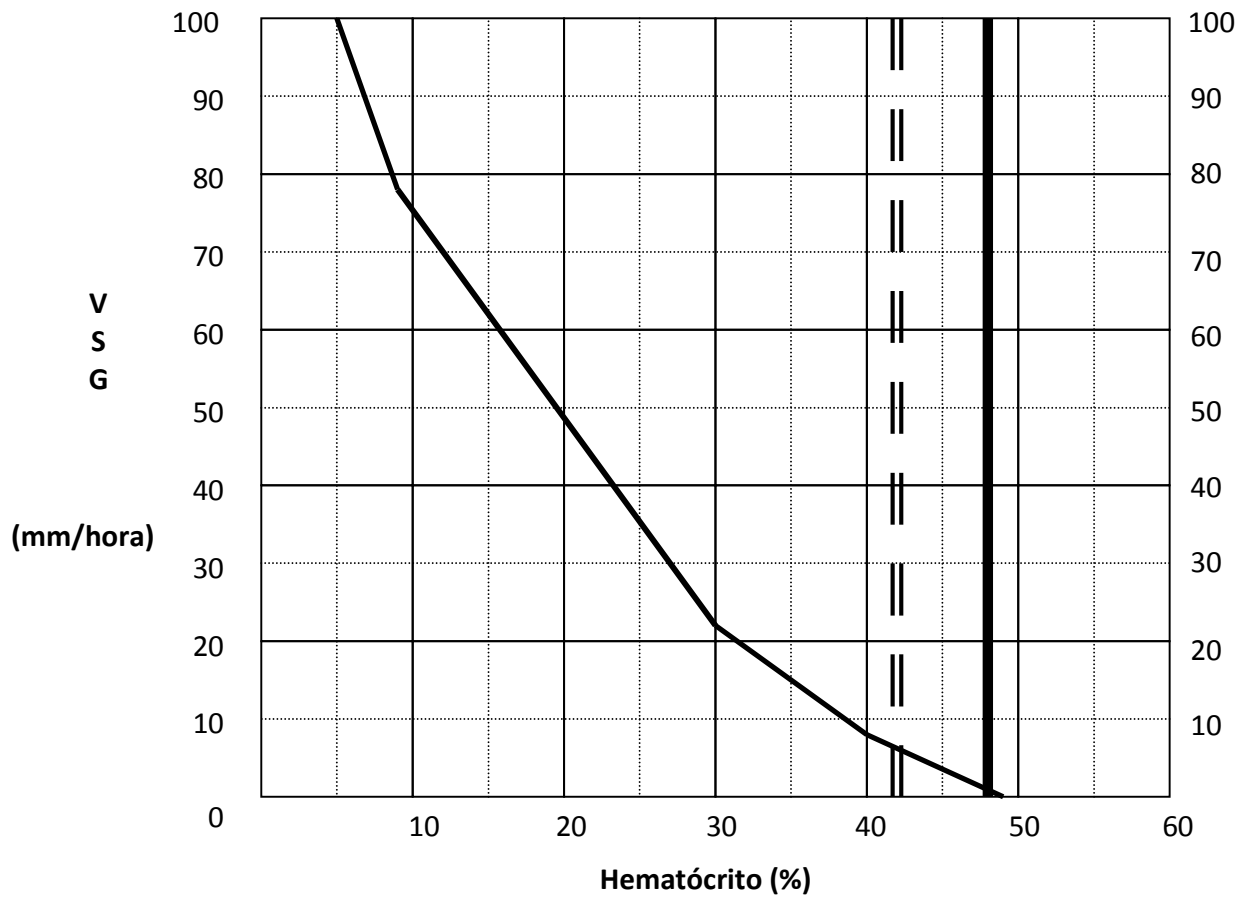


Fig. No. 9. Gráfico de Wintrobe-Landsberg

- == Valores de referencia del hematócrito para mujeres
- █ Valores de referencia del hematócrito para hombres

Se busca la línea horizontal que corresponde a los milímetros de sedimentación en una hora. Se sigue esta línea hasta interceptar la vertical correspondiente al hematócrito, desde ese punto se sigue la línea hacia abajo hasta cruzar la curva remarcada en negro. Este punto de intersección representa la VSG corregida.

HEMOGLOBINA (Hb)

La hemoglobina es la proteína eritrocitaria intracelular encargada del transporte de oxígeno desde los pulmones hacia los tejidos y del transporte del dióxido de carbono desde los tejidos hacia los pulmones. Su propiedad tan extraordinaria de afinidad por el oxígeno se ve reflejada en el hecho de que cada gramo de hemoglobina puede transportar hasta 1,34 mL de oxígeno.

Cada molécula de hemoglobina está compuesta por un anillo tetrapirrólico que surge del metabolismo de las porfirinas y que una vez unido a un átomo de hierro forman el grupo Hem y de dos pares de cadenas polipeptídicas (globinas) de tipo α (α o ζ) o no α (β , γ o δ).

Las globinas de tipo α son cadenas de 141 aminoácidos y los genes que las codifican están localizados en el cromosoma 16. Las globinas no α se forman de 146 aminoácidos y los genes que las codifican se localizan de manera lineal en orden de activación en el cromosoma 11. La combinación por pares de estas globinas da como resultado distintos tipos de hemoglobina:

- | | | |
|--|---|---------------------------|
| 1. $\zeta_2\gamma_2$ Hb Portland | } | Hemoglobinas embrionarias |
| 2. $\zeta_2\varepsilon_2$ Hb Gower I | | |
| 3. $\alpha_2\varepsilon_2$ Hb Gower II | | |
| 4. $\alpha_2\gamma_2$ Hb F | } | Hemoglobinas adultas |
| 5. $\alpha_2\delta_2$ Hb A2 | | |
| 6. $\alpha_2\beta_2$ Hb A | } | Hemoglobinas talasémicas |
| 7. γ_4 Hb de Bart | | |
| 8. β_4 Hb H | | |

Los métodos empleados en hemoglobinometría pueden agruparse en cuatro clases principales según su técnica básica y sus variantes respectivas: a) *colorimétricos*, b) *gasométricos*, c) *densitométricos* y d) *químicos*.

Hay dos métodos de uso habitual:

- El método de cianuro de hemoglobina o cianometahemoglobina (HiCN), y
- El método de la oxihemoglobina (HbO₂)

Método de Cianometahemoglobina

En 1967, el ICSH recomendó emplear el método colorimétrico de la cianometahemoglobina basado en el cálculo de la absorbancia lumínica de una solución de hemoglobina previa transformación en alguno de sus derivados coloreados. Este método, también fue adoptado de manera oficial por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) en la actualidad CLSI, se caracteriza por su elevada fiabilidad debida en gran parte a que el patrón primario de HiCN es una solución muy estable de HiCN cuyas especificaciones han sido reconocidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

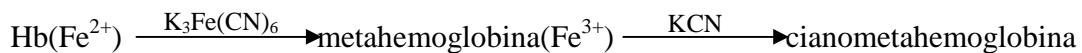
Este método es el resultado de una necesidad sentida, desde hace mucho, de mejorar la estandarización de las alteraciones de hemoglobina: es actualmente el método de elección. Todas las formas de hemoglobina que pueden encontrarse en la sangre (oxihemoglobina, hemoglobina reducida, carboxihemoglobina y metahemoglobina, pero no la sulfametahemoglobina) se convierten íntegramente en cianometahemoglobina son las más estables de los diversos pigmentos hemoglobínicos. Puede afirmarse que las soluciones

de cianometahemoglobina se mantienen estables no menos de 6 meses en congelación. La banda de absorción de la cianometahemoglobina en la región de 540 nm es más bien ancha que estrecha.

Los colorímetros fotoeléctricos permiten determinar la hemoglobina con exactitud de ± 1 al 2 % en sistemas automatizados y ± 2 a 5 % en técnicas manuales estándar.

Fundamento

La sangre se hemoliza por agregado de un agente tensoactivo. Se emplea una solución con ferricianuro y cianuro de potasio. El ferricianuro convierte el hierro ferroso de la hemoglobina en férrico para formar metahemoglobina, que se combina con el cianuro potásico para formar cianometahemoglobina estable. Esta determinación involucra la dilución de la cianometahemoglobina 1:251. La solución clara y estable de la cianometahemoglobina tiene un espectro de absorción con un pico máximo relativamente plano alrededor de 540 nm. Las mediciones en absorbancia obtenidas en esta solución, con los espectrofotómetros, sigue típicamente la Ley de Lambert y Beer a través de un amplio rango de concentración.



La absorbancia de la cianometahemoglobina a 540 nm es directamente proporcional a la concentración de Hb

Material e instrumentos

- Sangre venosa con anticoagulante
- Pipeta de Sahli de 0.02 mL (20 μ L)
- Boquilla
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, y 5 mL
- Celdas espectrofotométricas
- Espectrofotómetro

Reactivos

- Solución diluyente de Drabkin
- Estándar de cianometahemoglobina

Procedimiento

Preparación de la curva estándar de Hb

1. Realizar las diluciones en 6 tubos de ensayo de 13 x 100 mm como se muestra en la tabla 4.

Tabla No. 4. Curva de calibración para la determinación de Hemoglobina

No. de tubo	Vol. Drabkin (mL)	Vol. estándar (mL)	Absorbancia	Concentración de Hb (g/dL)
Blanco	5.0	0.0		
1	4.0	1.0		
2	3.0	2.0		
3	2.0	3.0		
4	1.0	4.0		
5	0.0	5.0		

2. Colocar las diferentes diluciones de los tubos en celdas espectrofotométricas.

3. Medir la absorbancia de los tubos 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente, usando el tubo indicado como blanco y leyendo a 540 nm.
4. La siguiente fórmula se emplea para calcular la concentración de hemoglobina en g/100 ml. Para completar los espacios correspondientes en la Tabla 4.

$$\text{Hb(g/dL)} = \frac{\text{Volumen del estándar} \times \text{concentración del estándar}^3 \text{ (g/dL)} \times 251}{\text{Volumen total}}$$

251 = dilución de sangre

Muestra problema

1. Recolectar 5 mL de sangre venosa en un tubo con tapón lila y mezclar por inversión.
2. Colocar 5 ml del reactivo diluyente de Drabkin en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm con una pipeta volumétrica.
3. Llenar la pipeta de Sahli con la muestra de sangre venosa hasta la marca de 0.02 mL (20 µL). En caso de utilizar el método de punción capilar, tomar la muestra directamente de la herida.
4. Limpiar la sangre adherida al exterior de la pipeta de Sahli.
5. Descargar el contenido de la pipeta de Sahli en los 5 mL de la solución diluyente de Drabkin, enjuagando ahí mismo tres veces la pipeta, aspirando y expeliendo cuidadosamente, a fin de arrastrar toda la sangre de las paredes internas de la pipeta de Sahli. La dilución es de 1:251.
6. Mezclar la sangre con la solución reactiva por burbujeo brusco con la misma pipeta Sahli, con la ayuda de un agitador mecánico tipo vortex o mediante rotación brusca del tubo.
7. Dejar reposar la mezcla durante 10 minutos para que la conversión de la hemoglobina en cianometahemoglobina sea total.
8. Colocar la solución de cianometahemoglobina en las celdas espectrofotométricas.
9. Medir la absorbancia de la solución de cianometahemoglobina, usando la solución diluyente de Drabkin como blanco y leyendo a 540 nm.

³ La concentración del Estándar comercial dependerá de la concentración que este indicada en la etiqueta.

Valores de referencia

Edad	Hb(g/dL)	
	Hombres	Mujeres
Primera semana de vida	17-21	17-21
1 semana a 2 meses	11-17	11-17
2 a 12 meses	11-15	11-15
1 a 3 años	10-15	10-15
3 a 8 años	11-15	11-15
8 a 15 años	11-16	11-16
15 años en adelante *	15.5-19.5	12.5-16.6

Actividades

- Determinar la concentración de hemoglobina en g/dL a cada una de las diluciones de la Tabla 4 (tubo 1, 2, 3, 4, y 5), utilizando la fórmula indicada.
- Con los datos de concentración de hemoglobina (g/dL) de cada dilución y su correspondiente lectura de absorbancia, trazar gráfica de $A = f[C]$ en papel milimétrico y ajustar los puntos.
- Interpolar la lectura de absorbancia de la muestra problema con la gráfica obtenida de la curva estándar para obtener el resultado de Hemoglobina en g/dL.

* Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología (AMEH)

RECUESTO DE ERITROCITOS

Los recuentos celulares anteriormente se realizaban con métodos manuales siendo el corazón de esta prueba los hemocitómetros o cámaras contadoras, hoy en día se emplean equipos electrónicos que pueden ser semiautomatizados o automatizados.

El principio del recuento celular manual es sencillo y similar para eritrocitos, leucocitos y plaquetas, solo varían la dilución, el diluyente y el área contada. Hasta hace poco el recuento se expresaba en cantidad por mm^3 , por el volumen obtenido en el hemocitómetro, el cual se determina mediante medidas lineales, y actualmente se expresan en litros (L), pues los equipos automatizados cuentan una mayor cantidad de células suspendidas en una solución diluyente isotónica.

Los principios generales de estas mediciones son:

1. Escoger un líquido de dilución que no solamente diluya los eritrocitos hasta cifras legibles, sino también permita identificarlos de una u otra manera, o destruya otros elementos celulares.
2. Emplear una cámara de recuento de glóbulos, o un contador electrónico, que presenten al observador o al aparato de lectura los glóbulos en forma tal que se pueda establecer el número de ellos por unidad de volumen de líquido. El contador electrónico de glóbulos evita el error humano, y al contar un mayor número de glóbulos, resulta estadísticamente más preciso.

Recuento manual

Hemocitómetro o cámara de conteo

La cámara de conteo es un aparato de vidrio óptico especial de precisión, se emplea para contar células o partículas en suspensión. Es una placa rectangular gruesa del tamaño de un portaobjetos, con dos superficies elevadas separadas por una hendidura en forma de H (Figura 10).

Las prominencias transversales están localizadas a cada lado de la zona rayada. Sobre las prominencias transversales se coloca un cubreobjetos plano estandarizado y ópticamente corregido. Entre la superficie inferior del cubreobjetos y la superficie de la zona rayada existe una profundidad de 0.1 mm. Suelen utilizarse los hemocitómetros con rayado de Neubauer modificado.

Esta cámara consta de un cuadro primario que mide $3 \times 3 \text{ mm}$ (9 mm^2), subdividido en nueve cuadros secundarios, cada uno de $1 \times 1 \text{ mm}$ (1 mm^2). Los cuatro cuadrados secundarios de las esquinas llamados **A**, **B**, **C** y **D** que muestra la Figura 11, se emplean para el recuento de leucocitos y se subdividen en 16 cuadros terciarios cada uno de ellos respectivamente.

El cuadro milimétrico central **E**, está subdividido en 25 cuadros cuaternarios, y cada uno de los cuales mide $0.2 \times 0.2 \text{ mm}$. Cada uno de estos cuadros está subdividido ulteriormente en 16 cuadros más pequeños. El número total de cuadros pequeños del cuadro central suman 400 (25×16). Como regla, cinco de los cuadros terciarios equivalen a 80 de los cuadros más pequeños (5×16) se emplean para el recuento de eritrocitos y se marcan como 1, 2, 3, 4 y 5 (Figura 11).

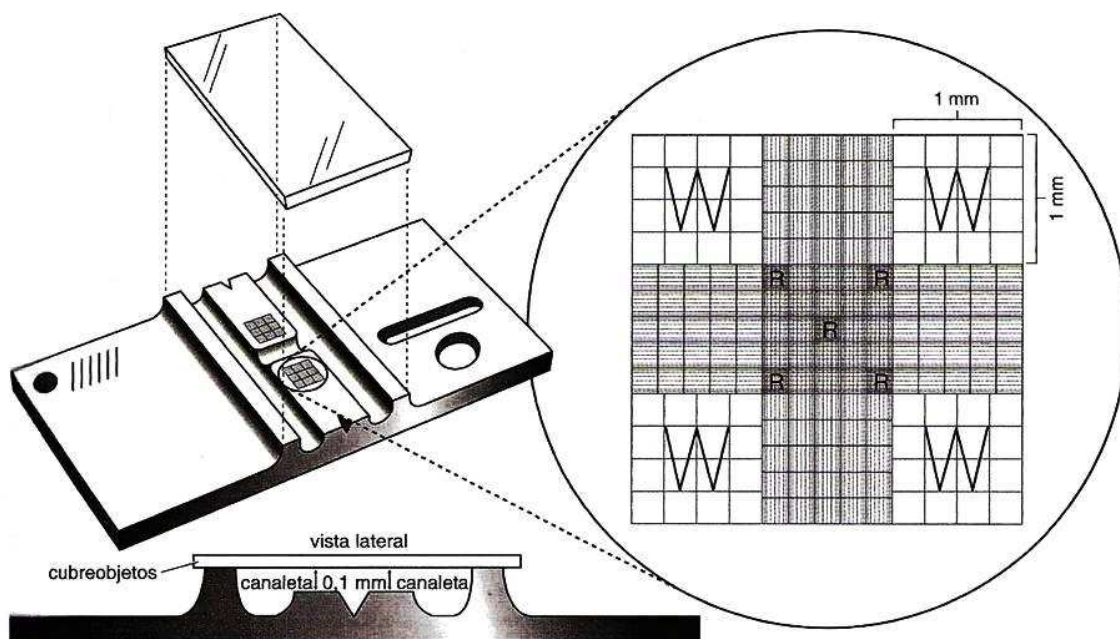


Fig. 10. Cámara de Neubauer y un primer plano de las áreas de conteo como se ven en el microscopio. Los cuadros marcados con una W se emplean para contar leucocitos y los que están marcados con una R para eritrocitos.

Pipeta para diluir los eritrocitos

La dilución de la muestra se puede hacer con una pipeta de Thoma o por el sistema de dilución en tubo.

Las pipetas de cristal de Thoma constan de un tubo capilar graduado, dividido en 10 partes y marcado con un 0,5 en la quinta señal y con 1 en la décima, y por encima un ensanchamiento, ampolla o pera para mezcla, con una bolita de cristal en su interior de color rojo indicando su uso para eritrocitos y blanca para el uso de leucocitos, y por encima de la pera otro tubo capilar corto con una marca de 101 grabada en la pipeta para recuento de eritrocitos y de 11 en la de recuento de leucocitos. El volumen para la pipeta de eritrocitos está constituido por una parte a nivel de la marca 1 y 100 partes en la ampolla, o una parte a nivel de la marca 0,5 y 200 partes en la ampolla.

Cuando la sangre es aspirada hasta la marca de 0,5 y el líquido de dilución, hasta la marca de 101, todas las células sanguíneas se lavan en la ampolla y la dilución resultante en el mismo es de 1 a 200. La parte capilar de la pipeta no contiene sangre, sino sólo líquido diluyente; por consiguiente, no está incluido en el volumen y su contenido debe ser expulsado antes que la suspensión de eritrocitos se introduzca en la cámara de recuento.

Líquido diluyente

El líquido debe ser isotónico para evitar la lisis y la crenación de los eritrocitos. Debe contener un fijador para preservar la forma de las células y prevenir la aglutinación y autólisis, si y solo si, el recuento no puede ser llevado a cabo dentro de una hora.

Existen diversos tipos de líquidos de dilución utilizados en el Laboratorio. Dentro de los más comunes se encuentra la solución de Gower y la de Hayem, otros también utilizados con cierta frecuencia son la solución de Toison y la solución de Daice. Utilizando estas soluciones se evita la formación de conglomerados y apilamientos de eritrocitos. Los leucocitos no llegan a destruirse y, aunque se cuenten a la vez que los hematíes, no se originará demasiada variación en el número total de eritrocitos contados.

El recuento manual de eritrocitos tiene un error del 10%, el cual puede deberse a múltiples causas, algunas de estas pueden ser:

- Errores de extracción: dilución o hemoconcentración de la muestra. Hemólisis o coagulación parcial.
- Mala homogenización de la muestra.
- Utilización de material mal calibrado, sucio o húmedo.
- Errores en la dilución de la muestra.
- Cámara de Neubauer no calibrada, sucia o mojada.
- Llenado incorrecto de la cámara de Neubauer.
- Empleo de cubrehematiméetro descalibrado.
- Errores del analista durante el recuento y cálculos realizados.

Debido a esto y al empleo de equipos automatizados, el recuento de eritrocitos manual se realiza en raras ocasiones y además este puede ser substituido por parámetros eritrocíticos manuales más exactos, como el microhematocrito y la Hb, pues estos parámetros guardan una estrecha relación.

La regla del tres

Esta regla sólo es válida para muestras con eritrocitos de morfología normal. El valor de la Hb debe ser tres veces el del recuento de eritrocitos.

- Recuento de eritrocitos $\times 3 = \text{Hb}$

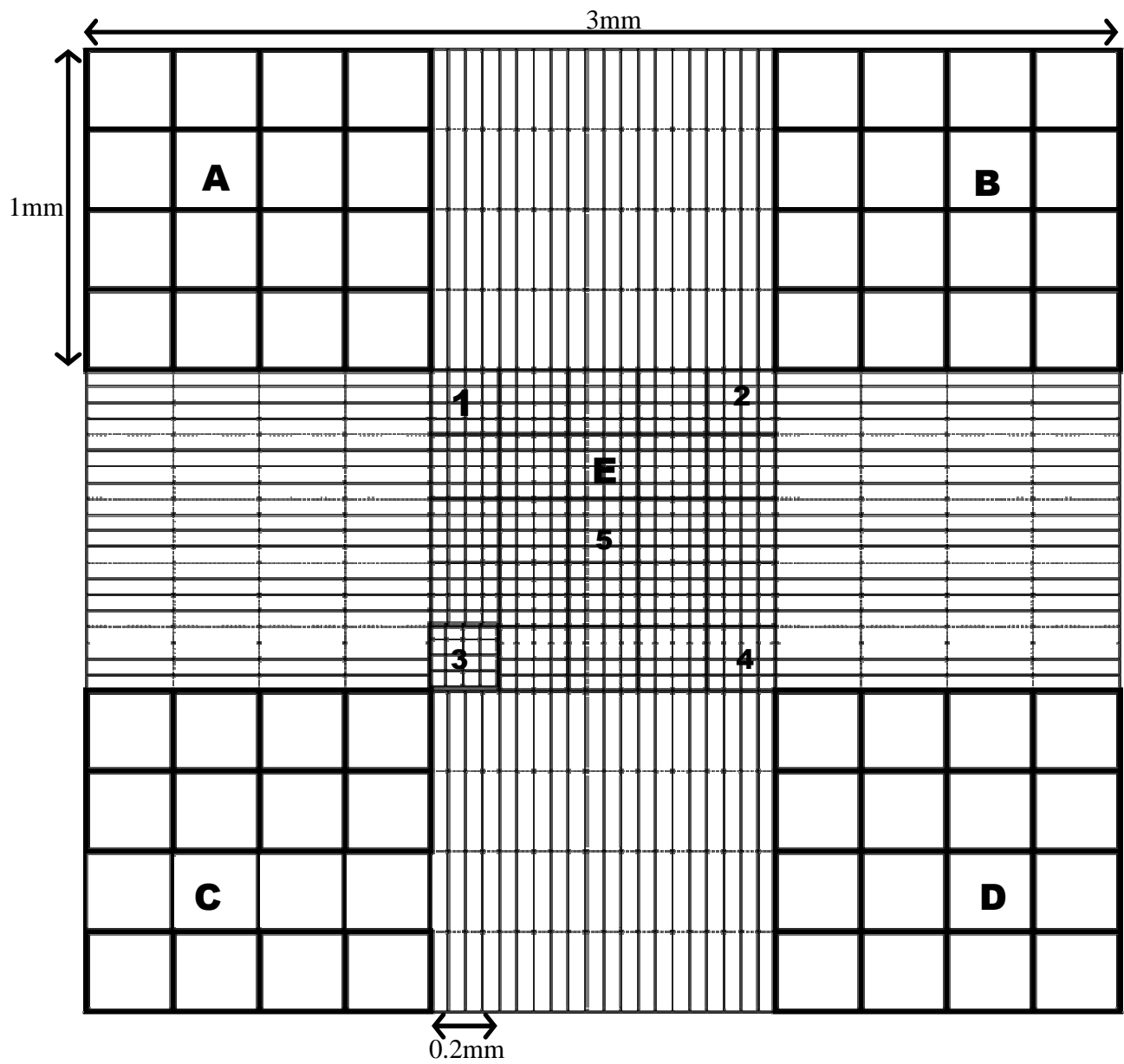


Fig. No. 11. Cuadrícula microscópica de la cámara de Neubauer

Fundamento

El recuento manual de eritrocitos incluye la aspiración de una cantidad muy exacta de sangre anticoagulada en una pipeta de Thoma escrupulosamente limpia, posteriormente se diluye la sangre hasta la señal determina de 101 de la misma pipeta con un líquido que es isotónico respecto a los eritrocitos. Después de efectuar una adecuada mezcla la solución resultante se coloca en una cámara de recuento muy limpia (hemocitómetro) y se cubre con cubreobjetos estandarizado, ópticamente plano y limpio. La cantidad de eritrocitos en un volumen dado se cuenta sobre la platina de un microscopio de luz.

El recuento eritrocitario total sólo se calcula exactamente cuando se tienen en cuenta las dimensiones hemocitómetro–cubreobjetos y las diluciones de la pipeta. Es decir, que se calcula mejor el número de eritrocitos por milímetro cúbico de sangre cuando se tiene en cuenta el área contada, la profundidad de la cámara y la dilución según la fórmula siguiente:

$$\text{Eritrocitos/mm}^3 = N \times \frac{\text{Dilución}}{\text{Volumen}}$$

N = Número de células contadas

Volumen = lado x lado x profundidad = mm³

Dilución = 1:200 ó 1:100

Material e instrumentos

- Sangre con EDTA
- Boquilla
- Pipeta de Thoma para eritrocitos
- Agitador para pipetas de Thoma
- Cámara de Neubauer
- Cubrehemocitómetro
- Microscopio

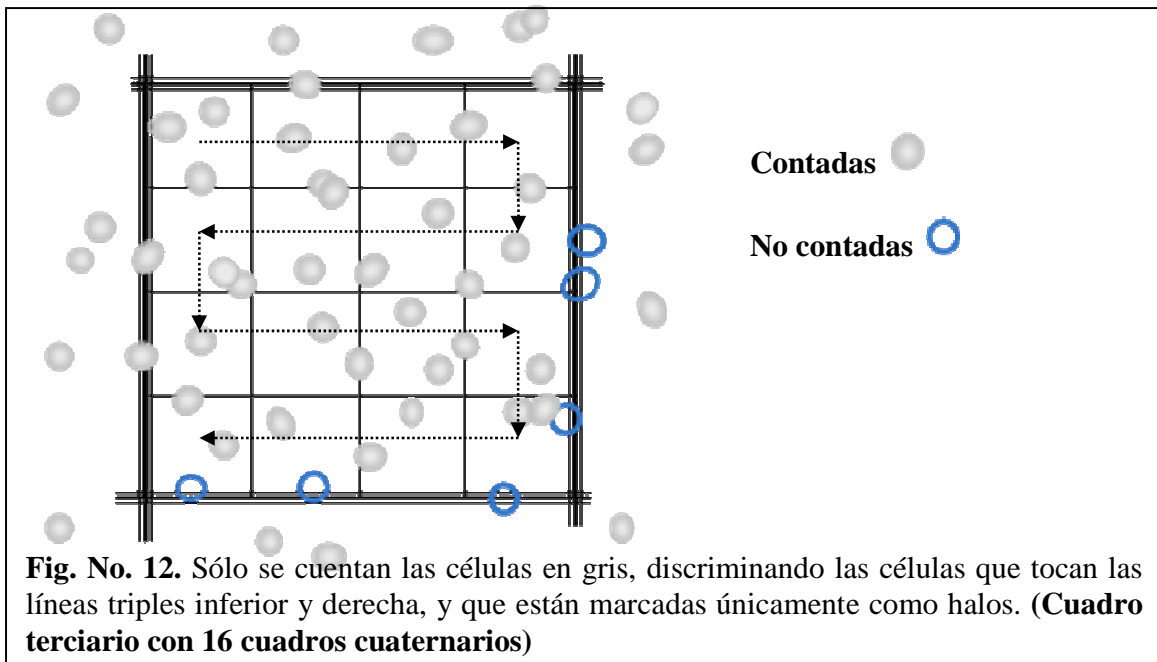
Reactivos

- Líquido de Hayem

Procedimiento

1. Recolectar 5mL de sangre venosa en un tubo con EDTA, y mezclar por inversión.
2. Con la pipeta en posición horizontal aspirar sangre hasta la marca de 0,5. El exceso de sangre se elimina tocando la punta de la pipeta con una gasa.
3. Limpiar la sangre adherida a las paredes externas de la pipeta con una gasa procurando no tocar la punta de la pipeta.
4. Introducir la pipeta en forma vertical en el líquido de Hayem y aspirar diluyente hasta la marca de 101. Si se aspira mas diluyente se desecha todo el contenido de la pipeta en un recipiente con cloro y se inicia nuevamente con el paso 2.
5. Retirar el adaptador de la boquilla obturando con parafilm la punta de la pipeta para evitar la pérdida de líquido, colocar parafilm en el extremo opuesto a la punta y

- manteniendo la pipeta siempre en posición horizontal se coloca en el agitador mecánico durante 3 ó 4 minutos.
- Colocar el cubreobjetos sobre las dos superficies elevadas de la cámara para cubrir las dos cuadrículas.
 - Desechar las primeras 4 ó 6 gotas de la pipeta para eliminar el diluyente que queda en el capilar y que no diluye la muestra.
 - Cargar ambos lados de la cámara, manteniendo la pipeta en un ángulo de 45° tocar con la punta el borde del cubreobjetos donde se junta con la superficie elevada de la cámara. El hemocitómetro se llena por capilaridad, el flujo de llenado debe ser constante y sin que este llene la hendidura en forma de H de la cámara.
 - Colocar el hemocitómetro en la platina del microscopio y dejar reposar de 3 a 5 minutos, para dar tiempo a que las células se distribuyan y se asienten en el fondo de las cuadrículas.
 - Con el objetivo de 10X se localiza el cuadro central E y se comprueba que las células estén distribuidas uniformemente.
 - Una vez enfocado el cuadro central, con el objetivo de 40X se cuentan los cuadros marcados del 1-5 mostrados en la Figura 11.
 - Se comienza a contar las células contenidas en el cuadro terciario superior izquierdo marcado como 1 y se sigue el orden establecido de los números marcados en la Figura 11.
 - El conteo de las células en los 16 cuadros cuaternarios de cada cuadro terciario se realiza como se muestra en la Figura 12.



- Se anotan separadamente el número de eritrocitos en cada cuadro terciario contado y se suma el resultado de los 5 cuadros.
- Determinar la cuenta total de eritrocitos/mm³, empleando la fórmula:

$$\text{Eritrocitos/mm}^3 = N \times \frac{200}{5(0.2\text{mm})^2(0.1\text{mm})}$$

N = Eritrocitos contados
 5 = Cuadros terciarios contados
 $(0.2)^2$ = área de cuadro terciario
 0.1 = altura de la cámara
 200 = dilución de la muestra

$$\text{Eritrocitos/mm}^3 = N \times 10000$$

10000 = Factor (depende de la dilución empleada)

16. Lavar las pipetas de Thoma una vez con agua corriente y tres veces con agua destilada.
17. El hemocitómetro y los cubreobjetos deben limpiarse sumergiendo en agua tibia y nunca secados con gasa o pañuelos para evitar que se rayen. Una vez limpios deben dejarse secar al aire antes de guardarse.

Valores de referencia

Edad	Recuento de eritrocitos $\times 10^6/\mu\text{L}$	
	Hombres	Mujeres
Primera semana de vida	4,50-6,50	
2 meses	3,60-5,00	
1 año	3,50-5,50	
1-3 años	4,00-5,50	
3-8 años	4,10-5,50	
8-15 años	4,10-5,70	
15 años en adelante*	5,00-6,30	4,10-5,70

Actividades

- Realizar las pruebas de hematócrito y hemoglobina además del recuento de eritrocitos.
- En base a las tres pruebas realizadas en el laboratorio (Hto, Hb y cuenta de eritrocitos) calcular los *índices eritrocitarios* (VCM, HCM Y CHCM).

* Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología (AMEH)

ÍNDICES ERITROCITARIOS

Los índices eritrocíticos han adquirido fiabilidad con el empleo del recuento electrónico de los eritrocitos, la hemoglobimetría estandarizada y la técnica del microhematócrito. En consecuencia, estos índices habrían de calcularse en todo paciente anémico, a fin de confirmar la impresión que en el frotis se ha obtenido acerca del tamaño celular y el contenido de hemoglobina.

Wintrobe calculó tres índices relacionados con la serie roja y que hacen referencia al volumen de los eritrocitos y a su contenido hemoglobínico. Debido a que se ha tenido un gran interés hematológico, se han seguido utilizando desde entonces. Su cálculo se realiza a partir del valor de hematócrito, de la concentración de hemoglobina y del número de eritrocitos por unidad de volumen.

Los índices de Wintrobe son tres: el volumen corpuscular (o globular) medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM).

Volumen corpuscular medio (VCM)

En las épocas en que los recuentos hematológicos se practicaban manualmente, el volumen corpuscular medio (VCM) era un valor calculando al dividir el hematócrito (%) por la cifra de eritrocitos. Con el método utilizado más frecuentemente en la actualidad, el recuento instrumental, el VCM se mide directamente con gran precisión; dicho método se basa en las variaciones de intensidad de la señal según el volumen de cada eritrocito, variaciones que registra el aparato de medición. El valor medio de referencia del VCM es de 90 fL (el femtolitro ó 10^{-15} L), siendo los límites de referencia de 80 a 100 fL. Un VCM bajo equivale a microcitosis, y uno elevado, a macrocitosis. Debido a que la valoración del tamaño de los hematíes es fundamental para el diagnóstico de una anemia, el VCM es el más importante de todos los índices eritrocitarios (aún en los casos en los que la cifra de eritrocitos sea normal, debe anotarse la cifra del VCM en el informe hematológico, ya que la anemia declarada puede ir precedida de una anomalía en el tamaño de los eritrocitos). Su determinación se efectúa mediante la siguiente fórmula:

$$VCM (fL) = \frac{Hto (\%) \times 10}{\text{Recuento de eritrocitos } (10^{12}/L)}$$

Hemoglobina corpuscular media (HCM)

La hemoglobina corpuscular media (HCM) es el peso medio de la hemoglobina que contiene cada eritrocito; se calcula dividiendo la cifra de hemoglobina (g/dL) con la cifra de eritrocitos. Los límites de referencia oscilan entre 27 y 34 pg (picogramos ó 10^{-12} g). Aunque el peso de la hemoglobina que existe en un eritrocito depende al mismo tiempo de la concentración de aquella en el interior de éste y del volumen del eritrocito, las gráficas en las que se relacionan los valores instrumentales de HCM y VCM ofrecen una relación lineal dentro de una amplia gama. Al parecer, la concentración de hemoglobina no varía más que en aquellos trastornos en los que exista una gran alteración de la síntesis de Hb. Es por ello que, con el recuento electrónico, la HCM se ha convertido en un dato superfluo para el clínico, que sirve solamente para confirmar el VCM medido directamente. No obstante, es un parámetro útil para el personal del laboratorio, como comprobación de la

precisión alcanzada por el aparato de medición. La HCM se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$HCM (pg) = \frac{Hb (g/dL) \times 10}{\text{Recuento de eritrocitos } (10^{12}/L)}$$

Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)

Aunque la hemoglobina está presente sólo en el interior de los eritrocitos, éstos se lisan para medir la concentración de hemoglobina, y los resultados se expresan en relación a decilitros (dL) de sangre total. Para convertir este valor en concentración de hemoglobina dentro del eritrocito –concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)- se divide la cifra de hemoglobina (g/dL) por la de hematócrito (%), es decir por el volumen de sangre total que ocupan los eritrocitos. Los límites de referencia de la CHCM oscilan entre 32 y 36 g/dL de eritrocitos (expresado habitualmente, de forma simple, como 32 – 36 %).

Antes del advenimiento de los recuentos electrónicos, se hallaba generalmente una CHCM baja cuando los eritrocitos observados en una extensión sanguínea presentaban palidez central de mayor tamaño que el habitual, es decir, que aparecían hipocrómicos. La hipocromía se acepta, por consiguiente, como prueba visual de una concentración reducida de hemoglobina en los eritrocitos. Sin embargo, el hematócrito obtenido manualmente mediante centrifugado de la sangre puede dar resultados falsamente elevados en un paciente anémico, por atrapamiento del plasma dentro de la columna de eritrocitos. Cuando el hematócrito instrumental (calculado a partir de los valores, medido con gran precisión, VCM y de la cifra de eritrocitos) reemplazo al obtenido manualmente, se hallaron resultados dentro de los valores de referencia de CHCM en pacientes cuyos eritrocitos eran moderada, pero claramente hipocrómicos en el frotis sanguíneo. Al parecer, por consiguiente, la hipocromía moderada no se debe a una baja concentración de hemoglobina en los eritrocitos, sino a la presencia de unos eritrocitos más pequeños y delgados de lo normal.

Paradójicamente, la corrección del error del hematócrito, mediante la utilización de los datos instrumentales para el cálculo de la CHCM, ha disminuido la utilidad clínica de ésta, ya que sus valores han dejado de estar fuera de los valores de referencia en la fase precoz de la anemia ferropénica. Así, las cifras bajas de CHCM por recuento instrumental se encuentran solamente en los pacientes con una gran alteración de la síntesis de hemoglobina, por ejemplo, anemia ferropénica grave o trastorno talasémico mayor. No obstante, dado que estos pacientes se identifican fácilmente por la acusada disminución del VCM y la intensa hipocromía que presentan en el frotis sanguíneo, la determinación de la CHCM se ha convertido también en superflua en estos casos. La CHCM corresponde a la media de la concentración de hemoglobina en cada eritrocito, y se determina mediante la siguiente fórmula:

$$CHCM (g/dL) = \frac{[Hb (g/dL) \times 100]}{Hto (\%)}$$

Fundamento

El cálculo de estos tres índices eritrocitarios (VCM, HCM y CHCM), siguen siendo una herramienta en la clasificación de las *Anemias*, y esto en base al tamaño del eritrocito y a la concentración de hemoglobina.

Actividades

- En base a la práctica anterior en la cual se realizó la determinación de hematócrito, hemoglobina y recuento de eritrocitos, calcular los índices eritrocitarios.

CUENTA TOTAL DE LEUCOCITOS

En el recuento total de leucocitos no existe distinción entre los cinco tipos de células (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos, en orden decreciente de cantidad). Cada tipo de célula tiene su función particular en la defensa del organismo contra las amenazas exógenas.

Los métodos para el recuento leucocitario y los principios generales de estas mediciones son los mismos que para los ya mencionados en el recuento eritrocitario.

Recuento celular manual

Hemocitómetro

En este método suelen utilizarse los hemocitómetros con rayado de Neubauer modificado (Ver figura 11). La zona rayada de la cámara es un cuadrado de 3 mm por lado. Este cuadrado está dividido en 9 cuadros de 1x1 mm llamados *cuadros secundarios*. Los leucocitos se cuentan en los cuatro cuadrados secundarios de las esquinas: **A, B, C y D**. Cada cuadro secundario de las esquinas de la zona rayada está dividido en 16 cuadros, cada uno de los cuales miden de 0,25 x 0,25 mm, y se llaman *cuadros terciarios*. Entre la superficie inferior del cubrehematímetro y la superficie de la zona rayada de la cámara existe una profundidad de 0,1 mm.

Pipetas para diluir los leucocitos

La pipeta automática de Trenner tiene una pequeña perla blanca y la señal 21 sobre la ampolla. Se fabrica uniendo una ampolla con el extremo de un tubo capilar alargado cuyo extremo superior termina bruscamente en una superficie pulida perpendicular al eje longitudinal. Tiene la ventaja de que el tubo capilar puede llenarse por capilaridad y la sangre se detiene exactamente en el extremo del tubo, con lo que se obtiene un control exacto de la columna sanguínea. Sin embargo, estas pipetas son más caras y frágiles que las demás.

El sistema Unopette se ha establecido para evitar las principales fuentes de error: la introducción exacta de la sangre hasta la señal y el hacer una dilución exacta. Este sistema utiliza una micropipeta de vidrio con autollenado que es desechable, combinada con un recipiente de plástico y previamente llenado con un diluyente adecuado.

La pipeta de Thoma tiene un tubo y una ampolla para mezclar. El tubo está dividido en 10 partes que miden el volumen de muestra de sangre. La graduación quinta y décima están marcadas como 0,5 y 1 respectivamente. La ampolla de la mezcla se extiende desde la marca de 1 a la de 11. Contiene una bolita blanca que ayuda a mezclar. El volumen de la ampolla es de 20 veces el tubo en la marca de 0,5 y 10 veces el del tubo en la marca de 1. Si se aspira sangre hasta la marca de 1 y líquido diluyente hasta 11, dicho factor será de 10.

Líquido diluyente

El líquido diluyente debe disolver los eritrocitos para que no se obscurezcan los leucocitos. El más sencillo es una solución de ácido acético al 2 ó 3%, con una cantidad de violeta de genciana suficiente para dar un color azul violeta pálido. La solución hipotónica

de ácido acético destruye los eritrocitos. Puede utilizarse el líquido de Türk. El violeta de genciana permite reconocer fácilmente el líquido, y observar mejor los leucocitos, a los que tiñe ligeramente.

Fundamento

El método general hemocitométrico comprende el empleo de una solución hipotónica ácida que hemoliza los eritrocitos, pero que no altera los leucocitos o células nucleadas (con o sin tinción nuclear). La solución ácida se utiliza para diluir la sangre en una pipeta especial para leucocitos. Los leucocitos se tiñen ligeramente para observarse mejor. La mezcla de líquido y sangre anticoagulada se coloca en el hemocitómetro (cámara de recuento), se cubre con un cubreobjetos especial (cubrehemocitómetro) y se deja en reposo para que se estabilicen los leucocitos. A continuación se efectúa el recuento leucocitario en el microscopio.

El recuento de los leucocitos totales solo se calcula exactamente cuando se tienen en cuenta las dimensiones del espacio de la cámara-cubrehemocitómetro y las diluciones de la pipeta. Se calcula mejor el número de leucocitos por milímetro cúbico de sangre cuando se toma en cuenta el área contada, la profundidad de la cámara y la dilución según la fórmula siguiente:

$$\text{Leucocitos/mm}^3 = N \times \frac{\text{Dilución}}{\text{Volumen}}$$

N = Número de células contadas

Volumen = lado x lado x profundidad = mm³

Dilución = 1:20 ó 1:10

Material e instrumentos

- Sangre con EDTA
- Boquilla
- Pipeta de Thoma para leucocitos
- Agitador para pipetas de Thoma
- Cámara de Neubauer
- Cubrehemocitómetro
- Microscopio

Reactivos

- Líquido de Türk

Procedimiento

1. Recolectar 5mL de sangre venosa en un tubo con EDTA, y mezclar por inversión.
2. Con la pipeta en posición horizontal aspirar sangre hasta la marca de 0,5. El exceso de sangre se elimina tocando la punta de la pipeta con una gasa.
3. Limpiar la sangre adherida a las paredes externas de la pipeta con una gasa procurando no tocar la punta de la pipeta.
4. Introducir la pipeta en forma vertical en el líquido de Türk y aspirar diluyente hasta la marca de 11. Si se aspira mas diluyente se desecha todo el contenido de la pipeta en un recipiente con cloro y se inicia nuevamente con el paso 2.
5. Retirar el adaptador de la boquilla obturando con parafilm la punta de la pipeta para evitar la pérdida de líquido, colocar parafilm en el extremo opuesto a la punta y

- manteniendo la pipeta siempre en posición horizontal se coloca en el agitador mecánico durante 3 ó 4 minutos.
6. Colocar el cubreobjetos sobre las dos superficies elevadas de la cámara para cubrir las dos cuadrículas.
 7. Desechar las primeras 4 ó 6 gotas de la pipeta para eliminar el diluyente que queda en el capilar y que no diluye la muestra.
 8. Cargar ambos lados de la cámara, manteniendo la pipeta en un ángulo de 45° tocar con la punta el borde del cubreobjetos donde se junta con la superficie elevada de la cámara. El hemocitómetro se llena por capilaridad, el flujo de llenado debe ser constante y sin que este llene la hendidura en forma de H de la cámara.
 9. Colocar el hemocitómetro en la platina del microscopio y dejar reposar de 3 a 5 minutos, para dar tiempo a que las células se distribuyan y se asienten en el fondo de las cuadrículas.
 10. Con el objetivo de 10x se localizan los cuatro cuadros secundarios y se comprueba que las células estén distribuidas uniformemente. En caso contrario se carga otra cámara.
 11. Se cuentan los leucocitos en cada uno de los cuadros marcados como A, B, C y D mostrados en la Figura 11.
 12. El conteo de las células en los 16 cuadros que forman cada cuadro secundario se realiza como se muestra en la Figura 13.

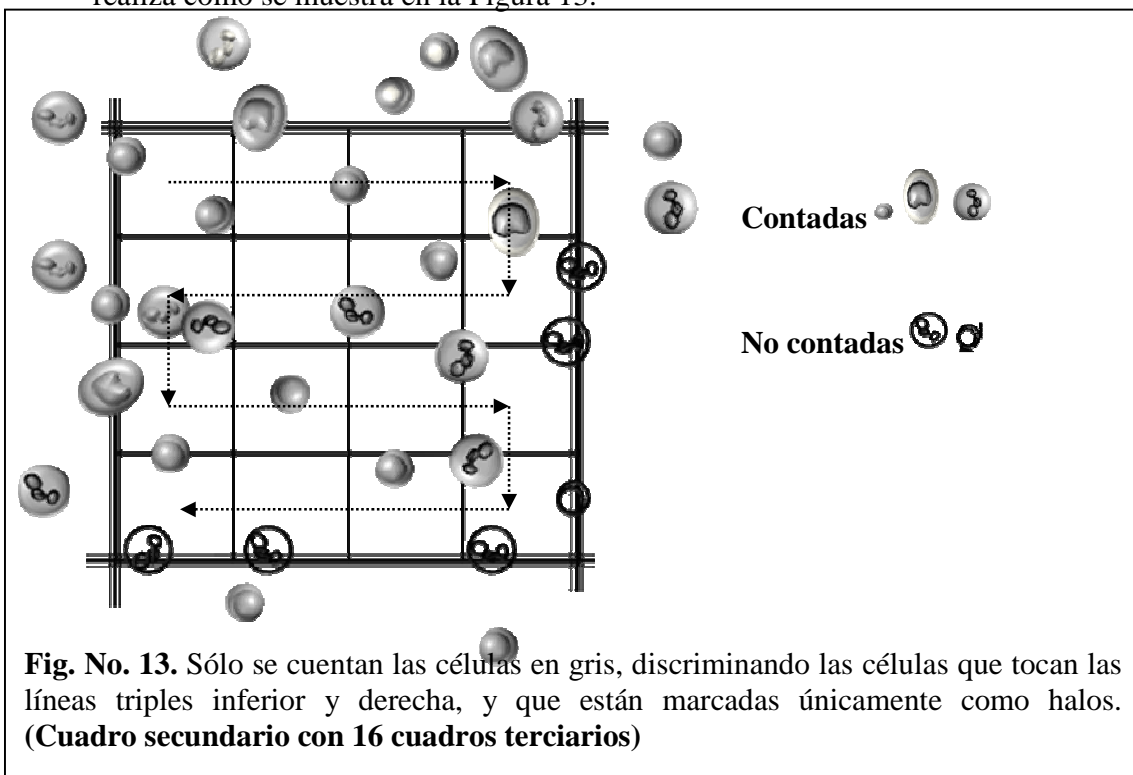


Fig. No. 13. Sólo se cuentan las células en gris, discriminando las células que tocan las líneas triples inferior y derecha, y que están marcadas únicamente como halos. (Cuadro secundario con 16 cuadros terciarios)

13. Se cuentan separadamente el número de leucocitos en cada cuadro secundario y se suman los resultados. El recuento de cada cuadro no debe variar en más de 10 células.
14. Calcular el número de leucocitos/mm³ con la siguiente fórmula:

$$\text{Leucocitos/mm}^3 = N \times \frac{20}{4(1\text{mm}^2) \cdot 0,1\text{mm}}$$

N = Número de leucocitos contados

Volumen = lado x lado x profundidad = mm³

Dilución = 1:20 ó 1:10

$$\text{No. de leucocitos/mm}^3 = N \times 50$$

50 = Factor

15. Los eritroblastos no se lisan por lo cual deben contarse juntamente con los leucocitos y posteriormente debe corregirse la cuenta total de leucocitos mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Leucocitos/mm}^3 = N \times \frac{100}{100 + \% \text{ eritroblastos en cuenta diferencial}}$$

16. Si la cuenta de leucocitos es menor de 4000/mm³, es preferible hacer nuevamente la cuenta de leucocitos pero con una dilución 1:10, si por el contrario la cuenta es muy elevada se debe emplear una dilución 1:100 o 1:200 con la pipeta para eritrocitos.

17. Lavar el material empleado como se indico en la práctica para el recuento de eritrocitos.

Valores de referencia

Edad	Leucocitos X10 ³ /μL
Neonatos	10000-30000
Lactantes	7000-17000
Niños pequeños	6000-15000
Escolares	5000-12000
Adultos*	4000-12000

* Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología (AMEH)

RECUESTO PLAQUETARIO

Las plaquetas son los elementos formes más pequeños de la sangre. Actúan en la hemostasia y en el mantenimiento de la integridad vascular, además de participar en el proceso de la coagulación sanguínea.

Las plaquetas son difíciles de contar debido a que son pequeñas y deben distinguirse de los restos y desperdicios celulares. Otra fuente de dificultad reside en su tendencia de adherirse al cristal, a cualquier cuerpo extraño y en particular unas a otras. Además, las plaquetas no están uniformemente repartidas por la sangre. El error es mucho mayor que en el recuento de leucocitos y eritrocitos, pero es despreciable en la práctica porque solamente se valoran las grandes variaciones en el número de plaquetas.

Existen dos métodos para su cuantificación: el *Método directo* y el *Método indirecto*.

Método directo

A este método pertenecen las siguientes técnicas: La de Rees-Echer utilizando microscopio de luz; el hemocitométrico; el método Unopette; el método de microscopio de contraste de fases y el método de recuento electrónico, especialmente el del Contador Coulter.

El pequeño tamaño de las plaquetas hace que el recuento directo en un hemocitómetro sea más difícil que cuando se trata de otras células. En este método directo con cámara de recuento, se mezcla la sangre venosa o capilar en una pipeta de Thoma para eritrocitos con un líquido diluyente (oxalato de amonio). De los otros métodos ya se han indicado con anterioridad algunos de ellos y sus principios fundamentales. Hoy en día este método también puede realizarse mediante citometría de flujo, por emplear marcadores de membrana específicos de las plaquetas (CD42b=GpIb, CD41=GpIIb/IIIa y CD61=GpIIIa) lo hace un método muy específico pero también muy caro por el empleo de anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos.

Método indirecto

El número de plaquetas se calcula durante la cuenta diferencial leucocitaria. Con sangre capilar se realizan extensiones sanguíneas, las cuales deben ser uniformes y llevarse a cabo con gran rapidez después de obtener la sangre, con objeto de evitar la aglomeración de las plaquetas y minimizar la disminución debida a la adherencia de las mismas a los bordes de los vasos lesionados. Es posible un mejor cálculo examinando las extensiones teñidas procedentes de sangre venosa anticoagulada con EDTA, en la cual las plaquetas se distribuyen uniformemente y la aglomeración y pérdida debidas al proceso hemostático no tiene lugar. A la extensión sanguínea se le practica la tinción de Wright al igual que en un recuento diferencial rutinario. A la vez que se cuentan los eritrocitos se efectúa el recuento de plaquetas hasta que sean contados por lo menos 1000 eritrocitos. El número de plaquetas se calcula a partir de la relación entre el número de eritrocitos total y el de plaquetas; el número de eritrocitos se calcula con un hemocitómetro.

$$\text{Plaquetas/mm}^3 = \frac{\text{Recuento de eritrocitos/mm}^3}{1000} \times \text{cuenta de plaquetas en el frotis}$$

Por consiguiente, cuando se informa acerca de un recuento diferencial, debe hacerse referencia especial a las anormalidades plaquetarias o alteraciones en su número, si existen.

Fundamento

En el método directo con cámara de recuento, se mezcla la sangre capilar o venosa anticoagulada en una pipeta de Thoma para eritrocitos. Es preciso actuar con rapidez para evitar la aglutinación de las plaquetas; las demás células pueden o no destruirse según el líquido de dilución utilizado. Con frecuencia, suelen persistir los eritrocitos, y las plaquetas se cuentan en un hemocitómetro.

Para el cálculo del recuento de plaquetas/mm³, y bajo las condiciones específicas del área contada, profundidad de la cámara y la dilución, se realiza según la fórmula siguiente:

$$\text{Plaquetas/mm}^3 = N \times \frac{\text{Dilución}}{\text{Volumen}}$$

N = Número de células contadas

Volumen = lado x lado x profundidad = mm³

Dilución = 1:200 ó 1:100

Material e instrumento

- Sangre con EDTA
- Boquilla
- Pipeta de Thoma para eritrocitos
- Agitador para pipetas de Thoma
- Cámara de Neubauer
- Cubrehemocitómetro
- Microscopio

Reactivos

- Oxalato de amonio al 1%

Procedimiento

1. Recolectar 5mL de sangre venosa en un tubo con EDTA, y mezclar por inversión (Figura 8).
2. Con la pipeta en posición horizontal aspirar sangre hasta la marca de 1,0. El exceso de sangre se elimina tocando la punta de la pipeta con una gasa.
3. Limpiar la sangre adherida a las paredes externas de la pipeta con una gasa procurando no tocar la punta de la pipeta.
4. Introducir la pipeta en forma vertical en la solución de oxalato de amonio al 1% y aspirar diluyente hasta la marca de 101. Si se aspira mas diluyente se desecha todo el contenido de la pipeta en un recipiente con cloro y se inicia nuevamente con el paso 2.
5. Retirar el adaptador de la boquilla obturando con parafilm la punta de la pipeta para evitar la pérdida de líquido, colocar parafilm en el extremo opuesto a la punta y manteniendo la pipeta siempre en posición horizontal se coloca en el agitador mecánico durante 15 minutos.
6. Colocar el cubreobjetos sobre las dos superficies elevadas de la cámara para cubrir las dos cuadrículas.

7. Desechar las primeras 4 ó 6 gotas de la pipeta para eliminar el diluyente que queda en el capilar y que no diluye la muestra.
8. Cargar ambos lados de la cámara, manteniendo la pipeta en un ángulo de 45° tocar con la punta el borde del cubreobjetos donde se junta con la superficie elevada de la cámara. El hemocitómetro se llena por capilaridad, el flujo de llenado debe ser constante y sin que este llene la hendidura en forma de H de la cámara.
9. La cámara cargada se coloca dentro de una caja de Petri cuyo fondo contiene un disco de papel filtro o algodón húmedo para prevenir la evaporación. Se deja sedimentar durante 15-20 minutos.
10. Después de este tiempo se deja reposar 10 minutos más fuera de la caja de petri y se coloca en la platina del microscopio para localizar el cuadro E.
11. Las plaquetas se cuentan en 10 cuadros terciarios mostrados en la Figura 14.

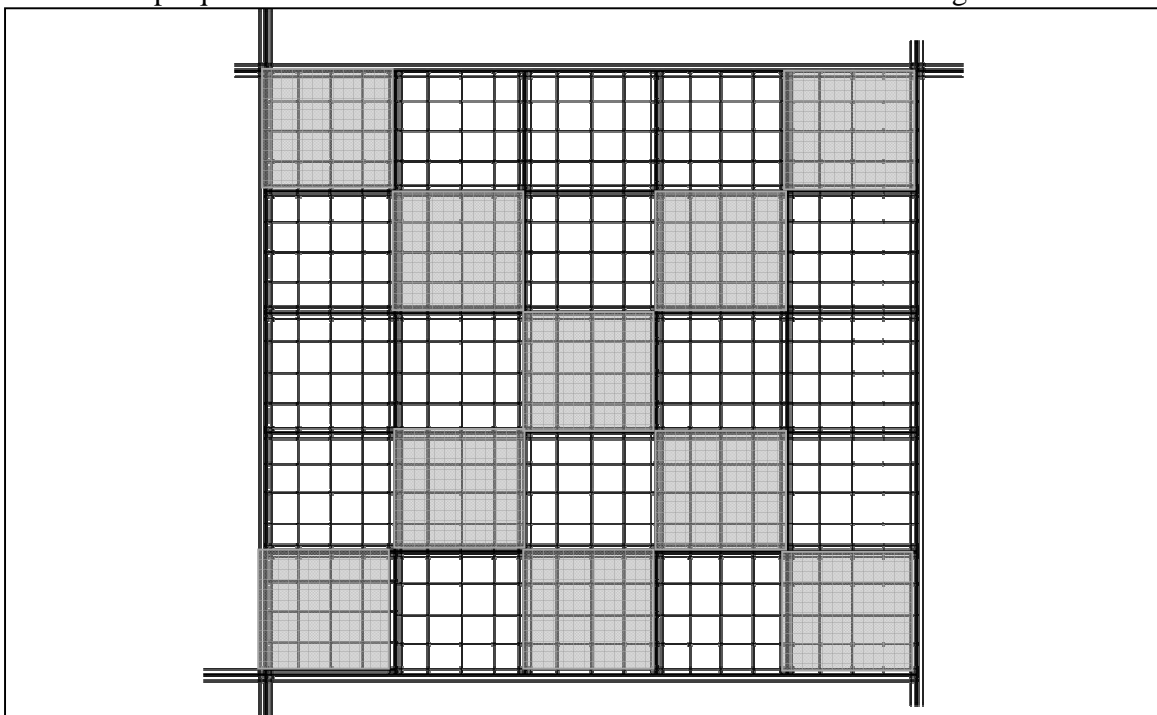


Fig. No. 14. Se cuenta las plaquetas contenidas en los 10 cuadros marcados en gris en la misma forma como se explico para eritrocitos. Si el número de plaquetas contadas es menor a 100, se cuentan más cuadros terciarios hasta registrar por lo menos 100 plaquetas. **(Cuadro secundario donde se marcan en gris 10 cuadros terciarios que contienen 16 cuadros cuaternarios)**

12. El conteo se realiza con el objetivo de 40X. Las plaquetas tienen un aspecto redondo u oval y algunas presentan prolongaciones citoplasmáticas y presentan movimiento Browniano, lo que puede ser útil para distinguirlas de los restos celulares.
13. Calcular el número de plaquetas mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Plaquetas/mm}^3 = N \times \frac{100}{10(0.2\text{mm})^2 0.1\text{mm}}$$

N = Plaquetas contadas
 10 = Número de cuadros terciarios contados
 (0,2)² = Área de cada cuadro terciario

0,1 = Altura de la cámara
100= Dilución de la muestra

$$\text{Plaquetas/mm}^3 = N \times 2500$$

2500 = Factor

Este factor variará si cambia el número de cuadros contados.

14. Lavar el material empleado como se indico en la práctica para el recuento de eritrocitos.

Valores de referencia

Con este método directo de conteo, los límites de valores en un 95% de población sana son:

*Método Directo**

150 000 a 500 000/mm³

Método Indirecto

140 000 a 350 000/mm³ utilizando la tinción de Wright.

500 000 a 1 000 000/mm³ utilizando el Azul de Cresil violeta.

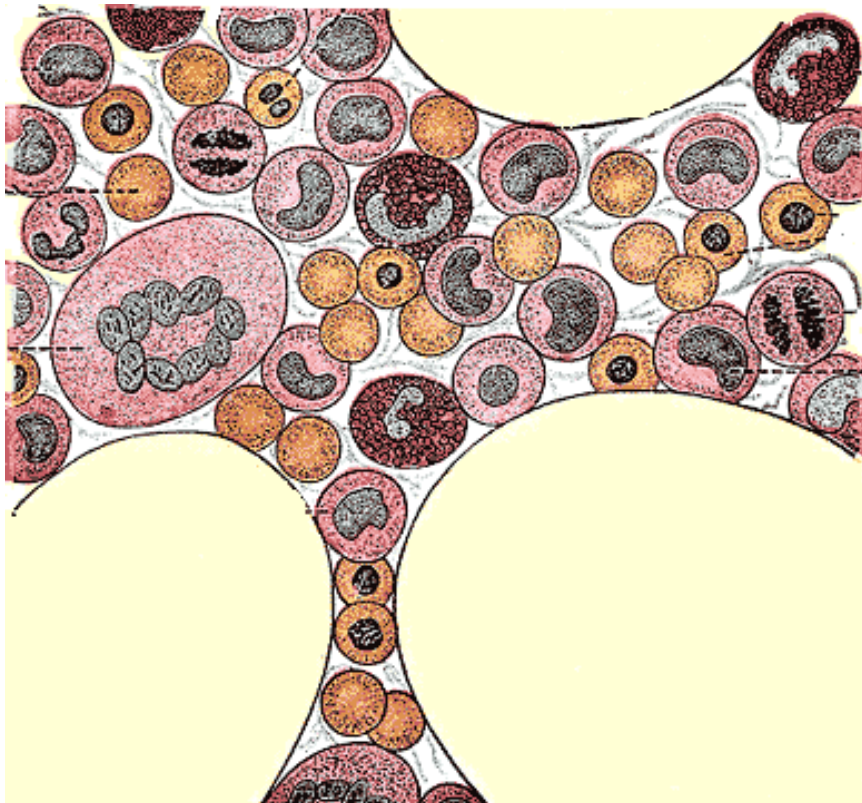
Actividades

- Ajustando el número de cuadrados considerados para contar por lo menos 100 plaquetas, definir el volumen cuantificado y su dilución para corregir el Factor en caso necesario.

* Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología (AMEH)

MÓDULO III

Hematopoyesis. El
origen de las células
sanguíneas



HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis se refiere al proceso de formación, maduración y especialización de todas las células sanguíneas. A lo largo de la vida los sitios de hematopoyesis cambian varias veces, desde el embrión hasta que se inicia la vida fetal y aun durante la vida adulta. En general se reconocen tres fases: Mesoblástica, hepática y medular o mieloide (Figura 14).

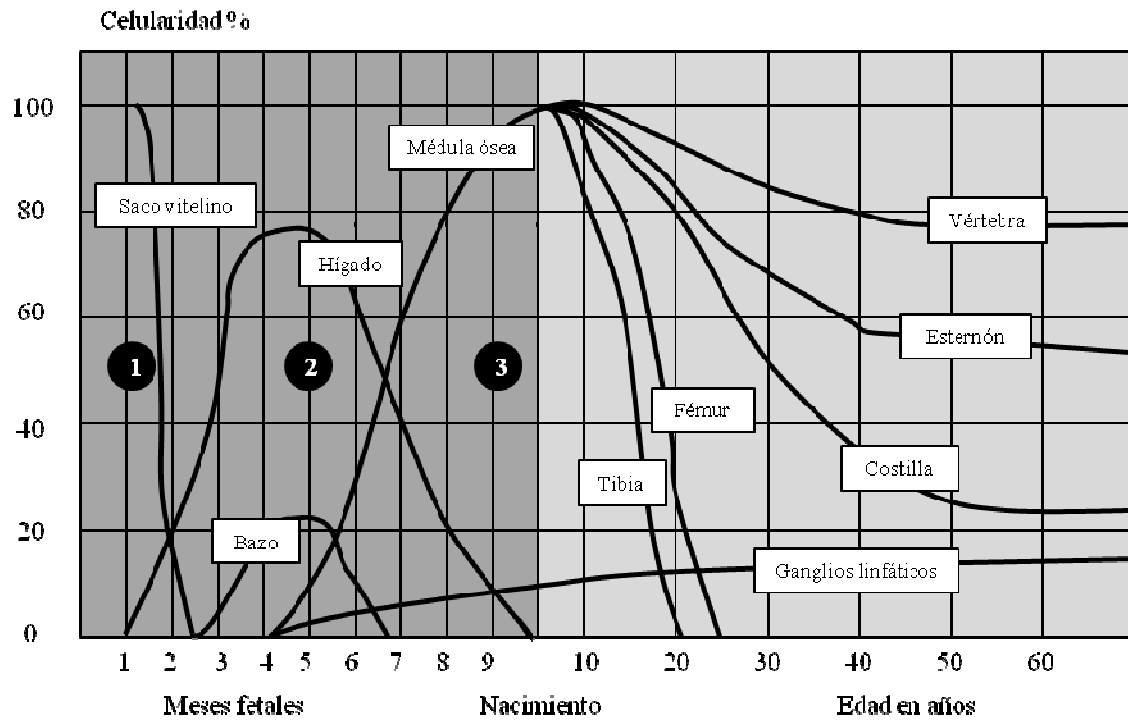


Fig. No. 14. Sitios de hematopoyesis a lo largo de la vida. 1) Mesoblástica; 2) Hepática y 3) Mieloide.

Periodo mesoblástico

Por varios años se afirmó que toda la hematopoyesis en el embrión se efectuaba en los islotes sanguíneos del saco vitelino, sin embargo estudios recientes probaron que en realidad sólo los eritroblastos se forman en este sitio y que las células troncales hematopoyéticas (stem cell) surgen de una fuente intraembrionaria cerca de la aorta. Las células troncales siembran el hígado fetal a las cinco semanas de gestación con lo que se termina esta fase y se inicia el periodo hepático. Durante este periodo es posible medir las Hb Portland, Gower I y Gower II.

Periodo hepático

Las células troncales que se implantan en el hígado cerca de la cuarta a quinta semana de gestación dan origen a los eritroblastos, a los granulocitos y a los monocitos; con esto se inicia la actividad hepática, la cual puede perdurar hasta dos semanas después del nacimiento. En este periodo se observa el comienzo del desarrollo megacariocítico, la

actividad esplénica eritropoyética, la granulopoyesis y la linfopoyesis, así como una ligera actividad hematopoyética en los ganglios linfáticos y el timo, debido a que su principal función es la especialización de los linfocitos. La hematopoyesis en el bazo es transitoria y esta concluye con la granulopoyesis. Durante esta fase son medibles los eritrocitos en todas sus etapas de maduración, los leucocitos y los megacariocitos, así como las hemoglobinas F, A₁ y A₂.

Periodo medular (mieloide)

Entre el cuarto y quinto mes de gestación la médula ósea comienza a tener actividad al iniciar la osificación y la formación de la médula ósea en el centro de los huesos. Rápidamente la actividad hematopoyética, cerca del sexto mes de gestación, se incrementa en los huesos generando una medula roja hiperplásica, siendo la fuente primaria de producción de células sanguíneas, y conservándose así durante toda la vida. En esta fase ya son medibles todas las estirpes celulares de la sangre, Hb F y Hb adultas, así como la eritropoyetina.

Médula ósea

Las células del mesénquima que dan origen a la médula ósea se diferencian en tres tipos de tejido:

- a) Reticular
- b) Adiposo
- c) Hematopoyético

Dependiendo de la proporción de estos tejidos, podemos clasificar a la médula ósea en dos tipos:

1. Médula roja: Alto contenido de tejido hematopoyético, está restringida a huesos planos en los adultos.
2. Médula amarilla: Mezcla de tejido adiposo y reticular, y comienza a ocupar los huesos largos a partir de los 5 y 7 años de edad. La médula amarilla en realidad no es tejido inservible, ya que esta sirve como reserva de grasa y tejido hematopoyético, además de que esta puede revertirse a médula roja en situaciones extremas, como, hemorragias severas o destrucción de médula ósea roja por agentes químicos o radiación.

Así la médula ósea juega un papel muy importante en el suministro constante de células sanguíneas de cualquier tipo, ya que no solo tiene el rol de fabricar células, sino también el de almacenarlas y así de esta manera mantener un equilibrio dentro del microambiente medular para evitar en la medida de lo posible que esta se vuelva hiperplásica.

Microambiente medular

Al medio intercelular, que está principalmente condicionado por el estroma se le denomina **microambiente medular**. El estroma de la médula ósea forma un microambiente favorable a la continua proliferación de las células hematopoyéticas. Está constituido por el sistema reticular (macrófagos y células reticulares) y el sistema vascular. Las células del

estroma producen una matriz extracelular de colágeno, glucoproteínas, proteoglicanos y otras proteínas.

Los macrófagos funcionan como una barrera sanguíneo-medular (macrófagos perisinusoidales) en los senos medulares y fagocitan células envejecidas y restos celulares; y como centro (macrófagos centrales) para la formación de las islas eritroblásticas.

Las células reticulares funcionan como soporte para la vascularización de la médula ósea, mediante la formación de fibras que se entrelazan entre sí para formar una red.

Este microambiente medular se encuentra regulado por una serie de sustancias químicas como citocinas o factores de crecimiento, hormonas y diversos tipos celulares.

Las principales propiedades de las citocinas que actúan sobre la hematopoyesis se muestran en la Tabla 5.

Como el nivel de todas las estirpes celulares está controlado por múltiples factores humorales y celulares, y que además se ajustan rápidamente según las necesidades, el organismo responde rápidamente ante cualquier situación que atente contra la integridad del organismo, por esta situación las células hematopoyéticas pueden clasificarse en dos compartimientos:

- a) Compartimiento de células madre.
- b) Compartimiento de diferenciación y maduración celular.

En el compartimiento de células madre se encuentran células con capacidad de autorrenovación y potencial de proliferación que las llevan a la capacidad de diferenciarse en los progenitores de todas las líneas celulares sanguíneas que forman parte del compartimiento de diferenciación y maduración celular. Las células del primer compartimiento son indistinguibles morfológicamente al microscopio, pero en la actualidad pueden diferenciarse por sus marcadores de membrana mediante la citometría de flujo, en comparación con las del segundo compartimiento, las cuales son distinguibles morfológicamente al microscopio desde su precursor más temprano.

En las Figuras 15 y 16 se muestra el desarrollo de la diferenciación celular a partir de la célula madre pluripotencial para la estirpe mieloide y linfoide respectivamente.

Tabla No. 5 Citocinas que intervienen en la regulación de la hematopoyesis.

<i>Citocina</i>	<i>Célula final</i>	<i>Características</i>
IL-1	Linfocitos T	Modula la acción de los leucocitos sobre la hematopoyesis
IL-2	Linfocitos T	Segregada por linfocitos T
IL-3	Neutrófilos y eosinófilos Monocitos-macrófagos Basófilos-mastocitos Eritrocitos	Segregada por linfocitos T, células endoteliales, mastocitos y células NK
IL-4	Linfocitos T Basófilos-mastocitos	Segregada por linfocitos T
IL-5	Linfocitos B Eosinófilos	Segregada por linfocitos T y mastocitos
IL-6	Basófilos-mastocitos Neutrófilos Megacariocitos	Segregada por linfocitos T y B, monocitos, células del estroma y osteoblastos
IL-7	Linfocitos B y T	Segregada por linfocitos T
IL-9	Linfocitos T Megacariocitos Eritrocitos	Segregada por linfocitos T
IL-10	Linfocitos T	
IL-11	Linfocitos B Megacariocitos Basófilos-mastocitos	
IL-12	Células NK	
Eritropoyetina	Eritrocitos	Sintetizada en el riñón, induce la proliferación de CFU-E
Trombopoyetina	Plaquetas	Sintetizada por el riñón y el hígado, induce la megacariopoyesis
FEC-GM	Neutrófilos y eosinófilos Monocitos-macrófagos Megacariocitos Eritrocitos	Estimula la producción de granulocitos y monocitos Segregada por linfocitos T, células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y osteoblastos
FEC-G	Neutrófilos	Estimula la producción y la función de los granulocitos
FEC-M	Monocitos-macrófagos	Estimula la producción y la función de los monocitos
C-kit-LIGANDO	Neutrófilos y eosinófilos Basófilos-mastocitos Megacariocitos	Estimula la célula madre pluripotencial

IL, Interleucina; **FEC-GM**, Factor estimulante de colonias granulomonocíticas; **FEC-G**, Factor estimulante de colonias granulocíticas; **FEC-M**, Factor estimulante de colonias monocíticas; **NK**, Células *natural killer*.

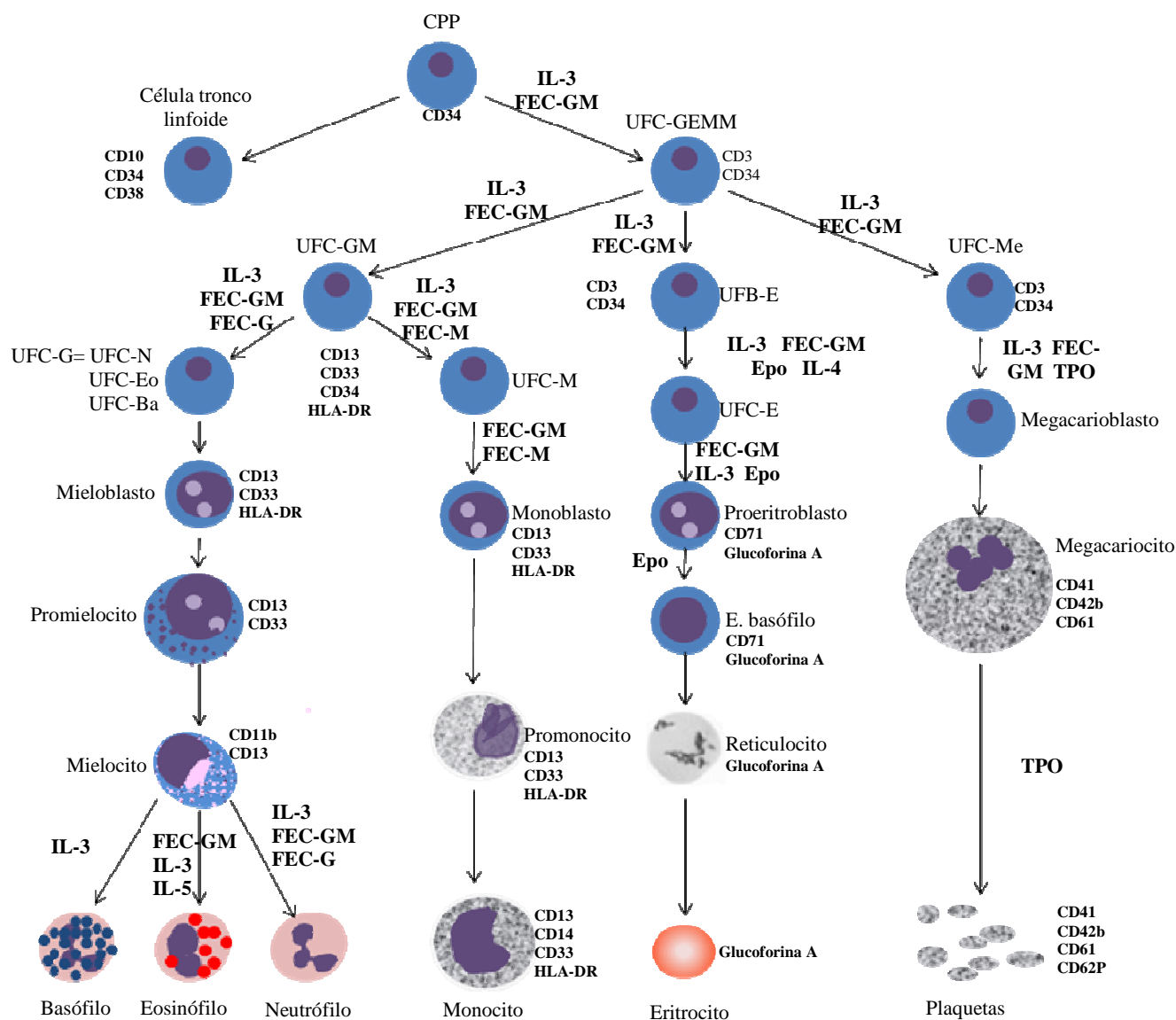


Fig. No. 15. Diferenciación mieloide, donde se muestran los marcadores de membrana que se expresan en cada célula. **CPP**, célula pluripotente; **UFC-GEMM**, unidad formadora de colonias eritrocíticas, granulocíticas, monocíticas y megacariocíticas; **UFC-GM**, unidad formadora de colonias granulomonocíticas; **UFC-G**, unidad formadora de colonias granulocíticas; **UFC-M**, unidad formadora de colonias monocíticas; **UFC-Me**, unidad formadora de colonias megacariocíticas; **UFB-E**, unidad formadora de brotes eritroides; **UFC-E**, unidad formadora de colonias eritroides; **IL**, interleucina **FEC-GM**, Factor estimulante de colonias granulomonocíticas; **FEC-G**, Factor estimulante de colonias granulocíticas; **FEC-M**, Factor estimulante de colonias monocíticas; **Epo**, eritropoyetina; **TPO**, trombopoyetina; **CD**, cumulo de diferenciación o marcador de membrana.

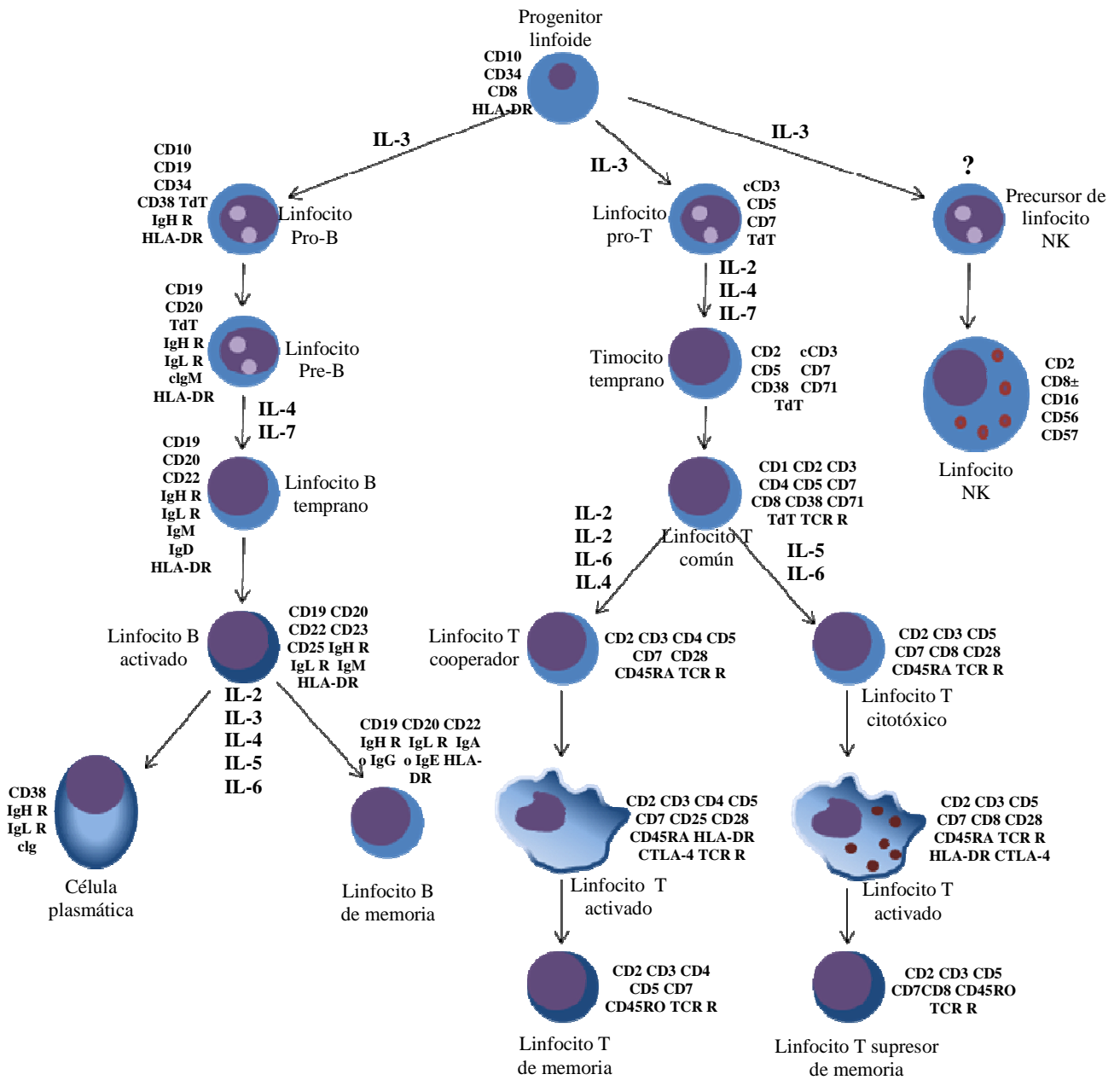


Fig. No 16. Diferenciación linfoide. Se muestran los principales marcadores de membrana que expresan los linfocitos en cada etapa de su maduración. **IL**, interleucina; **NK**, célula natural killer; **CD**, cumulo de diferenciación o marcador de membrana.

LÍNEA ERITROIDE

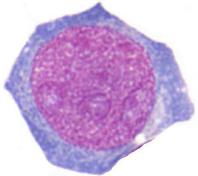
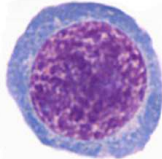
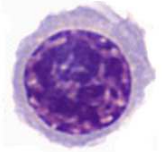
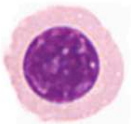


Las células de la línea eritroide tienen una proporción de cerca del 25% de todas las células en la médula ósea, guardando una relación gránulo/eritroide de 3:1. Todas las células hematopoyéticas se encuentran localizadas en forma de cordones cerca de los senos vasculares. Para el caso de los precursores eritroblásticos estos se encuentran contra la superficie externa de los capilares sinusoides, en grupos bien diferenciados llamados islas eritroblásticas (unidad anatómica de la eritropoyesis), formadas por uno o dos macrófagos centrales rodeados de eritroblastos; este macrófago proporciona los nutrientes requeridos para la maduración de los eritrocitos, los cuales van alejándose del cuerpo principal hacia la periferia de los macrófagos, conforme maduran. La maduración inicia a partir del proeritroblasto, el cual genera 2 eritroblastos basófilos, los cuales se dividen en 4 eritroblastos basófilos de 1ª generación, estos generan 8 eritroblastos basófilos de 2ª generación, que después de una última división mitótica se transforman en 16 eritroblastos policromatófilos, los cuales ya no se dividen y se transforman en eritroblastos ortocromáticos, que al expulsar su núcleo originan 16 reticulocitos, los cuales permanecen 48 a 36 horas en la médula ósea antes de salir a torrente sanguíneo y madurar hasta eritrocitos en un periodo de 24 horas.

Debe señalarse que, aunque cada proeritroblasto puede generar 16 eritrocitos, esto no sucede casi nunca en la realidad, debido a la existencia de un mecanismo de eritropoyesis ineficaz fisiológico, generando solo 8 eritrocitos.

Los cambios bioquímicos y morfológicos que ocurren en el interior de los eritrocitos durante su maduración (Tabla 6) se basan principalmente en la pérdida progresiva de la intensa basofilia del citoplasma y la compactación de la cromatina del núcleo hasta generar un núcleo picnótico que es expulsado del eritrocito por la formación de una especie de anillo constrictor, este anillo es formado por intensas contracciones del citoplasma desde la parte media de la célula hasta lograr arrancar el núcleo con un pequeño halo de citoplasma; o bien cuando la célula atraviesa un sinusoide medular. El núcleo expulsado es fagocitado por los macrófagos de la médula ósea.

La basofilia del citoplasma en las etapas más jóvenes del eritrocito se debe a la intensa producción de ribosomas para iniciar la síntesis de globinas, las cuales van ensamblando la hemoglobina a medida que madura el eritrocito y por tanto al aumentar su cantidad en el citoplasma disminuye la basofilia del mismo por la propiedad acidófila de la hemoglobina. El color grisáceo del citoplasma del eritroblasto policromatófilo se debe a que la cantidad de ribosomas y hemoglobina se encuentra equilibrada dando ese aspecto sucio a la célula. Ocurre algo similar con los reticulocitos, pues al perder el núcleo permanecen restos de ribosomas y retículo, que sólo son visibles con una tinción supravital de azul de metileno, sin embargo con la tinción de Wright obtienen un color grisáceo por contener material basófilo y acidófilo en su citoplasma.

Tabla No. 6. Características morfológicas y bioquímicas de las células de la línea eritroide

Nombre	Morfología	Tamaño (μm)	Núcleo	Nucléolos	Relación núcleo/citoplasma	Tinción citoplásmica
Proeritroblasto		20-25	Redondo, cromatina laxa	1-2	Muy elevada	Basófila (Azul)
Eritroblasto basófilo		16-18	Redondo, engrosamiento de cromatina	Ausentes	Elevada	Intensa basofilia (Azul intenso)
Eritroblasto policromatófilo		12-15	Redondo, cromatina irregular y burda	Ausentes	Baja	Basófila/Acidófila (Grisáceo)
Eritroblasto ortocrómico		10-15	Picnótico	Ausentes	Muy baja	Acidófila (Anaranjado)
Reticulocito		8-10	Ausente	Ausentes		Basófila/Acidófila (Grisáceo)
Eritrocito		7-7.5	Ausente	Ausentes		Acidófila (Rojo-rosa)

La observación de la morfología eritrocitaria en un extendido sanguíneo teñido con un colorante de Romanowsky es de gran utilidad para diagnosticar diversas patologías que suelen presentar alteraciones características en los eritrocitos. Las alteraciones en la morfología del eritrocito pueden clasificarse en cuatro grupos:

1. Alteraciones de tamaño (Tabla 7)
2. Alteraciones de la forma (Tabla 8)
3. Alteraciones de color o contenido de hemoglobina (Tabla 9)
4. Presencia de inclusiones (Tabla 10)

Tabla No. 7 Alteraciones de tamaño.

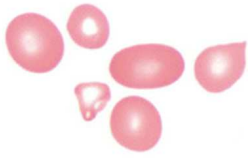

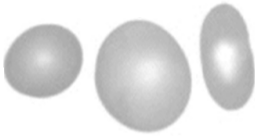
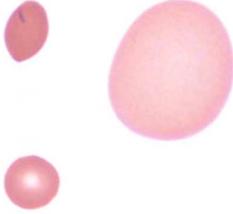
Anomalía	Descripción	Morfología	Estado patológico relacionado
Anisocitosis	Variación en el tamaño de los eritrocitos		*Inespecífica
Microcitosis	Eritrocitos con un VCM < 80fL y un diámetro inferior a 6µm		*Estados ferropénicos *Hipertiroidismo
Macrocitosis	Eritrocitos con un VCM > 100fL y diámetro superior a 9µm		*Déficit de ácido fólico y/o Vit. B ₁₂ *Aplasia medular *Anemia diseritropoyética *Alcoholismo *Hepatopatías crónicas *Mielodisplasias
Megalocitosis	Máxima expresión de la macrocitosis		*Anemia megaloblástica por déficit de folatos y vitamina B ₁₂

Tabla No. 8. Alteraciones de forma (Poiquilocitosis).

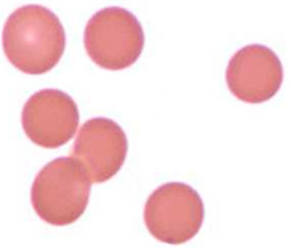

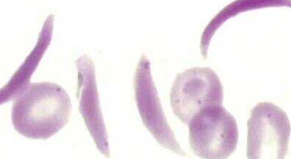
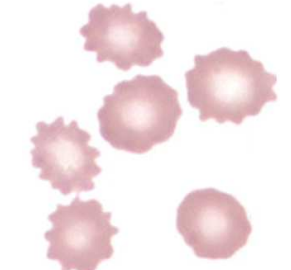
Anomalía	Descripción	Morfología	Estado patológico relacionado
Esferocitos	Eritrocito esféricos sin aparente palidez central		*Esferocitosis hereditaria (Alteración estructural de la espectrina, anquirina, banda 3 o de la proteína 4.2) *Anemia hemolítica autoinmune *Postransfucional
Codocitos ó dianocitos	Eritrocitos con exceso de superficie, por lo que tiene una zona central con mayor contenido de hemoglobina, dándole una aspecto de diana de tiro		*Hepatopatía obstructiva *Talasemias *Déficit de hierro *Posesplenectomía *Deficiencia de lecitina-colesterol aciltransferasa (LcAT) *Hemoglobina C
Drepanocitos	Eritrocitos en forma de hoz o media luna, por la polimerización de la hemoglobina S en medios hipóxicos		*Anemia falciforme por presencia de HbS
Equinocitos	Eritrocitos con proyecciones cortas de punta roma y distribución uniforme en la membrana del eritrocito		*Hepatopatías, uremia *Carcinoma de estomago *Úlcera péptica sangrante *Déficit de piruvatocinasa *Muestras conservadas por el descenso del adenosin trifosfato (ATP) intraeritrocitario

Tabla No. 8. Alteraciones de forma (continuación).

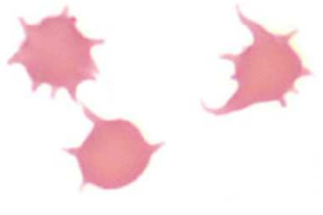



Anomalía	Descripción	Morfología	Estado patológico relacionado
Acantocitos	Eritrocitos con proyecciones largas e irregulares de distribución heterogénea en la superficie de la célula		<ul style="list-style-type: none"> *Abetalipoproteinemia *Hepatopatía alcohólica *Síndrome de *Malabsorción *Posesplenectomía
Dacriocitos	Eritrocitos con forma de lagrima o espejo por una proyección citoplasmática en uno de sus extremos		<ul style="list-style-type: none"> *Anemia megaloblástica *Talasemia *Anemia ferropénica *Anemia mieloptísica *Mielofibrosis
Esquizocitos	Fragmentos de eritrocitos, tienen formas diversas, pero prevalecen las formas triangulares		<ul style="list-style-type: none"> *Anemia hemolítica microangiopática *Coagulación intravascular diseminada (CID) *Vasculitis *Glomerulonefritis *Carcinomas *Quemaduras graves *Hemoglobinuria manifiesta *Prótesis valvulares
Estomatocitos	Eritrocitos con su zona central alargada en forma de boca		<ul style="list-style-type: none"> *Estomatocitosis congénita *Alcoholismo *Enzimopatías

Tabla No. 8. Alteraciones de forma (continuación).



Anomalía	Descripción	Morfología	Estado patológico relacionado
Keratocitos	Eritrocito con dos proyecciones en forma de cuernos, generados por la ruptura de vacuolas citoplasmáticas		*Anemia hemolítica microangiopática *Coagulación intravascular diseminada (CID) *Prótesis vasculares
Excentrocitos o células en blíster	Eritrocitos con distribución irregular de la Hb en uno de los extremos de la célula		*Anemias hemolíticas por químicos o medicamentos *Déficit de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa

Tabla No. 9. Alteraciones de color o contenido de hemoglobina (Anisocromia)

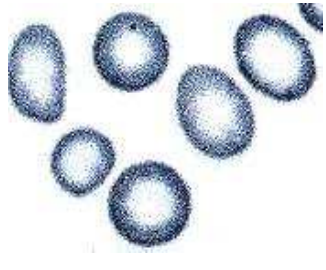
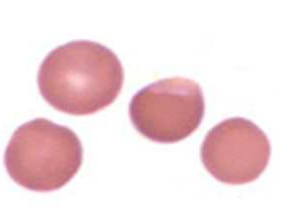
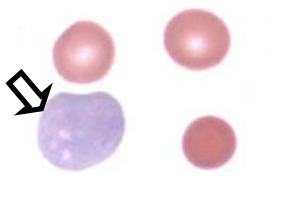
Anomalía	Descripción	Morfología	Estado patológico relacionado
Hipocromía	Eritrocitos que presentan un aumento del área central de palidez. Disminución de la concentración de Hb en el eritrocito.		*Ferropenias *Talasemias *Porfirias
Hipercromía	Termino erróneo ya que el eritrocito no contiene más hemoglobina, pero que por su tamaño y forma pierde el área central de palidez y se tiñe densamente.		*Sin relevancia alguna salvo en la esferocitosis o en algunas anemias hemolíticas autoinmunes.
Basofilia difusa o policromasia (reticulocitos)	Eritrocitos jóvenes que contienen restos de RNA, el cual le da una tonalidad rosa grisácea o azulosa.		*Anemias hemolíticas *Eritropoyesis acelerada

Tabla No. 10. Inclusiones eritrocitarias.


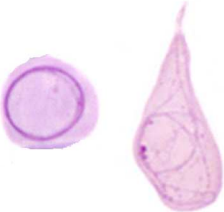
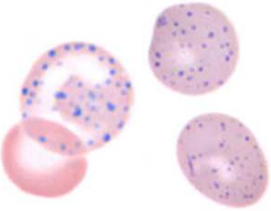
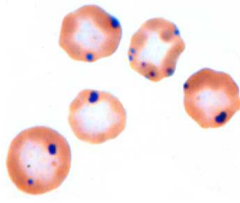
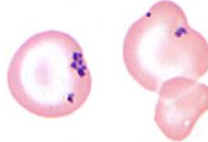

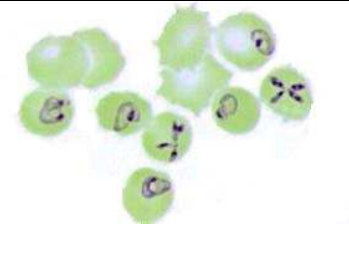
Anomalía	Descripción	Morfología	Estado patológico relacionado
Cuerpos de Howell-Jolly	Inclusiones redondas, pequeñas constituidas de ADN.		*Anemia por deficiencia de vitamina B ₁₂ y folatos *Asplenia funcional *Posesplenectomía
Anillos de Cabot	Restos de microtúbulos del huso mitótico que adquieren forma de ocho o anular.		*Intoxicación con plomo *Anemia megaloblástica *Anemia perniciosa *Anemia hemolítica
Punteado basófilo	Gránulos de forma redonda o irregular formados por agregados de ARN que se distribuyen en todo el eritrocito.		*Déficit de pirimidín-5' nucleotidasa *Intoxicación por plomo *Talasemias *Eritropoyesis ineficaz
Cuerpos de Heinz	Cuerpos redondos o irregulares constituidos por Hb desnaturalizada visibles solo con tinciones supravitales.		*Deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) *Estrés oxidativo *Síndrome de Hb inestable *Déficit de hexosa monofosfato
Cuerpos de Pappenheimer	Cuerpos pequeños que se aglomeran en la periferia del eritrocito (siderocito), se tiñen de azul negruzco con Wright y de verde con azul de Prusia (tinción supravital).		*Anemia sideroblástica *Talasemia *Hemocromatosis

Tabla No. 10. Inclusiones eritrocitarias (continuación).

Anomalía	Descripción	Morfología	Estado patológico relacionado
Parásitos	<i>Plasmodium:</i> <i>P. vivax</i> <i>P. falciparum</i> <i>P. malariae</i> <i>P. ovale</i>		*Malaria o paludismo
	<i>Babesia</i>		*Babesiosis

Fundamento

La observación microscópica de la morfología de los eritrocitos en un extendido de sangre teñido con un colorante tipo Romanowsky es indispensable para corroborar la patología sugerida por los resultados de la biometría hemática (BH), pues las anomalías en los eritrocitos disminuyen la deformabilidad de su membrana para el caso de las anemias hemolíticas, evidencian la baja producción de Hb para el caso de las anemias ferropénicas o la alteración de su síntesis para el caso de las talasemias, sugieren la deficiencia de enzimas indispensables para el metabolismo eritrocitario, esclarecen algunos casos de fiebre de origen desconocido, afirman la deficiencia de la hematopoyesis o simplemente indican que la muestra es vieja.

El estudio morfológico de los eritrocitos requiere de gran experiencia del analista para identificar el tipo de alteración eritrocitaria presente y así poder relacionar el resultado de la BH con la anomalía y establecer un diagnóstico, pues la misma alteración sugerirá el tipo de tratamiento.

Material e instrumentos

- Microscopio
- Preparaciones fijas de frotis sanguíneos teñidos con colorantes tipo Romanowsky

Reactivos

- Aceite de inmersión

Procedimiento

1. El profesor hará entrega de una preparación fija por equipo de trabajo.
2. Realizar la iluminación de Koehler para asegurarse de enfocar adecuadamente el microscopio.
3. Con el objetivo 100X observar la laminilla en busca de la alteración morfológica indicada en la etiqueta de la preparación.
4. Una vez localizada la anomalía, se dejará fija en el microscopio para que todo el resto del grupo observe las características morfológicas encontradas.
5. Observar y dibujar o fotografiar las células con alguna anomalía identificada (características de la célula y sus cambios en estructura, forma, etc.).
6. Finalizada la sesión limpiar las laminillas y entregarlas libres de aceite al asesor.
7. Limpiar el microscopio.

Actividades

- El reporte que se entregará consistirá en los dibujos o fotos de las células, la descripción y el nombre de lo que observe.

LÍNEA MIELOIDE (GRANULOCITOS MONOCITOS Y MEGACARIOCITOS)

Línea granulocítica

Las células de la granulopoyesis constituyen un 60-65% de los componentes citológicos medulares. Los cambios morfológicos evolutivos se resumen en:

- Reducción de la relación núcleo-citoplasma.
- Desaparición de los nucléolos.
- Maduración de la cromatina nuclear.
- Desaparición de la basofilia citoplasmática.
- Aparición de la granulación primaria azurófila a partir del promielocito. En esta etapa es imposible distinguir con tinciones de Romanowsky si la célula dará origen a un neutrófilo, un eosinófilo o un basófilo; sin embargo cada promielocito ya está comprometido hacia alguna de estas líneas celulares.
- Aparición de la granulación secundaria o específica (neutrófilo, eosinófilo y basófilo) a partir del mielocito. Reconocibles morfológicamente por tinciones de Romanowsky.

La primera célula de la serie granulopoyética identificable morfológicamente es el *mieloblasto*, el cual da origen al *promielocito*, y éste, al *mielocito*, *metamielocito*, *banda* y finalmente al *segmentado* (Tabla 11). Existen 4 etapas mitóticas entre el mieloblasto y el metamielocito, a partir de esta etapa ya no hay divisiones celulares. Por último, tiene lugar la indentación y segmentación nuclear al llegar a la etapa de metamielocito y segmentado, respectivamente. Todo el proceso de granulopoyesis ocurre entre 4 y 7 días.

Las principales alteraciones morfológicas que ocurren en la serie neutrófilica se engloban en 3 grupos:

1. Alteraciones nucleares (Tabla 12).
2. Alteraciones de la granulación (Tabla 13).
3. Inclusiones citoplasmáticas (Tabla 14)

Eosinófilos: Tienen un tamaño semejante a los neutrófilos y se caracterizan morfológicamente por contener en su citoplasma gránulos acidófilos. Tienen una forma redondeada, su tamaño oscila entre 0,5 y 1,5 μm , ocupan todo el citoplasma de la célula pero no se superponen en el núcleo y se tiñen de color anaranjado-pardo brillante con las tinciones panópticas, siendo muy frágiles. El núcleo en la etapa final de segmentado solamente alcanza la bilobulación simétrica y en una proporción muy escasa el eosinófilo puede llegar a formar tres lóbulos perfectamente simétricos unidos por finos puentes de cromatina.

Basófilos: La maduración de estas células aun no está muy bien esclarecida como en el caso de las otras células sanguíneas, sin embargo se sabe que derivan de una célula germinal comprometida hacia la granulopoyesis basófila. A diferencia de los basófilos tisulares o mastocitos, son células redondeadas cuyo tamaño oscila entre 10 y 13 μm . El núcleo de cromatina densa, posee generalmente dos o tres lóbulos unidos por puentes cromatínicos, en ocasiones difíciles de visualizar dada la presencia de las numerosas granulaciones basófilas propias de la célula. Su distribución en la célula es tan irregular que tapan el núcleo. La granulación basófila, cuyo tamaño varía entre 0,2 y 1 μm , adquieren un

color púrpuro a negro con las tinciones panópticas por el carácter ácido del contenido de sus gránulos (heparina, condroitinsulfato, histamina y mediadores vasoactivos e inmunomoduladores). La característica principal de los gránulos basófilos es su metacromasia con los colorantes azules (azul de metileno, azul de toluidina), con los que adquiere una tonalidad rojiza, mientras que el resto de las estructuras celulares se tiñen de color azul.

Tabla No. 11. Características morfológicas y bioquímicas de las células de la línea granulocítica.

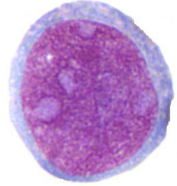
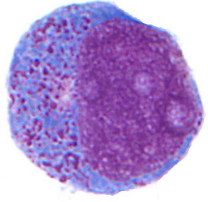
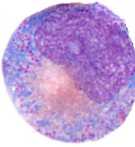
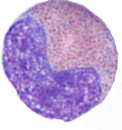
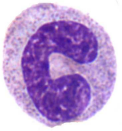
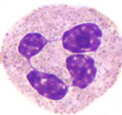
Célula	Morfología	Tamaño celular (µm)	Núcleo	Nucléolos	Tinción citoplásmica	Granulación visible
Mieloblasto		15-20	Redondo, cromatina laxa	2-3	Azul oscura	Ausente
Promielocito		16-25	Redondo u ovalado, cromatina menos laxa	1-3	Azul oscura	Azurófila (purpura)
Mielocito		12-18	Redondo, achatado en uno de sus extremos, cromatina condensada	Ausentes	Rosa claro con halos azules	Escasa azurófila y abundante específica (rosa)
Metamielocito		10-15	Arriñonado o forma de frijol, cromatina condensada	Ausentes	Rosado	Primordialmente específica
Banda		9-15	En forma de herradura, cromatina picnótica en los extremos	Ausentes	Rosado	Rojo-rosado
Segmentado: Neutrófilo		9-15	Segmentado, 2 a 4 lóbulos, cromatina muy condensada	Ausentes	Rosado	Rojo-rosado

Tabla No. 11. Características morfológicas y bioquímicas de las células de la línea granulocítica (Continuación)



Célula	Morfología	Tamaño celular (um)	Núcleo	Nucléolos	Tinción citoplásmica	Granulación visible
Segmentado: Basófilo		10-13	Bi o trilobulado, compacto, poco visible por la abundante granulación	Ausentes	Incolora, en ocasiones púrpura claro	Azul oscuro
Eosinófilo		12-14	Bilobulado, en ocasiones 3 lóbulos	Ausentes	Rosado	Rojo-naranja refringente

Tabla No. 12. Alteraciones nucleares de los neutrófilos

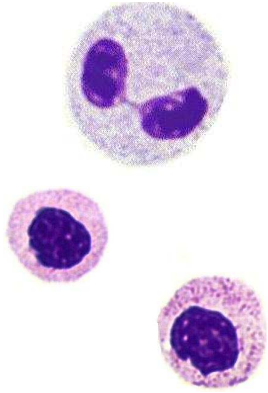
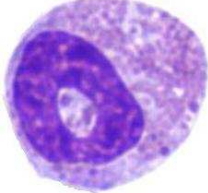
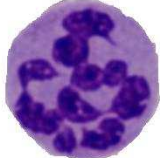
Anomalia	Descripción	Morfología	Estado patológico relacionado
Pelger-Huet Pseudo Pelger-Huet	Leucocito con núcleo bilobulado, denominadas células Quevedo, por el aspecto de lentes que adquiere el núcleo. Neutrófilo con núcleo redondo u ovalado.		*Alteración benigna *Infecciones bacterianas *Trastornos mieloproliferativos *Estados mielodisplásicos
Núcleo en anillo	Neutrófilos con núcleo en forma de dona		*Trastornos mieloproliferativos crónicos y mielodisplásicos *Leucemias agudas
Hipersegmentación nuclear	Núcleo con más de 5 segmentos en neutrófilos y más de 2 en eosinófilos		*Anemia megaloblástica por deficiencia de vitamina B ₁₂ y folatos

Tabla No. 13. Alteraciones en la granulación de los neutrófilos.

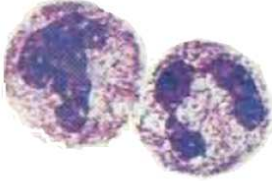




Anomalía	Descripción	Morfología	Estado patológico relacionado
Granulación tóxica	Neutrófilos con abundante granulación primaria		*Infecciones bacterianas *Quemaduras *Cáncer *Anemia aplásica *Intoxicaciones
Neutrófilos agranulares	Neutrófilos sin o con escasos gránulos y citoplasma rosa azuloso		*Trastornos mielodisplásicos y mieloproliferativos *Leucemias mieloides agudas *Deficiencia de mieloperoxidasa
Anomalía de Chediak Higashi	Leucocitos con gránulos gigantes, debido a la fusión de gránulos primarios y secundarios		*Trastorno autosómico recesivo
Bastones de Auer	Estructuras largas en forma de aguja debido a la fusión y cristalización de gránulos azurófilos, se tiñen de color azul rojizo. Presentes en Mieloblastos y promielocitos		*Leucemia mieloides aguda: M1 M2 M3 M4
Célula de Fagot	Promielocito con abundantes bastones de Auer		M3

Tabla No. 13. Alteraciones en la granulación de los neutrófilos (continuación).

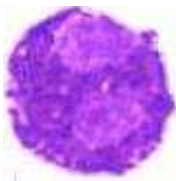
Anomalía	Descripción	Morfología	Estado patológico relacionado
Anomalía de Alder-Reilly	Gránulos gruesos rojo violáceo en los leucocitos, trastorno hereditario. Su aspecto en los neutrófilos es semejante al de las “granulaciones tóxicas” observadas habitualmente en las leucocitosis producto de infecciones, pero la presencia de gránulos en los linfocitos, a veces dentro de vacuolas, que en ocasiones adquieren forma de coma es sugestivo de esta anomalía		*Asociada a mucopolisacaridosis

Tabla No. 14. Inclusiones citoplasmáticas en los neutrófilos.


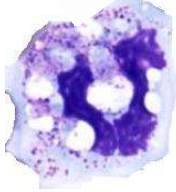

Anomalía	Descripción	Morfología	Estado patológico relacionado
Cuerpos de Döhle	Inclusiones de color gris-azuloso pálido cerca de la periferia, compuestas de agregados de retículo endoplásmico rugoso		*Sepsis por infecciones bacterianas, quemaduras *Síndromes mielodisplásicos y mieloproliferativos crónicos
Vacuolización tóxica	Áreas circulares o irregulares, claras y no teñidas		*Sepsis por infecciones bacterianas *Quemaduras *Estados tóxicos *Cáncer

Tabla No. 14. Inclusiones citoplasmáticas en los neutrófilos (continuación).

Anomalía	Descripción	Morfología	Estado patológico relacionado
Mórula	Inclusiones granulares, basófilas y de forma irregular		*Anaplasmosis o Erlichiosis granulocítica humana

Línea monocítica

La teoría actual enmarca que los monocitos sanguíneos y macrófagos libres y fijos provienen del monoblasto y promonocito. La maduración de esta línea celular se inicia a partir de la UFC-GM que pasa a monoblasto por acción de interleucinas y factores de crecimiento correspondientes a la maduración de los monocitos, los monoblastos son en aspecto similares a los mieloblastos. Los monoblastos son células grandes con núcleo excéntrico que contienen uno o dos nucléolos visibles. Luego del proceso mitótico y maduración el monoblasto se transforma en un promonocito, teniendo tamaño similar al blasto. El promonocito presenta poca granulación, la cromatina ya no es tan laxa como para mostrar nucléolos pero si lo suficiente para evidenciar una serie de pliegues y muescas que se generan en el núcleo (característica principal), el citoplasma suele ser irregular y de gran tamaño. Conforme avanza su maduración alcanza la etapa de monocito en sangre periférica. Al monocito se le describe como la célula más grande del torrente sanguíneo, pero no siempre es así. Tiene citoplasma abundante que puede o no contener vacuolas, el núcleo tiene forma arriñonada con cromatina reticular y pequeños grumos; el contenido y tamaño granular varían de manera considerable con la maduración de la célula. A esta etapa se le considera transicional ya que cuando el monocito abandona la sangre y se interna en los tejidos se transforma en macrófago, que dependiendo del tejido en que se encuentre este adquiere un nombre y características específicas. Los macrófagos son células de gran tamaño, pleomorficos y muy móviles (Tabla 15).

Tabla No. 15. Características morfológicas y bioquímicas de las células de la línea monocítica.

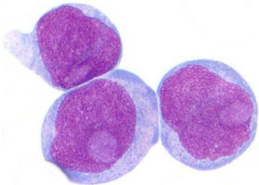
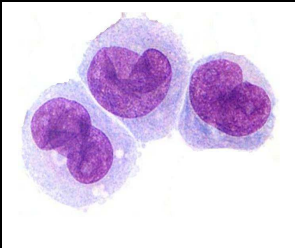
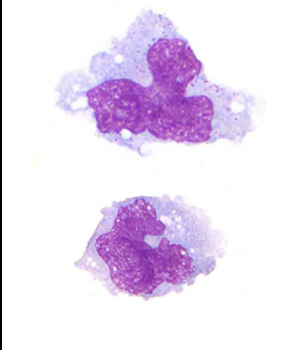
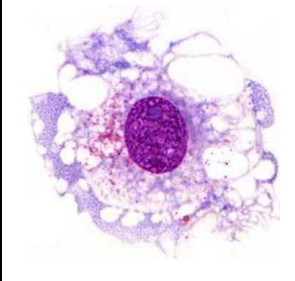
Célula	Morfología	Tamaño celular (µm)	Núcleo	Nuécleolos	Citoplasma
Monoblasto		15-25	Grande y redondo, cromatina laxa	1-2	*Abundante y de carácter basófilo *Agranular

Tabla No. 15. Características morfológicas y bioquímicas de las células de la línea monocítica (continuación)

Célula	Morfología	Tamaño celular (µm)	Núcleo	Nucléolos	Citoplasma
Promonocito		12-20	Irregular, con pliegues o muescas, cromatina fina	0-1	*Abundante, azul grisáceo *Granulación azurófila fina
Monocito		15-30	Reniforme o irregular, de gran tamaño y cromatina grumosa	Ausentes	*Abundante, irregular y grisáceo *Fina granulación azurófila *Aspecto de vidrio esmerilado o arenoso
Macrófago		15-85	Redondo u ovalado	Variable	*Abundante, granuloso, vacuolado e irregular

Línea megacariocítica

La producción de plaquetas presenta características únicas que no presentan las demás células hematopoyéticas, pues mientras que las demás estirpes se dividen por mitosis hasta obtener aproximadamente 16 células maduras a partir de un precursor los megacariocitos sufren una mitosis incompleta, es decir, tienen división nuclear pero carecen de telofase creando así un núcleo multilobulado, a este proceso se le llama endomitosis. Cada lóbulo del núcleo que se forma es diploide (2N), por lo tanto los megacariocitos siempre son poliploides.

La célula inicial en la secuencia de maduración es el megacarioblasto (MK1), el cual posee similitud con los demás blastos o de morfología linfoide, tienen escaso citoplasma y de carácter basófilo, poseen un solo núcleo que evidencia de 2 a 6 nucléolos.

Al aumentar el volumen del citoplasma y al alcanzar un diámetro de 80µm el megacarioblasto se transforma en un promegacariocito (MK2). En esta etapa se pueden observar tres tipos de gránulos (densos, alfa y lisosómicos) dispersos en todo el citoplasma

y el núcleo ya es lobulado. Las líneas citoplásmicas de demarcación se hacen notorias hasta la tercera etapa, denominada megacariocito basófilo (MK3) por la coloración azulosa que adquiere el citoplasma. La etapa final es el megacariocito maduro (MK4), el cual se encarga de liberar segmentos citoplasmáticos denominados proplaquetas (plaquetas gigantes), las cuales se van fragmentando conforme avanzan hacia torrente sanguíneo dando paso a fragmentos pequeños llamados plaquetas, que intervienen en los procesos hemostásicos del organismo (Tabla 16).

Tabla No. 16. Características morfológicas y bioquímicas de las células pertenecientes a la línea megacariocítica


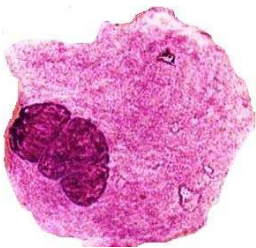
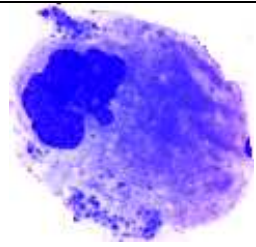
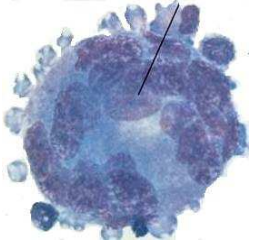
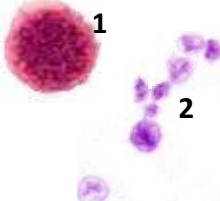
Célula	Morfología	Tamaño celular (µm)	Morfología nuclear	Citoplasma
Megacarioblasto		10-15	Redondo, similar al de un linfocito, presencia de nucléolos	*Escaso y de carácter basófilo
Promegacariocito		50-80	Lobulado, 2-4 (4N-8N)	*Basófilo y presencia de granulación azurófila
Megacariocito basófilo		50-80	Lobulado , 4-16 lóbulos (8N-32N)	*Muy basófilo Abundante granulación azurófila
Megacariocito maduro		20-60	Lobulado , 4-16 lóbulos (8N-32N)	*Rosáceo y con demarcación citoplásmica (campos plaquetarios) *Abundante granulación

Tabla No. 16. Características morfológicas y bioquímicas de las células pertenecientes a la línea megacariocítica (continuación)

Célula	Morfología	Tamaño celular (μm)	Morfología nuclear	Citoplasma
Proplaquetas(1) y plaquetas(2)		2-4 y hasta 7 o más en las proplaquetas	Núcleo ausente	*Grisáceo y con abundante granulación azurófila en el centro


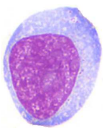
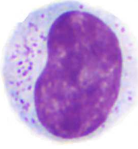

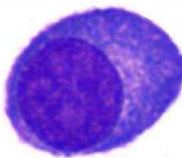
LÍNEA LINFOIDE

Los linfocitos son las células sanguíneas con la línea de maduración más compleja, pues dependiendo la estirpe a la que pertenezcan seguirán su maduración en el bazo, en el timo o en la misma médula ósea, por lo cual para comprender mejor su maduración los órganos en los que maduran se clasifican en órganos linfáticos primarios (médula ósea y timo) y secundarios (bazo, placas de Peyer, anillo de Waldermyer y ganglios linfáticos), pues cada estirpe linfoide se clasifica a su vez en diversas subpoblaciones. La proporción que ocupan dentro de la médula ósea junto con los monocitos y macrófagos es de aproximadamente 15%.

Todos los linfocitos provienen de una célula madre comprometida hacia la línea linfoide (UFC-L), de esta se desprenden los precursores condicionados a linfocitos T que maduran en el timo y los precursores condicionados a linfocitos B que maduran en médula ósea. Los distintos tipos de linfocitos no se pueden diferenciar morfológicamente, para ello se emplea la citofluorometría y anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de membrana específicos en cada subpoblación de linfocitos, sin embargo por métodos de tinción convencionales pueden observarse tres estadios morfológicos de maduración: linfoblasto, prolinfocito y linfocito maduro.

El linfoblasto es una célula pequeña o mediana (10-18 μ m) con núcleo redondo u ovalado que abarca casi todo el citoplasma, tiene cromatina laxa que puede mostrar uno o más nucléolos. El citoplasma es escaso y presenta basofilia proporcional a la cantidad de ARN presente. En el cambio de linfoblasto a prolinfocito ocurren cambios sutiles, como, una cromatina levemente mas condensada sin ocultar el nucléolo, una disminución del núcleo y un cambio en el grosor de la membrana nuclear. El cambio a linfocito sanguíneo es más evidente, pues disminuye el núcleo, el cual posee cromatina condensada, el citoplasma es más abundante y levemente basófilo, en algunos casos con pequeños gránulos azurófilos y por lo general adoptan una forma redondeada. En sangre periférica podemos identificar morfológicamente tres tipos de linfocitos: pequeño, mediano y grande (Tabla 17).

Tabla No. 17. Variaciones morfológicas de los linfocitos

Célula	Morfología	Tamaño celular (µm)	Núcleo	Cromatina	Citoplasma
Linfocito pequeño		6-10	Redondo, oval, con muesca o estirado	Condensada, irregular, no definida	*Escaso a moderado, de incoloro a azul claro
Linfocito mediano		11-14	Redondo	Variable	*Moderado, de incoloro a matices de azul claro, pocos gránulos azurófilo
Linfocito grande granular		15-20	Redondo, oval, con muesca, estirado, por lo general no plegado	Variable, condensada, reticular	*Moderado a abundante, de incoloro a basófilo en ocasiones con gránulos grandes
Linfocito basófilo (activado)			Redondo	Condensada	*Moderado muy basófilo
Célula plasmática			Redondo excéntrico	Muy vasta, condensada, definición clara de la paracromatina	*Muy abundante, con intensa basofilia y una zona clara cerca del núcleo

Los linfocitos también pueden clasificarse por su función inmunitaria, en linfocitos B y T diferenciables únicamente por citofluorometría, pero en algunos casos es posible establecer ciertas relaciones con la morfología. Esta diferenciación inmunitaria se hace evidente en la etapa de prolinfocito.

Los linfocitos B adquieren su competencia inmunológica en la médula ósea, donde se desencadena la reorganización de los genes de inmunoglobulinas (Ig) citoplasmáticas y de superficie (IgD e IgM). A medida que avanza el proceso madurativo se van desarrollando nuevas subpoblaciones con nuevos antígenos. Cuando el linfocito B recibe un estímulo antigénico aparecen las IgG, IgA e IgE, transformándolo en una célula plasmática completando así su total diferenciación. La función principal de esta clase de linfocitos es la respuesta inmunitaria humoral.

Los linfocitos T adquieren su competencia inmunológica en el timo, sin embargo su descripción es más compleja, ya que los marcadores de membrana aparecen, desaparecen y reaparecen durante el desarrollo de la célula y al contrario de los linfocitos B que adquieren su maduración total al exponerse a un estímulo antigénico, los linfocitos T sufren una regresión a la etapa de linfoblasto para producir linfocinas y adquirir memoria inmunológica, cuando sufren un segundo estímulo por este mismo antígeno se genera entonces su diferenciación total transformándose en linfocitos activados productores de perforinas. Los linfocitos T al igual que los B desarrollan subpoblaciones dependiendo de los marcadores expresados en su membrana, siendo los más comunes los linfocitos T CD4 o cooperadores/supresores y los linfocitos T CD8 o citotóxicos.

Existe otra población de linfocitos denominada NK o células asesinas naturales que se encargan de la destrucción de otras células del organismo contribuyendo al recambio celular normal y el control de la proliferación. Estos linfocitos son los de menor porcentaje y pueden llegar a distinguirse morfológicamente por su tamaño y cierta granulación azurófila en el citoplasma (linfocito grande granular).

Fundamento

La evaluación morfológica de los leucocitos en los extendidos sanguíneos teñidos con un colorante de tipo Romanowsky es indispensable para diferenciar una gran cantidad de padecimientos relacionados con la maduración celular, infecciones bacterianas y víricas o inclusive parasitarias, anomalías congénitas o de proliferación celular en síndromes mieloproliferativos o mielodisplásicos, gracias a que los organelos de cada célula poseen distintos compuestos que les confieren una gama de colores específicos para su diferenciación morfológicamente en la mayoría de los casos.

La información que se obtiene al examinar una extensión de sangre periférica adquiere gran importancia ya que del análisis visual de las células blancas se puede valorar:

- a) Hallazgo de anomalías de maduración nuclear y citoplasmática.
- b) Características generales de tamaño y color.
- c) Hallazgos de trastornos leucocitarios y su delimitación.
- d) Presencia de cuerpos de inclusión y su asociación a causas viables.

La evaluación cualitativa de las características morfológicas de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas, por medio del examen de extendidos de sangre puede contribuir en mucho al diagnóstico de afecciones de la sangre.

Material e instrumentos

- Preparaciones fijas de leucocitos
- Microscopio

Reactivos

- Aceite de inmersión

Procedimiento

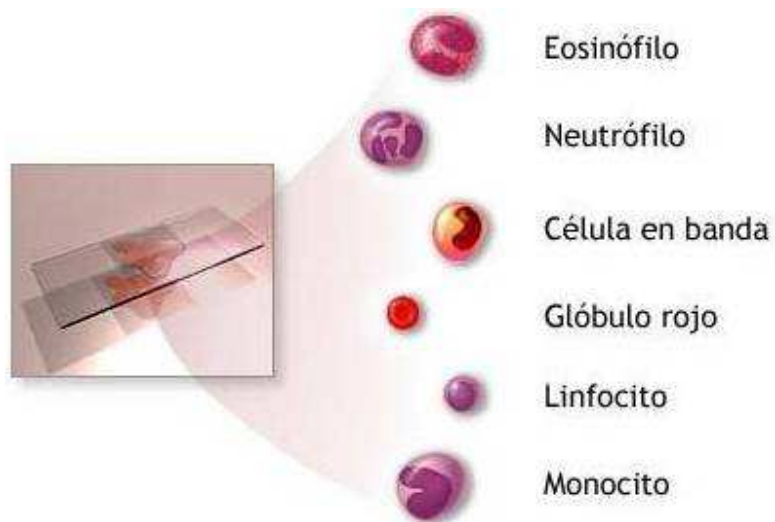
1. El profesor hará entrega de una preparación fija por equipo de trabajo.
2. Realizar la iluminación de Koehler para asegurarse de enfocar adecuadamente el microscopio.
3. Con el objetivo 100X observar la laminilla en busca de la alteración morfológica indicada en la etiqueta de la preparación.
4. Una vez localizada la anomalía, se dejará fija en el microscopio para que todos los integrantes de los equipos observen la morfología de las células.
5. Dibujar o fotografiar las células con alguna anomalía.
6. Finalizada la sesión limpiar las laminillas hasta retirar todo el aceite de inmersión y dejarlas secar al aire, limpiar con una gasa o algodón el exceso de aceite. Entregarlas limpias al asesor. Finalizada la sesión, regresar las laminillas limpias y libres de aceite al asesor.
7. Limpiar el microscopio.

Actividades

- El reporte que se entregará consistirá en los dibujos o las fotos de las células, la descripción y nombre de lo que se observó.

MÓDULO IV

Fórmula blanca y pruebas especiales



FROTIS DE SANGRE PERIFERICA Y CUENTA DIFERENCIAL

La morfología de las células sanguíneas es el complemento de la biometría hemática. Sólo a través del examen cuidadoso de un frotis sanguíneo se pueden obtener indicios adicionales de la naturaleza de la anemia, leucemia, etc., como cambios en la forma y características de tinción de los eritrocitos y leucocitos, y aparición de células inmaduras o anormales.

El recuento diferencial puede definirse como estudio cualitativo de los eritrocitos, plaquetas y leucocitos de cada tipo: polimorfonucleares, linfocitos y monocitos, junto a un estudio de la edad y anomalías morfológicas de los mismos. Otra definición para el concepto de *diferencial* es que representa el porcentaje de distribución de los diferentes tipos de leucocitos y el estudio cualitativo de los mismos sobre una extensión teñida.

Exploración clínica de la Hematología

En la práctica clínica, el estudio de la médula ósea reviste una importancia de primer orden en múltiples enfermedades hematológicas y no hematológicas. En efecto, en algunos procesos como la leucemia aguda, el diagnóstico reside precisamente en la identificación de los blastos, los cuales pueden estar o no, en sangre periférica, por lo cual la información citológica es imprescindible. Disponemos fundamentalmente de las siguientes exploraciones:

- a) Aspirado de médula ósea (citología medular o mielograma).
- b) Biopsia medular (histopatología).
- c) Gamagrafía medular.
- d) Ferrocinética.
- e) Cultivo de progenitores hematopoyéticos.

Examen de las extensiones de sangre teñidas

Se ha dicho, y con mucha razón, que un estudio inteligente de la extensión teñida, junto con el cálculo de la concentración hemoglobínica, proporcionará el 90% de toda la información diagnóstica que pueda obtenerse de un examen hematológico.

Un frotis (como vulgarmente se le conoce) no es otra cosa más que un película de sangre o cualquier otro líquido biológico extendido sobre la superficie de una laminilla de vidrio, el cual se seca, se fija y se tiñe ulteriormente con un colorante que nos permita observar y diferenciar la morfología de todas las células presentes en ese extendido. El frotis sanguíneo debe realizarse dentro de las 3 primeras horas de haber obtenido la sangre para evitar anormalidades por efecto de almacenamiento de la muestra.

Preparación de los frotis sanguíneos

Para su preparación puede utilizarse el método de los cubreobjetos o el de los portaobjetos (Figura 17).

El método de los cubreobjetos ofrece la ventaja de obtener una distribución más homogénea de la sangre, sin embargo son frágiles y difíciles de teñir, por lo cual hoy es un método poco utilizado por no poderse emplear métodos automatizados para su preparación. El método de los portaobjetos es el de mayor aceptación en todos los laboratorios, pues

estos por su mayor resistencia pueden rotularse y almacenarse por un tiempo indefinido. Hoy en día existen equipos automatizados que preparan extendidos sanguíneos de buena calidad que permiten al analista ahorrar tiempo y optimizar su trabajo dentro del laboratorio, ejemplos de estos aparatos son el Miniprep® y el Ne-Alfa® de Sysmex. También hay aparatos para tinción de laminillas un ejemplo de estos es el Hema-tek® de SIEMENS.

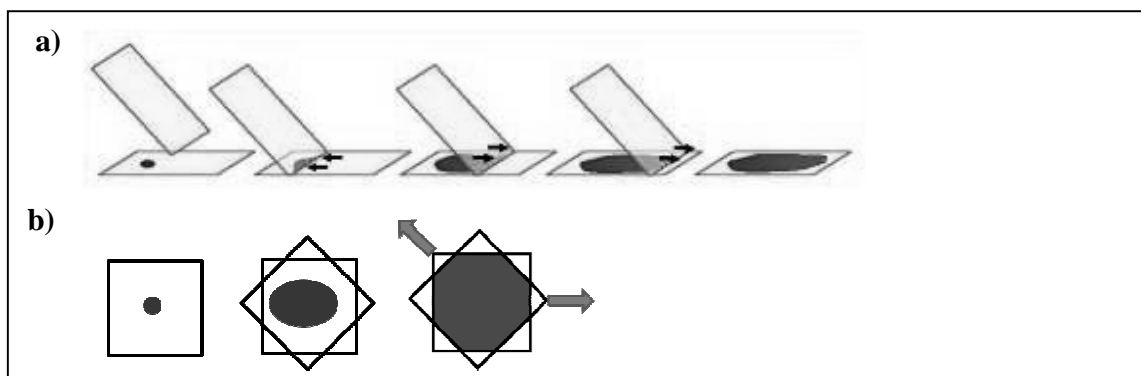


Fig. No. 17. Esquema de las técnicas para preparar frotis de sangre. a) Técnica de los portaobjetos; b) Técnica de los cubreobjetos.

Fijación

La extensión sanguínea, una vez seca, debe someterse a un proceso de fijación para poder ser teñida mediante el colorante de elección. Este paso es omitido cuando se emplea la tinción de Wright, pues el colorante ya contiene un fijador a diferencia de otros colorantes. La fijación tiene lugar en el primer minuto cuando se aplica un colorante sin diluir. Con los colorantes acuosos hay que emplear agentes químicos o calor antes de la aplicación del colorante.

Colorantes

La mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares. Muchos colorantes utilizados con frecuencia son moléculas cargadas positivamente (cationes) o negativamente (aniones).

- **Colorantes ácidos:** Son moléculas cargadas negativamente (aniones) y se combinan con los constituyentes celulares cargados positivamente, tales como las proteínas. También son llamados basófilos, el ejemplo más común es la eosina.
- **Colorantes básicos:** Son compuestos cationicos con afinidad por los constituyentes celulares cargados negativamente, tales como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos; a estos colorantes también se les conoce como acidófilos. Ejemplo de colorantes acidófilos son el azul de metileno.
- **Colorantes policromáticos:** Tradicionalmente, las tinciones se han logrado mediante el uso de colorantes que con frecuencia derivan de la anilina (tinciones tradicionales o clásicas). Los colorantes policromáticos son el resultado de la combinación de un colorante básico (azul de metileno) y un colorante ácido (eosina), que al reaccionar entre sí generan un compuesto de propiedades distintas a

los compuestos iniciales. También se le conoce como, colorante de tipo Romanowsky, ejemplos de este tipo de colorante son: el colorante de Wright, Giemsa, Leishman, May-Grünwald, y son una mezcla de dos colorantes primarios, el azul de metileno y la eosina.

Tinciones especiales

- **Tinciones fluorescentes:** emplean colorantes (fluorocromos) que se fijan a las células y que, cuando son estimulados por una luz ultravioleta, emiten una radiación visible, de un color característico. Los fluorocromos más utilizados en esta clase de tinciones son el naranja de acridina y el rojo neutro.
- **Tinciones citoquímicas:** demuestran la presencia, más o menos abundante, o la ausencia de determinadas enzimas, localizadas en el interior de los gránulos citoplasmáticos de los leucocitos.
 - **Fosfatasa alcalina:** Se hace reaccionar la fosfatasa alcalina leucocitaria con alguna solución de fosfato de naftol, de dicha reacción se libera naftol y por acción de una sal de diazonio (depende de la casa comercial) se produce un pigmento insoluble y visible en el interior de los leucocitos con actividad de fosfatasa alcalina.

$$\begin{array}{l} \text{Fosfato de naftol} + \text{fosfatasa alcalina leucocitaria} \longrightarrow \text{naftol} \\ \text{Naftol} + \text{sal de diazonio} \longrightarrow \text{pigmento insoluble colorido} \end{array}$$
 - **Peroxidasa leucocitaria:** Las peroxidasa son catalasas lisosomales que transfieren el hidrógeno desde un donador adecuado (anteriormente bencidina) a un peróxido (peróxido de hidrógeno). Empleando 4-cloro-2-naftol se oxida y se transforma en un colorante insoluble color pardo negruzco, que se emplea como indicador de la correspondiente actividad de peroxidasa.
 - **Ácido Peryódico de Schiff:** El ácido peryódico oxida los glicoles hasta aldehídos, los cuales se hacen reaccionar con el reactivo de Schiff (mezcla de pararrosanilina y metabisulfuro de sodio) para generar un compuesto rojizo, por la liberación de una pararrosanilina adicional que tiñe los elementos celulares que contienen glicol.
 - **α -Naftil esterasa:** Las esterasas son un grupo de enzimas que actúan sobre sustratos de manera muy selectiva. En este procedimiento se hace reaccionar la esterasa leucocitaria con acetato de naftilo α en presencia de una sal de diazonio estable para formar depósitos de color intenso en los sitios de actividad enzimática.

$$\begin{array}{l} \text{Acetato de naftilo } \alpha + \text{esterasa leucocitaria} \longrightarrow \text{naftol} \\ \text{Naftol} + \text{sal de diazonio} \longrightarrow \text{deposito colorido intenso} \end{array}$$
 - **Cloroacetato esterasa:** Mismo principio que en la α -Naftil esterasa, pero en este caso se hace reaccionar la esterasa con un cloroacetato de naftol.

$$\begin{array}{l} \text{Cloroacetato de naftol} + \text{esterasa leucocitaria} \longrightarrow \text{naftol} \\ \text{Naftol} + \text{sal de diazonio} \longrightarrow \text{deposito colorido intenso} \end{array}$$
- **Tinciones supravitales:** son tinciones de células vivas, pues se requiere que el colorante entre en las estructuras para poder hacerlas visibles (Tabla 18).

Tabla No. 18. Colorantes supravitales más comunes en Hematología para evidenciar inclusiones no teñidas o poco visibles con el colorante de Wright

Colorante	Inclusión
Azul de cresilo brillante, nuevo azul de metileno, verde brillante	Cuerpos de Heinz
Azul de cresilo brillante, nuevo azul de metileno	Mallas de retículo (reticulocitos)
Azul de Prusia	Cuerpos de Pappenheimer

Tinción del frotis (tinción de Wright)

Durante el proceso de maduración de los colorantes de Romanowsky, el azul de metileno se oxida (desmetilación) dando lugar a colorantes secundarios. Los más importantes son los azules de metileno (principalmente azul A, azul B y azul C), de color azul brillante, que son también colorantes metacromáticos. Cuando las moléculas de un colorante metacromático están desordenadas en una solución, el color observado es el natural (azul), sin embargo, cuando dichas moléculas se ordenan en el espacio muy juntas unas de otras forman un color distinto (Rojo). Durante la tinción, si el azul de metileno tiñe una sustancia cuyos sitios de unión con el colorante están ordenados en el espacio y muy cercanos unos a otros (sustancias metacromáticas), las moléculas quedan también ordenadas y se produce el fenómeno de metacromasia, es decir, la sustancia se tiñe de color violeta a rojo, dependiendo del grado de orden de las moléculas.

La tinción de Wright es la más empleada en los laboratorios clínicos para la diferenciación morfológica de todas las células hematopoyéticas normales y anormales.

Características de observación celular

Las tinciones de tipo Romanowsky nos permite distinguir los siguientes aspectos morfológicos de las células:

1. Forma y dimensiones de las células sanguíneas.
2. Forma del núcleo y de la cromatina (color púrpura).
3. Citoplasma de los linfocitos (distintas tonalidades de azul).
4. Citoplasma de los monocitos (color gris).
5. Granulación de los PMN:
 - a. Granulación primaria (color púrpura)
 - b. Neutrófilos: de pardo a rosa
 - c. Eosinófilos: de rojo a naranja
 - d. Basófilos: azul oscuro
6. Forma y color de los eritrocitos (rosa pálido a naranja).
7. Basofilia difusa (color gris-azuloso).
8. Inclusiones en eritrocitos y leucocitos.
9. Variación en la concentración de Hb en los eritrocitos.
10. Morfología plaquetaria.
11. Células inmaduras.

Examen crítico del frotis

Cuando se revisa un frotis hay que tener en cuenta la confirmación de algunas anomalías eritrocitarias que los equipos automatizados no siempre pueden detectar, tales anomalías pueden ser:

1. **Anisocitosis:** Puede valorarse tras la observación de los eritrocitos en varios campos del frotis, con lo cual puede estimarse el promedio de eritrocitos normocíticos, microcíticos o macrocíticos. El grado de anisocitosis se valora en cruces (1-3).
2. **Poiquilocitosis:** Valoración de la forma del eritrocito (discoidal, ovalado, esférico, espinoso, etc.). Esta observación es de gran valor diagnóstico y por ende debe especificarse. El grado de valoración es similar al de la anisocitosis (1 a 3 cruces).
3. **Concentración de hemoglobina:** Valoración de la intensidad del color en el eritrocito para determinar si estos son normocrómicos, hipocrómicos o hiperocrómicos (relevante sólo en esferocitosis). Se valora en cruces (1 a 3).
4. **Policrómasia o anisocromía:** Valoración de la uniformidad en la coloración de los eritrocitos. El grado de anisocromía debe valorarse a la par de la concentración de hemoglobina y se reporta en cruces (1 a 3).
5. **Inclusiones:** Se valora la presencia de restos nucleares (Howell-Jolly o anillos de Cabot) o intracelulares (punteado basófilo, Pappenheimer), así como la presencia de eritrocitos parasitados (Plasmodium o Babesia). Cada una de estas inclusiones suelen indicar una gama de procesos patológicos específicos de cada una.
6. **Eritroblastos:** En condiciones normales no deben observarse en un frotis sanguíneo, sin embargo pueden presentarse en algunos casos. Cuando se observan eritroblastos debe valorarse la cantidad de estos mediante una cuenta diferencial y de esta forma evaluar si existe una interferencia significativa en la cuenta total de leucocitos.

Además de detectar estas posibles anomalías en un frotis, también se puede hacer una cuenta de plaquetas por el *método indirecto*, asegurándose de que las plaquetas estén uniformemente distribuidas. Se observa también si las plaquetas son de tamaño normal o si carecen de granulación.

Cuenta diferencial

Una definición sencilla de lo que es una cuenta diferencial es: *expresar en porcentajes la cantidad de cada stirpe de leucocitos que hay presentes en la sangre*; por lo tanto se puede considerar como un análisis cuantitativo y cualitativo simultáneamente.

Cuando se realiza una cuenta diferencial manual se debe tomar en cuenta lo siguiente:

- a) Contar como mínimo 100 células, lo ideal sería realizar una cuenta de 200 células, sin embargo por la optimización de tiempo 100 células es un número aceptable. La cantidad de células a contar puede variar dependiendo de la cantidad absoluta de leucocitos, del criterio y habilidad del analista, tomando en cuenta que entre menos células se cuenten el error aumenta y entre más células sean contadas el error disminuye. Por ejemplo si se tiene una cuenta absoluta de <3000 leucocitos/ μL sería preferible hacer una cuenta diferencial en 50 leucocitos, pero si por el contrario se

tiene una cuenta absoluta de más de 100×10^3 leucocitos/ μL la cuenta diferencial podría aplicar hasta en 500 leucocitos.

- b) Los distintos tipos de leucocitos (monocitos, linfocitos o PMN) deben reportarse en porcentajes relativos. Las células inmaduras también deben reportarse.
- c) La presencia de eritroblastos puede generar interferencia en la cuenta total de leucocitos, por lo cual su cuantificación debe ser independiente de la cuenta diferencial y se debe mencionar el porcentaje de eritroblastos en el reporte de la cuenta diferencial.
- d) Observar la morfología de los leucocitos para identificar cualquier anomalía.

Fundamento

Debido a que la eosina y el azul de metileno reaccionan a los cambios de pH de los distintos componentes celulares, los que poseen carácter básico fijan en mayor medida la eosina (colorante ácido), mientras que los que poseen carácter ácido fijan mejor el azul de metileno (colorante básico) y nos dan una gama de colores en las células hemáticas que permiten clasificar a los leucocitos polimorfonucleares en base a sus propiedades tintoriales en neutrófilos, eosinófilos y basófilos; diferenciar a los mononucleares (monocitos y linfocitos) por la coloración de su citoplasma, y además permiten observar con mayor facilidad las anomalías morfológicas en los mismos.

Material e instrumentos

- Sangre venosa con EDTA.
- Porta objetos limpios y desengrasados.
- Microscopio
- Aceite de inmersión

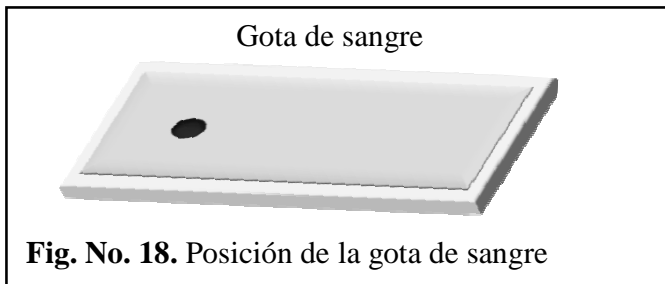
Reactivos

- Colorante de Wright
- Amortiguador para colorante de Wright (pH de 6.8 ó 7.2).
- Agua

Procedimiento

1. Recolectar 2 mL de sangre venosa con anticoagulante en un tubo con tapón lila.
2. Homogeneizar perfectamente bien la sangre por inversión del tubo (5-10 veces).
3. Los portaobjetos se limpian y se preparan de la siguiente manera:

Los portaobjetos pueden lavarse con etanol o con agua y jabón, luego con mucha agua caliente y limpia (que no se dejará enfriar hasta que se haya quitado todo el jabón), y por último, con agua destilada. Posteriormente se secan y se pulen con un trapo limpio sin pelusa. A partir de entonces se manejarán tocando sólo los bordes. Los portaobjetos secos también pueden guardarse en una caja de Petri limpia y seca. **Nota: Cuando los portaobjetos son nuevos estos solamente deben limpiarse con una gasa o un paño limpio.**



4. Depositar una pequeña gota de sangre procedente de una punción cutánea, de una jeringa o del tubo colector, aproximadamente a un cuarto de distancia de uno de los extremos del portaobjetos como se muestra en la Figura 18.

5. Para extender la sangre se utiliza el borde fino de otro portaobjetos o bien se emplean portaobjetos especiales. El portaobjetos que extiende la sangre debe mantenerse en un ángulo de 30-40° con respecto al portaobjetos horizontal. El borde

del portaobjetos que efectúa la extensión se desplaza hacia la gota de sangre hasta que entre en contacto con la misma como se muestra en la Figura 19 (1 y 2).

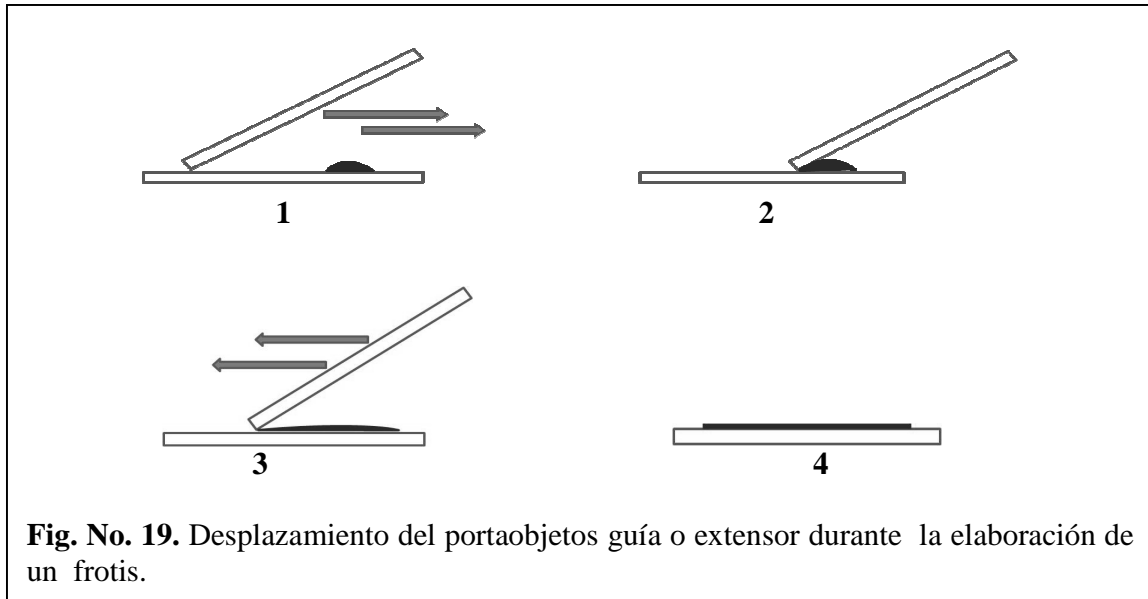


Fig. No. 19. Desplazamiento del portaobjetos guía o extensor durante la elaboración de un frotis.

- La gota de sangre se extiende rápidamente por capilaridad a lo largo del borde del portaobjetos extensor. Desplazando éste lentamente en dirección contraria, se realiza una fina extensión porque la sangre sigue por detrás del borde del portaobjetos extensor como se muestra en la Figura 19 (3 y 4).

Las variaciones del grosor de la extensión se consiguen cambiando el tamaño de la gota de sangre, el ángulo del portaobjetos extensor y la velocidad de la extensión

Cuando el frotis se realiza por este procedimiento debe tener entre 3 y 4 cm, y presenta tres zonas diferenciadas, en las que la morfología eritrocitaria puede variar y la distribución de leucocitos es diferente (Figura 20).

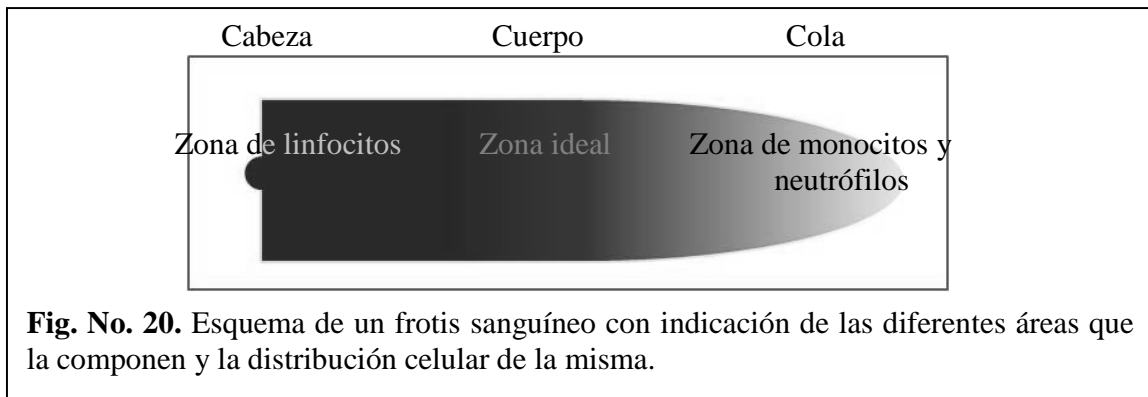


Fig. No. 20. Esquema de un frotis sanguíneo con indicación de las diferentes áreas que la componen y la distribución celular de la misma.

- Después de que el frotis está seco, se escribe el nombre del paciente y la fecha en la parte más gruesa de la extensión.
- Se coloca el frotis sanguíneo seco en una rejilla o en un puente de tinción.
- En caso de que el colorante no tenga un fijador, el frotis debe cubrirse totalmente con alcohol etílico o metílico absoluto durante 1 ó 2 minutos, para fijar la muestra.

10. El portaobjetos seco se cubre totalmente con el colorante de Wright y se deja un minuto. Este tiempo varía según el lote del colorante de Wright utilizado y se determina mediante diversos ensayos.
11. Sobre la extensión se vierte una cantidad igual de solución amortiguadora (pH 6.8 ó 7.2). Hay que procurar que la mezcla de colorante y amortiguador no se derrame. Soplar ligeramente con un piceta o un bulbo sobre la preparación para mezclar el buffer y el colorante. La aparición de un brillo verde metálico indica que la tinción es correcta.
12. Después de que la mezcla del colorante y del amortiguador ha actuado durante 3 a 6 minutos (es preciso probar el tiempo ideal para cada lote de colorante) se elimina de la superficie del portaobjetos, colocando éste horizontalmente bajo un chorro fino de agua destilada. Con esto se evita que la preparación se deteriore por el precipitado.
13. A continuación se lava el portaobjetos con agua corriente (o solución salina fisiológica) durante un breve periodo de tiempo, si se aprecia un exceso de coloración azulada se efectúa un lavado posterior. Procurar que el lavado no sea muy extenso para no decolorar la preparación y evitar que los gránulos de los basófilos se disuelvan.
14. Dejar que se seque al aire, manteniéndola inclinada o verticalmente sobre un papel absorbente o una gasa.
15. Eliminar el exceso de colorante que existe en el otro lado del portaobjetos, frotando con una gasa empapada en alcohol.
16. Colocar el portaobjetos en la platina del microscopio, y se hace la observación con lente de inmersión en aceite directamente.
17. Al efectuar el recuento, se sigue el método cruzado que se indica en la Figura 21.

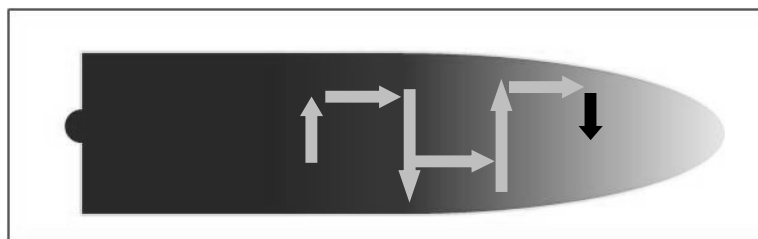


Fig. No. 21. Patrón a seguir para realizar la cuenta diferencial en un frotis. La cuenta diferencial se hace de este modo con el objeto de incluir las áreas central y periférica del frotis.

18. El término “cuenta diferencial” se refiere a la distribución porcentual de los distintos tipos de leucocitos. El procedimiento usual consiste en contar 100 leucocitos, clasificándolos como leucocitos PMN neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos. Los leucocitos jóvenes o inmaduros se deberán hacer contar con todo cuidado.

Como la cuenta diferencial tiene un valor relativo es necesario también reportar la cuenta diferencial en valores absolutos, para poder apreciar una patología real en la cantidad de cada tipo leucocitario. Para obtener los valores absolutos se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Valor absoluto en mm}^3 = \frac{\text{Cuenta total de leucocitos} \times \% \text{ de estirpe leucocitaria}}{100}$$

Valores de referencia*:

Tabla No. 19. Valores de referencia porcentuales y absolutos para la cuenta diferencial leucocitaria.

Tipo de leucocito	%	Absolutos
Neutrófilos	40 - 85	1500 – 7000
Bandas	0 - 11	0 - 800
Linfocitos	12 - 46	1000 - 4200
Monocitos	1 - 13	100 - 800
Eosinófilos	0 - 7	0 - 200
Basófilos	0 - 3	0 - 20

Actividades

- Realizar la cuenta diferencial.
- En base a los resultados obtenidos de su cuenta diferencial (porcentual), calcular los valores absolutos de leucocitos, considerando que el conteo total de leucocitos hubiese resultado de:
 - a) 7 500 leucocitos/mm³
 - b) 25 000 leucocitos/mm³

* Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología (AMEH)

CUENTA DE RETICULOCITOS

Hay cuatro mediciones estándares de laboratorio útiles para el recambio eritrocítico: la cuenta de reticulocitos, la proporción granulo/eritroide medular, la bilirrubina sérica y la concentración de deshidrogenasa láctica sérica (DHL). De éstas, la cuenta de reticulocitos es la más cuantitativa y también la más práctica para la evaluación clínica del recambio eritrocítico.

El reticulocito es un eritrocito inmaduro que contiene RNA ribosomal. Su nombre deriva del aspecto reticulado que muestra en las coloraciones supravitales debido a la persistencia en el citoplasma de restos de organelos. Son células de volumen algo mayor que los eritrocitos maduros, presentes en sangre periférica en una proporción entre 0,5 y 1,5 % de los eritrocitos ($45-75 \times 10^9/L$) y constituyen un excelente indicador de la capacidad regenerativa de la médula ósea eritroide, de forma que en las anemias arregenerativas son escasos o nulos, y en las regenerativas son abundantes.

Para usar la cuenta de reticulocitos como índice en la producción de eritrocitos es necesario hacer dos correcciones. La primera es la conversión del porcentaje a cifras absolutas circulantes:

Reticulocitos absolutos = % reticulocitos x recuento eritrocitos

En condiciones normales, la cifra es de 50 000 reticulocitos/ μL . De otra manera, el porcentaje de reticulocitos se corrige por el cambio en el hematócrito o la hemoglobina en base a las siguientes fórmulas:

$$\text{Índice de reticulocitos} = \% \text{reticulocitos} \times \frac{\text{Hto del paciente}}{\text{Hto normal}}$$

Ó

$$\text{Índice de reticulocitos} = \% \text{reticulocitos} \times \frac{\text{Hb del paciente}}{\text{Hb normal}}$$

Por ejemplo, un individuo que tiene 3% de reticulocitos y una hemoglobina de 7,5 g/dL (Hto 23%) tiene un porcentaje absoluto de reticulocitos de 1,5, como se muestra a continuación:

$$\text{Porcentaje absoluto de reticulocitos} = 3\% \times \frac{7,5}{15} = 1,5\%$$

Ó

$$\text{Porcentaje absoluto de reticulocitos} = 3\% \times \frac{23}{45} = 1,5\%$$

La segunda corrección se relaciona con la maduración del reticulocito y su conducta ante la estimulación de eritropoyetina. Después de que el eritroblasto en desarrollo pierde su núcleo para formar un reticulocito medular, pasan cuatro días para que desaparezca el RNA ribosómico de la célula en desarrollo. Por lo general, tres de estos días la célula permanece en la médula y el cuarto día en la circulación. En el individuo normal, el porcentaje de reticulocitos encontrados en la circulación refleja la producción de un día. No obstante, con el aumento en la estimulación con eritropoyetina, se acorta la maduración medular y el tiempo de maduración de los reticulocitos en la sangre se alarga (Figura 22). El reticulocito circula por dos o tres días antes de perder su característica de teñirse de azul. Para obtener una medición real de la producción de eritrocitos, es necesario reconocer si los reticulocitos han sido desplazados de la médula y corregir por el tiempo más prolongado que han permanecido en la circulación.

Como regla general, la corrección por el desplazamiento reticulocitario se basa en la gravedad de la anemia. A esta corrección se le denominada índice de producción de reticulocitos (IPR), ya que existe una relación inversa, aproximadamente lineal, entre el hematocrito y el período de maduración periférica de los reticulocitos:

$$\text{IPR} = \frac{\text{Reticulocitos del paciente} \times \text{Hto del paciente}}{\text{Período de maduración en días} \times \text{Hto normal}}$$

Un IPR >3 indica aumento de actividad eritropoyética medular (anemia regenerativa), mientras que un IPR <2 indica escasa actividad eritropoyética (anemia arregenerativa).

Por ejemplo, para una cuenta de 9% de reticulocitos en un individuo con una hemoglobina de 7,5 g/dL (Hto 23%) se tiene un IPR de 2,25:

$$\text{IPR} = \frac{9\% \times 7,5}{2(\text{corrección por tiempo de maduración}) \times 15} = 2,25$$

El uso del segundo factor de corrección supone un aumento predecible de la eritropoyetina en respuesta a la anemia. Este incremento será menor de lo esperado si hay un defecto en la estimulación de la eritropoyetina, como se observa en pacientes con insuficiencia renal o un estado inflamatorio. Será mayor de lo esperado si el paciente está hipóxico por otras razones.

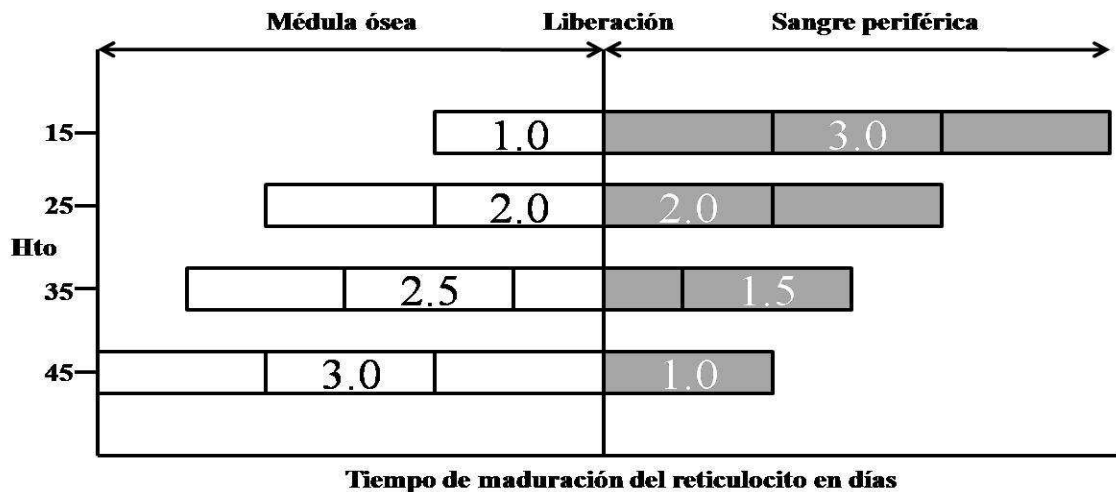


Fig. No. 22. Correlación de hematócrito con el tiempo de maduración del reticulocito. Al aumentar el grado de anemia el tiempo de maduración del reticulocito se desplaza hacia la derecha y pasa más tiempo madurando en sangre periférica.

En caso de anemia intensa, el número de reticulocitos circulantes suele ser superior al que corresponde al grado de regeneración eritroblastica. Ello obedece a que la anemia se acompaña siempre de un estímulo eritropoyético compensador, que facilita una salida precoz de reticulocitos desde la médula a la sangre periférica, y un acortamiento de su período de maduración intramedular, lo que supone un aumento del período de maduración periférica (Tabla 20). Este fenómeno se caracteriza por la aparición en el examen morfológico de la extensión de sangre de eritrocitos grandes (macroцитos) y tonalidad azulada (policromasia). Los reticulocitos se determinan anotando la cifra observada al contar 1000 eritrocitos en un frotis sanguíneo. Con frecuencia, los resultados se expresan en porcentaje (cifra por 100 eritrocitos), esto provoca a veces una falsa impresión del número

de nuevos eritrocitos que son producidos por el paciente anémico. Por ejemplo, un paciente con un recuento eritrocitario de 2 millones y una cifra de reticulocitos no corregida del 5% no está formando nuevos eritrocitos a una velocidad de cinco veces mayor que lo normal, de esta manera un recuento (%) elevado de reticulocitos puede dar una impresión errónea de la producción real de eritrocitos, en estos casos se emplea el IPR, y por consiguiente si se efectúa un recuento eritrocitario, lo más apropiado es que los reticulocitos se expresen en cifras absolutas.

Tabla No. 20. Relación entre la respuesta reticulocitaria y el grado de anemia.

Hematocrito (L/L)	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15
Niveles de Hemoglobina (g/L)	150	133	117	110	83	66	50
Recuento de reticulocitos (%)	1	2	5	10	15	20	30
Recuento de reticulocitos corregido (%)	1	1,8	4	7	8,3	9	10
Tiempo de maduración estimado	± 1 día			± 2 día			3 días
Índice de reticulocitos	1	2	5	5	7,5	10	10

El mejor colorante para el recuento manual de reticulocitos es el nuevo azul de metileno, pues tiñe más intensamente el material reticular que el azul de cresilo brillante, que varía su intensidad de tinción entre muestras. Un buen sustituto del nuevo azul de metileno es el azur B, el cual es fácil de conseguir y con un alto grado de pureza. Otro tipo de tinción que puede emplearse para visualizar los reticulocitos son los métodos de fluorescencia con naranja de acridina, sin embargo es poco útil para la rutina pues la fluorescencia comienza a degradarse en cuanto la preparación se expone a la luz. Hoy en día la combinación de la fluorescencia con la citometría de flujo permite automatizar el recuento de reticulocitos para la rutina.

Fundamento

Cuando se tiñen con azul de cresilo brillante, azul de metileno u otros colorantes supravitales que penetran en la célula viva antes de la fijación, se precipita el ácido ribonucleico y aparece como una red azul que da el nombre de reticulocito a la célula.

Con respecto a la policromatofilia, la solución de tinción puede ser azul de cresilo brillante en solución salina o su alcohol con o sin tinción de Wright como contraste. También puede utilizarse la tinción con nuevo azul de metileno. El material basófilo de los eritrocitos jóvenes toma el colorante supravital y adquiere el aspecto de retículo azulado. En los reticulocitos jóvenes aparecen múltiples granos y líneas; en los reticulocitos viejos solamente hay algunos gránulos azulados.

Material e instrumentos

- Sangre venosa anticoagulada.
- Portaobjetos desengrasados.
- Cubreobjetos desengrasados.
- Microscopio.
- Aceite de inmersión.

Reactivos

- Azul de cresilo brillante (hidrosoluble) 1% o nuevo azul de metileno al 1%.

Procedimiento

1. Recolectar sangre venosa en un tubo con EDTA.
2. Homogeneizar perfectamente bien la sangre con el anticoagulante por inversión del tubo (mínimo 10 veces).
3. En un tubo de 12 x 75 mm, colocar 2 ó 3 gotas de colorante, añadir de 6 a 8 gotas de sangre anticoagulada. Si se emplea sangre capilar, es aconsejable aumentar la cantidad de colorante para evitar la coagulación. Mezclar perfectamente.
4. Se incuba a 37°C durante 10 a 20 minutos. No se debe sobrepasar de este tiempo.
5. Mezclar bien la suspensión. Se preparan dos frotis en la forma habitual ya descrita, quizá un poco más delgada. No se aconseja una contratinción con Romanowsky.
6. Colocar el portaobjetos en la platina del microscopio. Se hace la observación con el objetivo de 100X.
7. Se escoge una zona del frotis en donde no haya superposición de eritrocitos. Los reticulocitos se observan como eritrocitos con material granulofilamentoso de color azul oscuro y los eritrocitos maduros se observan de color azul-verdoso.
8. Como base del cálculo, por lo menos deben examinarse 1000 eritrocitos. Estos deben examinarse en varias partes de la extensión. Contar el número de reticulocitos que se encuentran en 1000 eritrocitos.
9. Informar el % de reticulocitos de acuerdo con el cálculo siguiente:

$$\% \text{ de Reticulocitos} = \frac{\text{No. de reticulocitos contados} \times 100}{\text{No. total de eritrocitos}}$$

10. Si se requiere informar el número de reticulocitos en mm^3 se hace un cuidadoso recuento de eritrocitos y se multiplica su número por el total de los reticulocitos encontrados en 1000 eritrocitos, dividiendo el resultado entre 1000:

$$\text{Reticulocitos/mm}^3 = \frac{\text{No. Reticulocitos encontrados} \times \text{No. eritrocitos por mm}^3}{1000}$$

Valores de referencia

	Valor relativo (%)	Valor absoluto ($\times 10^9/\text{L}$)
Recién nacido	3,2 – 6,0	110 – 330
Niños y adultos jóvenes de 4 a 19 años	0,2 – 2,2	25 – 89
Adultos (20-50 años)	0,5 – 1,5	24 – 84

BIOMETRÍA HEMÁTICA O CITOMETRÍA HEMÁTICA

El resultado del análisis hematológico, que forma lo que llamamos *Biometría Hemática (BH)*, *Hemograma* o *Citometría Hemática*, es una parte esencial de la descripción clínica de casi todas las enfermedades. Un número, una distribución normal de las células y una concentración de hemoglobina normal en la sangre tienen tanta importancia como constantes fisiológicas para poder diagnosticar una posible enfermedad. Para un diagnóstico diferencial, a menudo es útil saber que ciertas enfermedades no producen notables cambios en la sangre. Respecto a las enfermedades de la sangre y los órganos hematopoyéticos, cabe señalar que muchas veces el hallazgo de anomalías en los parámetros hematológicos más usuales (descenso de la cifra de hemoglobina, leucocitosis, VSG acelerada) no traduce la existencia de una enfermedad de la sangre, sino de otro órgano o sistema que, de forma secundaria, produce tales alteraciones.

Las enfermedades de la sangre pueden afectar, básicamente, elementos celulares (eritrocitos, leucocitos, plaquetas), plasmáticos (inmunoglobulinas, factores de la coagulación), órganos hematopoyéticos (médula ósea) y órganos linfoides (ganglios linfáticos, bazo). Debido a las diversas funciones que tales elementos llevan a cabo (transporte de oxígeno, defensa frente a infecciones, coagulación), sus trastornos darán lugar a una serie de manifestaciones que pueden englobarse en diversos *síndromes*. En la actualidad, una forma nada infrecuente de presentación de las enfermedades hematológicas es la práctica, por motivos diversos, de análisis que –de forma totalmente inesperada– ponen de manifiesto una anomalía que conduce al diagnóstico de una enfermedad todavía asintomática.

Los resultados de la BH se utilizan en el diagnóstico, pronóstico y vigilancia de la terapéutica clínica. Por tanto, es evidente, que la Hematología Clínica abarca un campo casi tan amplio como el del diagnóstico médico.

En la actualidad con el empleo de equipos automatizados la BH se integra de cerca de 15 parámetros, medidos todos en tiempos record (30-40 segundos) y con eliminación de las fuentes de error, estos parámetros se clasifican en 2 grupos:

- a) Fórmula roja: Recuento de eritrocitos y plaquetas, determinación de Hb, Hto, índices eritrocitarios y amplitud de distribución eritrocitaria (ADE) en los equipos automatizados.
- b) Fórmula blanca: Recuento total de leucocitos y cuenta diferencial

Para algunos laboratorios una BH sólo incluye 6 parámetros (recuento de eritrocitos, Hb, Hto, índices eritrocitarios, recuento de leucocitos y cuenta diferencial) y para otros, estos mismos 6 parámetros más la cuenta de plaquetas. Por lo cual cada laboratorio siempre debe especificar las pruebas incluidas en la BH, pues con esto se ha generado dos términos ambiguos: BH de rutina y BH completa, que en la práctica no deberían tener diferencia alguna, pues los equipos automatizados obtienen todos los parámetros en una sola determinación.

Hoy en día la BH se hace acompañar de otras pruebas para diagnosticar patologías hemáticas específicas. Algunas de estas pruebas son la **VSG**, para dar seguimiento a infecciones; **tinciones citoquímicas, inmunofenotipo, métodos moleculares o métodos citogenéticos**, para diagnosticar hemopatías malignas; **electroforesis de Hb**, para establecer talasemias o hemoglobinopatías; **crioaglutininas**, para identificar anemias hemolíticas autoinmunes; sólo por mencionar algunas.

La BH al tratarse de un estudio de la sangre no debe limitarse al diagnóstico de las patologías hemáticas, sino que puede ser indispensable en otros trastornos que convergen con alteraciones de la sangre, tales como infecciones parasitarias, cáncer, enfermedades gastrointestinales, entre otras.

Si es evidente que el elemento primario o principal de la enfermedad considerada consiste en cambios hematológicos o si interesa excluir la presencia de estos cambios, el médico ha de procurar un examen hematológico completo. A fin de conseguir un estudio inmediato y efectivo del enfermo, tal vez sea necesario solicitar la consulta del patólogo o del hematólogo clínico. En todo caso, la finalidad de este examen es adquirir la máxima información respecto al sistema sanguíneo, con la menor incomodidad posible para el paciente y en un tiempo mínimo. La experiencia enseña que la exactitud técnica y la utilidad diagnóstica de los análisis de sangre son mayores cuando se hace a la vez varias observaciones, a ser posible con una sola muestra.

Naturalmente conviene seleccionar los procedimientos de acuerdo con los hallazgos clínicos, pero el riesgo de excederse en el número de observaciones en este tipo de trabajo es mucho menor que el que resulta de tratar de reunir información fragmentada obtenida en momentos diferentes y con muestras distintas del mismo paciente.

En las Figuras 23 y 24 se muestran los reportes de BH generados por un equipo CELL-DYN 3700 (Abbott) y un ADVIA 120 (SIEMENS), respectivamente. Estos citogramas generados por cada equipo son para uso exclusivo del laboratorio, sin embargo cada laboratorio puede y debe realizar su formato para el reporte de resultados que se entrega al paciente.

CELL DYN

DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGIA

Fecha/hora actual : 28/12/09 15:39 Software : Version 1.1

ID de muestra R10 T1
Paciente
Sexo FNac
Dr
Gr f.: 1 L/mite: 1

28 Dic 2009 15:33
ID usuario
Nx sec. 8323
Modo cerrado

WBC	8.31	10e3/uL
NEU	5.48	66.0 %N
LYM	2.30	27.7 %L
MONO	.412	4.96 %M
EOS	.061	.735 %E
BASO	.052	.630 %B

RBC	4.44	10e6/uL
HGB	12.9	g/dL
HCT	37.6	%
MCV	84.7	fL
MCH	29.0	pg
MCHC	34.3	g/dL
RDW	16.0	%

PLT	279.	10e3/uL
MPV	7.72	fL

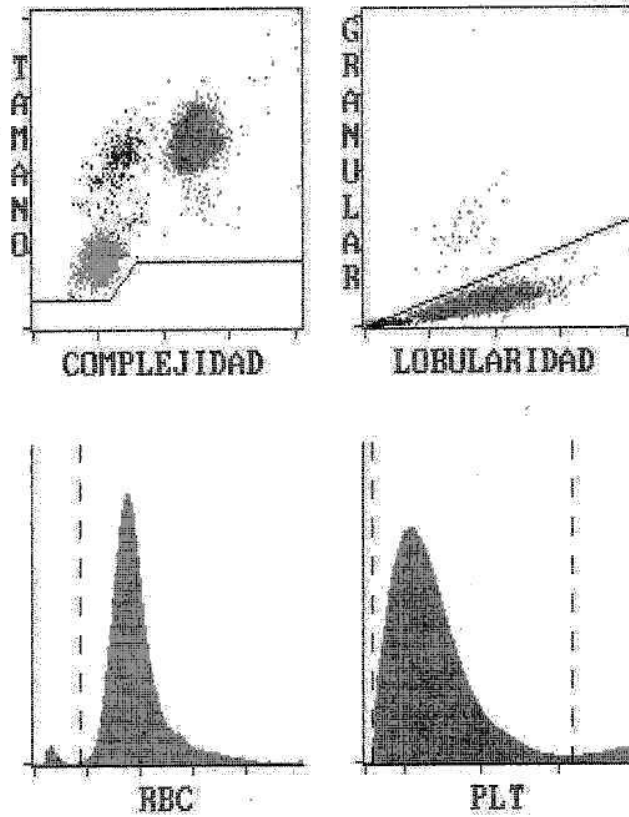
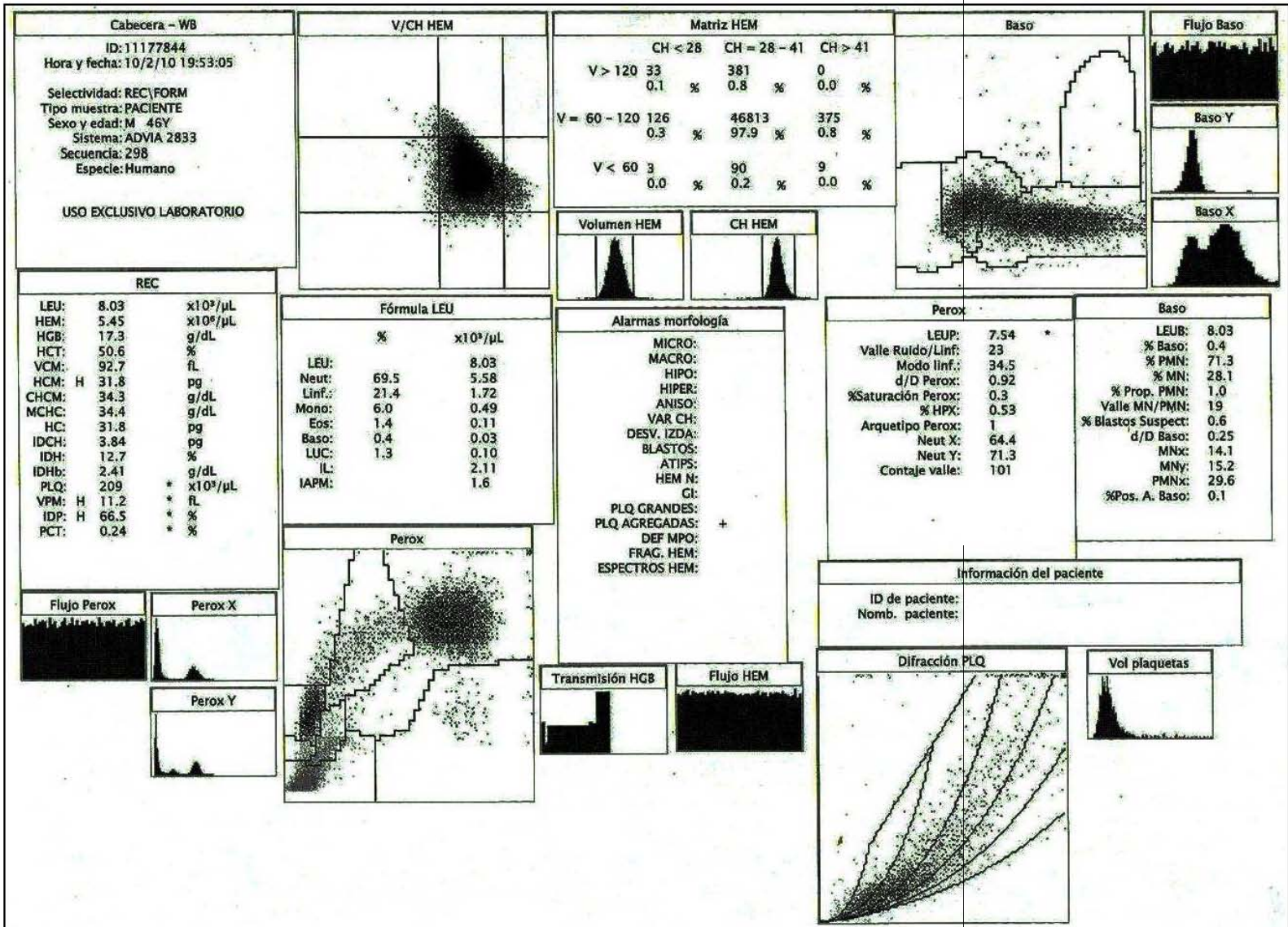


Fig. No. 23. Hoja de reporte del autoanalizador hematológico CELL-DYN 3700.

Fig. No. 24. Hoja de reporte del autoanализador hematológico ADVIA 120.



Fundamento

Aunque a veces la presencia de anemia, leucemia, defectos cuantitativos y/o cualitativos de las plaquetas u otro tipo de trastornos, se pueden sospechar por interrogatorio y exploración física. La *Biometría Hemática* es una medición mucho más definitiva del estado de los tejidos formadores de sangre.

Material e instrumentos

- Sangre venosa anticoagulada.
- Todo el equipo necesario utilizado en las prácticas anteriores.

Reactivos

- Todos los necesarios utilizados en las prácticas anteriores.

Procedimiento

1. Recolectar sangre venosa anticoagulada con EDTA.
2. Homogenizar perfectamente bien la sangre, mediante repetida inversión del tubo.
3. Dividir la muestra de sangre anticoagulada en 2 tubos de 12x75 mm en partes iguales.
4. Etiquetar los tubos con el número de lista de la persona a la que se extrajo la sangre.
5. Entregar al asesor los 2 tubos con la muestra de sangre anticoagulada, perfectamente homogenizados y etiquetados.
6. Con base a los conocimientos prácticos adquiridos en las prácticas anteriores, realizar a la muestra problema proporcionada por el asesor una Biometría Hemática de rutina de manera manual.
7. Realizar las siguientes pruebas:
 - Formula Roja:
 - **Recuento eritrocitario**
 - **Hb**
 - **Hto**
 - **Índices eritrocitarios**
 - Formula Blanca
 - **Cuenta total de leucocitos**
 - **Cuenta diferencial**

Actividades

- Realizar una biometría hemática de manera manual.
- Entregar en una hoja de reporte hematológico los resultados obtenidos de la biometría hemática el mismo día de la práctica.

LOS AUTOANALIZADORES

En la actualidad la importancia del laboratorio clínico para ayudar a esclarecer distintas patologías se ha incrementado, por lo cual el laboratorio clínico se ha visto obligado a mejorar las técnicas para entregar los resultados en un menor lapso de tiempo. Esta mejora continua llevó a crear equipos automatizados capaces de realizar exámenes de laboratorio en un corto tiempo y con la mayor calidad posible para garantizar la veracidad de los resultados.

El estudio de la Hematología dio un gran giro cuando Paul Erlich en 1877 desarrollo una tinción triácida, dando así la base para la diferenciación de todas las células sanguíneas, pues hasta ese tiempo solo se conocían dos componentes de la sangre, los corpúsculos rojos y blancos. Conforme fueron esclareciéndose los misterios de la sangre se desarrollaron técnicas manuales para la cuantificación de los diversos componentes sanguíneos, estas técnicas han ido perfeccionándose para reducir el tiempo analítico y obtener mejores resultados, sin embargo todas estas técnicas manuales tienen la desventaja de tener grandes fuentes de error. Estas fuentes de error fueron borradas con el advenimiento de los equipos automatizados, pues estos equipos no sólo los eliminaron, sino que mejoraron los tiempos analíticos procesando un volumen mucho mayor de muestras en un menor lapso de tiempo; además proporcionan mejor exactitud y precisión, pero sobre todo reducen el riesgo de contagio por contacto con la muestra, pues basta con presentarle la muestra al equipo para que esté la procese.

En la actualidad se emplea una gran variedad de instrumentos automatizados para procesar biometría hemática. Los equipos semiautomatizados aun requieren cierta intervención del operador para preparar las muestras a analizar y sólo procesan pocos parámetros a la vez. Los instrumentos completamente automatizados requieren que se les presente la muestra y las identifican mediante un sistema de código de barras, estos equipos son multicanal pues pueden determinar de 8 a 20 parámetros al mismo tiempo, algunos de estos inclusive determinan variables que no existen equivalentes en las técnicas manuales.

La tecnología en los autoanalizadores hematológicos mejora y se renueva constantemente aplicándose a las tres series del hemograma. Desde que Wallace Coulter describió la técnica de impedancia para el recuento celular en 1956 hasta nuestros días, ésta ha sido mejorada a la vez que se han introducido otras metodologías más sofisticadas como la citometría de flujo (dispersión de luz y fluorescencia con la aplicación de anticuerpos monoclonales).

Los sistemas más sofisticados y complejos de cada casa comercial son:

1. Abbott: Cell-Dyn 4000 y Cell-Dyn Sapphire
2. Beckmann-Coulter: Gen's, LH-750
3. Sysmex: XE-2100, XE-5000
4. Siemens: ADVIA 120, 2120, 2120i
5. Horiba-ABX: Pentra 120 DX

Recuento por impedancia. Principio Coulter

En 1956, Wallace Coulter patentó el llamado *principio Coulter* referido al recuento de partículas. Según este autor: **“el principio Coulter es un método electrónico para el recuento y medición de partículas. Está basado en que las células, las cuales son malas conductoras de electricidad, van a interrumpir el flujo de corriente”**.

El electrodo interno está encerrado en una cubierta de cristal no conductivo, el cual tiene una pequeña apertura (Figura 25).

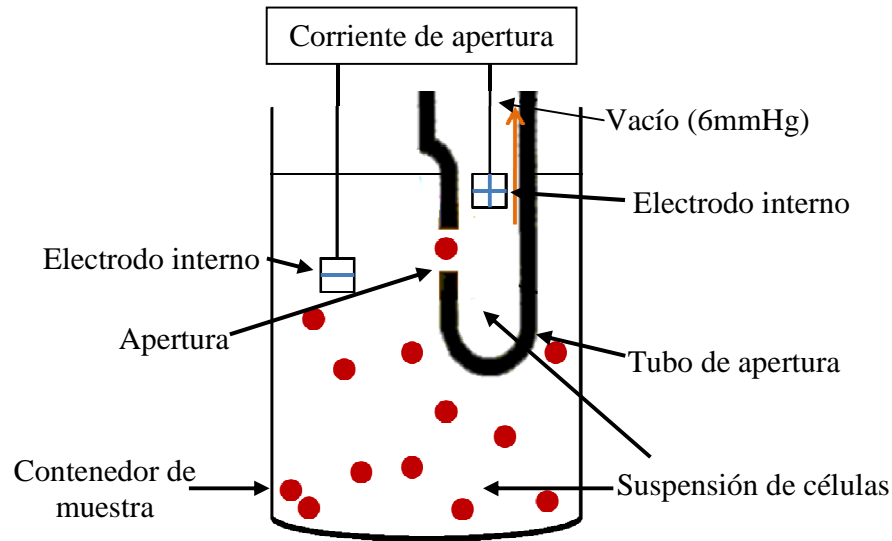


Fig. No. 25. Esquema del recuento celular en los equipos basados en el principio Coulter (impedancia eléctrica).

Cada impulso es amplificado y comparado con los canales de voltaje de referencia internos. Estos canales se hallan delimitados por discriminadores de tamaño calibrados, que aceptan únicamente los impulsos con una determinada amplitud. Así pues, los impulsos son clasificados en los distintos canales

medidores del tamaño, según su amplitud. Dichos impulsos pueden mostrarse en la pantalla de un oscilógrafo. Por ejemplo si planteamos que tenemos 4 canales distribuidos entre los umbrales T1 a T5 (Figura 26), en donde el canal 2 está determinado por T1 y T2, el canal 2 descrito por T2 y T3, y así sucesivamente hasta obtener los cuatro canales. Las partículas que se contarán serán las que caigan dentro de estos cuatro canales, las que caigan por debajo o por encima de estos no se tomarán en cuenta por discriminación de tamaño. Observando las 18 líneas (pulsos) en la

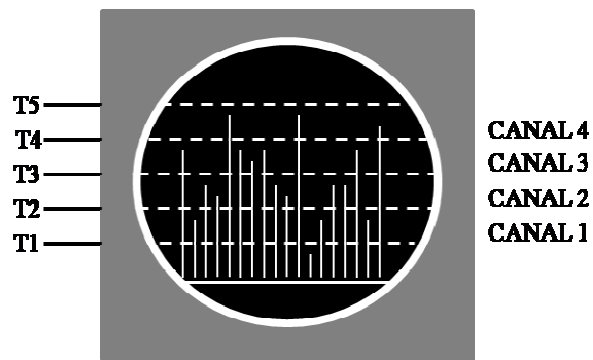


Fig. No. 26. Ejemplo de un osciloscopio en un equipo con principio Coulter.

Figura 26, se nota que solo 17 caen en los cuatro canales y por lo tanto solo estas serán contadas. Si ponemos un valor a cada umbral entonces tenemos que T1= 20 fL y que cada umbral aumenta en 5fL, entonces T2= 25 fL, T3= 30 fL, etc. Entonces se puede generar una gráfica de distribución por tamaño, en donde el eje de las X corresponde al tamaño de la célula y el eje de las Y al número de las mismas. Continuando con el ejemplo entonces tenemos que tres pulsos caen entre 20 – 25 fL, seis entre 25 – 30 fL, cinco entre 30 – 35 fL y tres entre 35 – 40 fL se obtiene la gráfica mostrada en la Figura 27. La finalidad de

establecer estos umbrales es la de excluir las

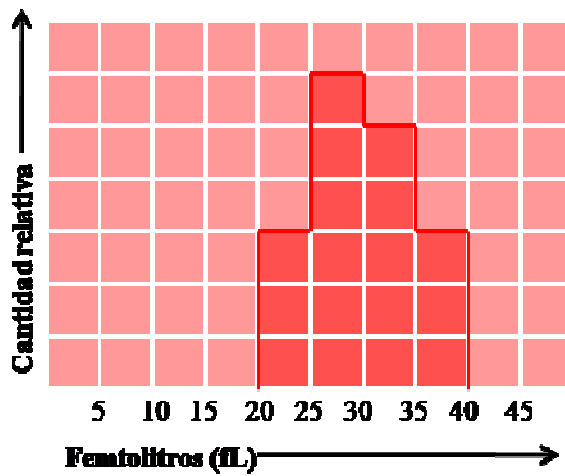


Fig. No. 27. Construcción de un histograma de distribución de frecuencia.

partículas no deseadas, tales como restos celulares o basura de algún otro tipo, clasificar a las células por su tamaño y distinguir a los eritrocitos de las plaquetas. Cada equipo tiene especificados sus umbrales de conteo, los cuales deben disponer de un umbral inferior capaz de distinguir eritrocitos microcíticos de las plaquetas grandes y uno superior para evitar que los leucocitos sean incluidos en el conteo de eritrocitos.

Variaciones en los volúmenes eritrocitarios: Amplitud de la distribución eritrocitaria (ADE o RDW)

Los histogramas generados por los equipos en base a la distribución del volumen celular permiten distinguir la presencia de más de una población celular, esto con la finalidad de poder evaluar el porcentaje de células situadas por encima y por debajo de unos umbrales determinados para el VCM y así poder señalar la existencia de eritrocitos con microcitosis o con macrocitosis (Figura 28). La mayoría de los equipos también realizan una medición cuantitativa de la variación en el volumen celular, una equivalencia del análisis microscópico del grado de anisocitosis. A este nuevo parámetro se le denominó amplitud de distribución eritrocítica (ADE), la cual es obtenida del análisis de la altura del impulso y se puede expresar como la desviación estándar (en fL) o como el coeficiente de variación (en %) de las mediciones del volumen eritrocitario:

$$ADE (\%) = \frac{\text{Desviación del VCM}}{\text{VCM}} \times 100$$

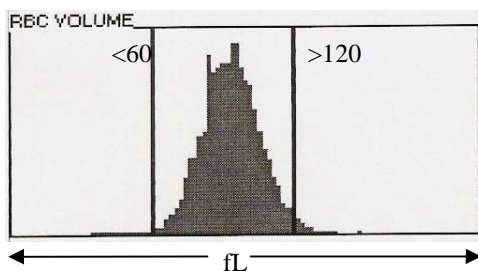


Fig. No. 28. Gráfico que representa la amplitud de distribución eritrocitaria.

La ADE puede verse afectada por múltiples factores, desde los generados por la forma del eritrocito hasta los creados por el flujo de paso y el tamaño de la abertura de paso. Sin embargo la misma dirección del flujo formado puede reducir el error por la forma del eritrocito. También puede ocurrir que durante el conteo dos o más células penetren simultáneamente la zona sensible de la abertura, generando entonces un único impulso de gran amplitud y una mayor área

del impulso, pareciendo entonces que una gran célula atravesara la abertura. En consecuencia el recuento celular experimenta una falsa disminución y un aumento en la ADE. A esta reducción se le conoce como pérdida por coincidencia de paso y puede

predecirse estadísticamente, porque se relaciona directamente con el volumen efectivo de la abertura y el grado de la dilución, por lo tanto los equipos generan una corrección automática según la pérdida por coincidencia de paso.

Dispersión lumínica (citometría de flujo)

La interacción de la luz con una célula modifica su dirección pero no su longitud de onda, produciendo una dispersión de la misma en todas las direcciones del espacio. Como método de análisis celular, la dispersión de la luz es más complejo que la impedancia ya que, además del tamaño y la concentración de las células, permite analizar la complejidad de la estructura celular (granularidad y características del núcleo) y de esta forma diferenciarlas entre sí como si se tratara de un examen morfológico.

El método de la dispersión lumínica consiste en analizar el efecto que sobre un haz de luz monocromática de alta intensidad (láser) ejercen las células sanguíneas al cruzarse una a una en su trayectoria. El lugar donde se produce el encuentro entre las células y el haz de luz láser es la *cámara de flujo*. Cada vez que una célula se interpone en el haz de luz se produce una interrupción del paso de fotones o *sombra* que es proyectada sobre un detector de campo oscuro y una dispersión del propio haz que se *difracta* (cambia de sentido por efecto de la superficie celular), *refracta* (cambia de velocidad por efecto de las estructuras celulares) y *refleja* (invierte el sentido por efecto de las estructuras opacas). La suma de todos efectos es la dispersión lumínica que normalmente es detectada por sensores situados a dos ángulos diferentes: ángulo recto (90°) o fotomultiplicador y un ángulo cónico pequeño ($0,5-10^\circ$) o fotodetector (Figura 29).

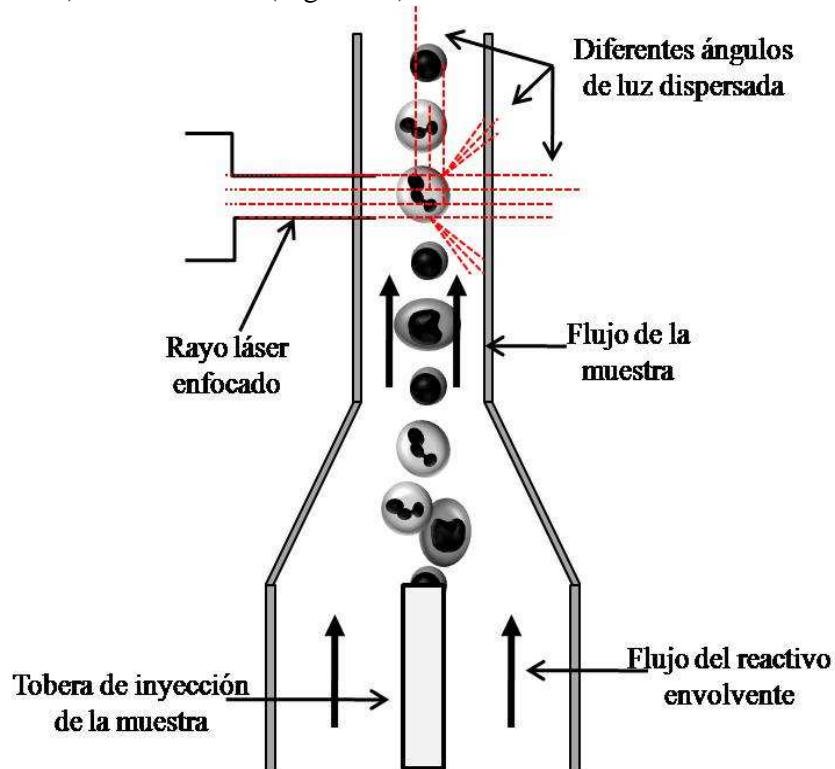


Fig. No. 29. Principio de dispersión lumínica o Citometría de flujo.

Sistema CELL-DYN 3700

El CELL-DYN 3700 es un equipo fabricado por Abott Laboratories y puede procesar muestras por dos vías:

- Modo abierto: aspira 130 $\mu\text{L} \pm 5\%$ de sangre
- Modo cerrado: aspira 240 $\mu\text{L} \pm 5\%$ de sangre

Posee tres canales de medición independientes para determinar el hemograma y la cuenta diferencial: 1) un canal de hemoglobina; 2) un canal de impedancia para los parámetros eritrocitarios y plaquetarios, y 3) un canal óptico para el recuento leucocitario y cuenta diferencial (WIC [canal de impedancia] y WOC [canal óptico]).

1. Canal de hemoglobina

El canal de Hb se utiliza para la determinación colorimétrica de la hemoglobina. La dilución 1:301 de la muestra con el diluyente y el reactivo hemolizante WIC/HGB en la cámara de mezcla del transductor del canal WIC. Esta dilución se utiliza para el recuento WIC y la medición del valor de Hb. Se emplea un reactivo sin cianuro para convertir a la Hb en un complejo hemoglobina-hidroxilamina, el cual es medido a 540 nm por un diodo emisor.

2. Canal de impedancia (Determinación de eritrocitos y plaquetas)

Para determinar los datos eritrocitarios y plaquetarios se utiliza un canal de impedancia. La dilución 1:10812 de la muestra se prepara con el diluyente. Las células se cuentan y miden en un sistema de impedancia que posee una abertura de paso de 60 x 70 μm a medida que pasan por el orificio del transductor del canal RBC/PLT de von Behrens. La separación de las plaquetas y los eritrocitos se logra mediante un umbral dinámico. Se analizan 100 μL de la dilución para el recuento de eritrocitos y plaquetas, los datos se recogen en 256 canales (cada uno equivalente a 1fL), para construir el histograma de tamaño. Los umbrales comprendidos entre 1 – 35 fL recogen los datos para las plaquetas y los umbrales de 36 fL en ascenso recaban los datos para los eritrocitos.

- Hto: El hematócrito se calcula a partir del recuento de eritrocitos y del VCM mediante la siguiente ecuación:

$$\mathbf{Hto = (RBC \times VCM)/10}$$

- VCM: Se obtiene a partir de los datos de distribución por tamaño de los eritrocitos y se expresa en fL.
- HCM: Se calcula a partir de RBC y de la Hb mediante la ecuación:

$$\mathbf{HCM = (Hb/RBC) \times 10}$$

1. CHCM: Se calcula a partir de la Hb y el Hto:

$$\mathbf{CHCM = (Hb/Hto) \times 100}$$

2. ADE: Este parámetro se obtiene a partir del histograma de los eritrocitos y es equivalente al porcentaje de CV (coeficiente de variación):

$$\mathbf{ADE (\%) = \frac{\text{Desviación del VCM}}{\text{VCM}} \times 100}$$

3. Canal óptico (recuento leucocitario y cuenta diferencial)

Utiliza las técnicas de citometría de flujo, basada en el rayo láser, para analizar subpoblaciones leucocitarias. La citometría de flujo se puede definir como un proceso, en el cual las células u otras partículas son obligadas a pasar, de una en una, por una corriente de líquido envolvente a través de un sensor o sensores que miden sus características físicas o químicas por el ángulo de dispersión de la luz.

El sistema CELL-DYN 3700 emplea dos canales para determinar los parámetros leucocitarios; la citometría de flujo para realizar el recuento leucocitario y analizar las subpoblaciones leucocitarias (WOC) y la impedancia para realizar el recuento leucocitario y cuenta diferencial por la forma de los núcleos (WIC). El canal óptico se usa para determinar los datos WOC. Con el reactivo envolvente se prepara una dilución 1:51 de la muestra, de la cual la jeringa volumétrica WOC inyecta un volumen exacto en la corriente de flujo laminar generado por el reactivo envolvente para alinear las células y que estas se vean forzadas a pasar una por una por la cámara de cuarzo, donde se encuentra un laser de helio-neón con polarización vertical.

El analizador mide los parámetros de dispersión de luz en los siguientes ángulos (Figura 30):

1. Ángulo tradicional de avance = $1 - 3^\circ \approx 0^\circ$, que sirva para medir el tamaño celular.
2. Dispersión ortogonal de la luz = $70 - 110^\circ \approx 90^\circ$, que sirva para medir la superficie celular y la estructura interna (lobularidad).
3. Ángulo estrecho = $7 - 11^\circ \approx 10^\circ$, se emplea para medir la complejidad celular.
4. Dispersión ortogonal de la luz despolarizada = $70 - 110^\circ \approx 90^\circ D$, que se emplea para medir la granularidad celular.

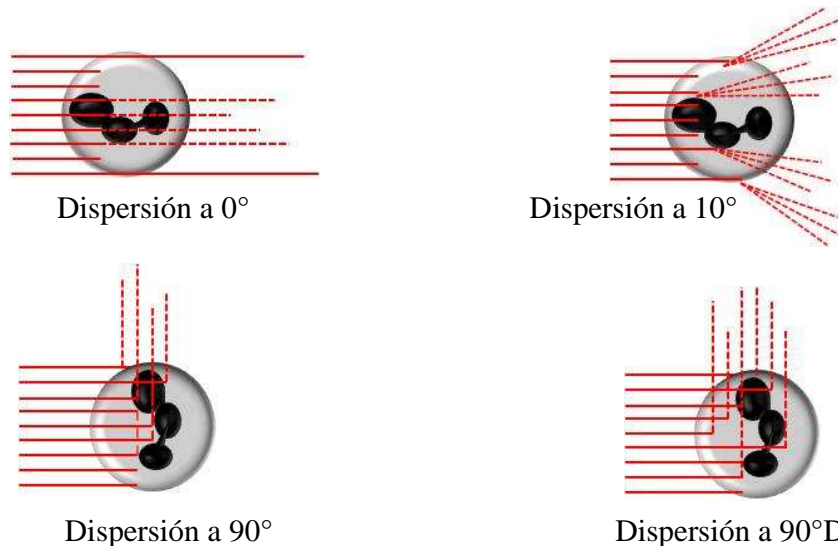


Fig. No. 30. Ángulos de dispersión de luz para las determinaciones por citometría de flujo en el equipo CELL-DYN 3700.

El canal WIC emplea una dilución de 1:301 de la muestra con el reactivo hemolizante WIC/HGB. Este reactivo liza los eritrocitos y desprende el citoplasma de los leucocitos dejando intactos los núcleos. Los núcleos (leucocitos y eritroblastos) son contados por impedancia en el transductor de von Behrens WIC con una abertura de paso

de 100 x 77 µm. Se analiza un volumen de 200 µL de la dilución y los datos son recogidos en 256 canales, con los cuales se forma un histograma de lobularidad.

Sistema ADVIA 120

Inicialmente introducido por Bayer Corporation y hoy en día fabricado por SIEMENS, es un equipo que emplea citometría de flujo para los parámetros de fórmula roja y blanca, además de citoquímica para efectuar la cuenta diferencial leucocitaria. Este aparato utiliza gran parte de la tecnología de los sistemas Technicon H-1, H-2 y H-3 más antiguos, sin embargo Bayer simplificó la hidráulica y las operaciones del analizador. El ADVIA 120 emplea cuatro canales de medición independientes para determinar el hemograma y el recuento diferencial: 1) canal para eritrocitos y plaquetas; 2) canal para Hb; 3) canal para Peroxidasa (PEROX), y 4) canal para lobularidad de basófilos (BASO) para recuento leucocitario y datos diferenciales.

1. Canal para eritrocitos y plaquetas

Las reacciones para el recuento de eritrocitos y plaquetas ocurre básicamente en dos pasos: 1) Los eritrocitos y las plaquetas se esferizan isovolumétricamente por acción del reactivo ADVIA 120 HEM/PLQ; 2) fijación de los eritrocitos y plaquetas. Una vez terminada la reacción se hace pasar un volumen constante de la suspensión por la cubeta de lectura, en ella se miden las señales de la difracción de luz de ángulo bajo (2° a 3°) y de ángulo alto (5° a 15°) de cada célula. Esta suspensión es envuelta por el reactivo ADVIA 120 ENVOLVENTE/ACLARANTE cuando pasa por la cubeta de lectura. Se detectan las dos señales de difracción de luz, se amplifican electrónicamente y se dividen en cuatro señales.

- Se emplea una señal de difracción de luz de ángulo bajo y una de ángulo alto para analizar los eritrocitos.
- La señal de difracción de luz de ángulo bajo (2° a 3°) se amplifica 30 veces, y la señal de difracción de luz de ángulo alto (5° a 15°) se amplifica 12 veces. Estas señales se emplean para analizar plaquetas.

Utilizando la teoría de Mie de la difracción de la luz en esferas homogéneas, la medición de la difracción de la luz de ángulo bajo se convierte en volumen celular y la medición de difracción de luz de ángulo alto se convierte en concentración de hemoglobina.

Los índices eritrocitarios se calculan a partir de los parámetros medidos directamente (eritrocitos, Hb y VCM):

- VCM: Se obtiene a partir de la media del volumen eritrocitario y se expresa en fL.
- Hto: El hematocrito se calcula a partir del recuento de eritrocitos y del VCM mediante la siguiente ecuación:

$$\mathbf{Hto = (HEM \times VCM)/10}$$

- HCM: Se calcula a partir de RBC y de la Hb mediante la ecuación:

$$\mathbf{HCM = (Hb/HEM) \times 10}$$

- CHCM: Se calcula a partir de la Hb y el Hto:

$$\mathbf{CHCM = (Hb/[HEM \times VCM]) \times 1000}$$

- RDW: Se calcula como el CV del histograma de volumen eritrocitario.

$$\text{ADE (\%)} = \frac{\text{Desviación del VCM}}{\text{VCM}} \times 100$$

2. Canal para hemoglobina

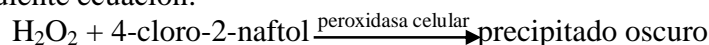
Se emplea un reactivo que contiene un agente tensoactivo y cianuro de potasio que se disuelve en una solución alcalina de borato a pH 11.3 (ADVIA 120 HGB). Este reactivo hemoliza los eritrocitos y desnaturaliza las proteínas sanguíneas con una solubilización de los grupo hemo por las micelas tensoactivas. Los grupos hemo solubilizados experimentan una oxidación del hierro ferroso a férrico y se combina con dos moléculas de cianuro para formar micelas de ferrihemo. Las micelas pasan a través de una cubeta de flujo donde se mide la absorbancia a una emisión de 546 nm. Una vez procesados, los datos ópticos se representan en una curva de la tasa de Hb a razón de tiempo.

La cantidad de Hb se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\log(\text{media de muestra/media línea base}) \text{ Factor cal. Hb} \times 50$$

3. Canal de Peroxidasa (PEROX)

Para las reacciones del canal PEROX se emplean 4 reactivos (ADVIA 120 ENVOLVENTE PEROX, PEROX 1, PEROX 2 y PEROX 3), los cuales lisan y tiñen los leucocitos por su actividad peroxidasa. La reacción siguiente es catalizada por la peroxidasa celular, que convierte el sustrato a un precipitado oscuro en los neutrófilos, los eosinófilos y los monocitos, los cuales se tiñen según su grado de actividad peroxidasa. Esta reacción se expresa en la siguiente ecuación:



Una porción de la suspensión se coloca en la corriente de un flujo laminar que atraviesa un sistema óptico halógeno de campo oscuro, donde se mide la absorbancia (proporcional a la cantidad de peroxidasa) y la dispersión frontal (tamaño de la célula).

4. Canal BASO

Las células son tratadas con un reactivo que contiene un surfactante no iónico en una solución ácida, para lisar los eritrocitos y plaquetas, además de que desprende el citoplasma de los leucocitos dejando intactos los basófilos. El láser óptico, con el mismo sistema de dispersión frontal en dos ángulos del canal de HEM, se emplea para analizar las células tratadas.

El ángulo alto proporciona la complejidad nuclear y el ángulo bajo proporciona el tamaño de la célula. Los basófilos son identificables por su gran dispersión en ángulo bajo, el análisis del cúmulo permite identificar y cuantificar cada población leucocitaria.



Fig. No. 31. Citogramas de PEROX y BASO en el equipo ADVIA 120. 1) Ruido. 2) Eritroblastos. 3) Plaquetas agregadas. 4) Linfocitos y basófilos. 5) LUC -células grandes no teñidas-. 6) Monocitos. 7) Neutrófilos. 8) Eosinófilos. 9) Blastos. 10) Mononucleares. 11) Neutrófilos y eosinófilos. 12) Basófilos. 13) Posible anomalía baso. 14) Saturación.

Actividades

- El equipo de trabajo correspondiente presentara un seminario con la información más actualizada sobre los fundamentos, equipos y determinaciones de los diversos equipos automatizados empleados en el área de Hematología.
- Leer el Anexo I

FRAGILIDAD OSMÓTICA

La membrana eritrocitaria (Figura 32) es la responsable de las propiedades mecánicas y de la mayoría de las funciones fisiológicas de la célula. Está formada por una bicapa lipídica plana, donde predominan los fosfolípidos y el colesterol (80%) y en menor medida los glucolípidos y aminofosfolípidos, distribuidos asimétricamente. De igual forma, se encuentran embebidas parcial o totalmente en ella las proteínas integrales de membrana, unidas fuertemente por enlaces no polares. Su libre desplazamiento a través de esta bicapa contribuye a mantener su fluidez. Las proteínas periféricas interactúan entre sí para formar una malla o enrejado que recubre la cara interior de la doble capa de fosfolípidos y son las responsables de la estabilidad y las propiedades viscoelásticas de la membrana.

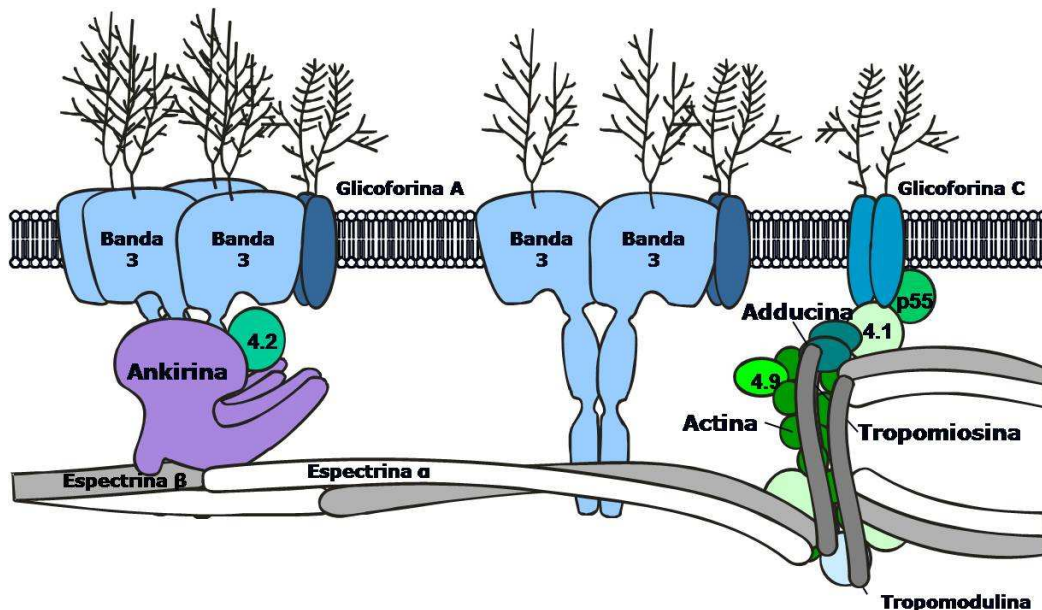


Fig. No. 32. Representación esquemática de la membrana eritrocitaria. Las proteínas integrantes son la banda 3 y la glucoforina C (GPC). El citoesqueleto está formado por tetrámeros de espectrina: bandas α y bandas β , actina y proteínas de unión: 4.1, 4.2, 4.9 y 2.1 (anquirina).

Defectos en algunas de estas proteínas pueden dar lugar a trastornos clínicos en los cuales está involucrada la estabilidad del eritrocito. Entre ellos los más frecuentes y mejor estudiados son la esferocitosis hereditaria y la eliptocitosis hereditaria.

Esferocitosis hereditaria

La esferocitosis hereditaria (EH) es una enfermedad caracterizada por anemia hemolítica de severidad variable y una respuesta clínica favorable a la esplenectomía.

La esferocitosis es la anemia hemolítica más frecuente en la población. Es una enfermedad muy heterogénea, de herencia autosómica dominante generalmente, caracterizada por una disminución de la relación superficie/volumen de los eritrocitos, con hemólisis, presencia de esferocitos en sangre periférica, elevación de la concentración de

hemoglobina corpuscular media en la mitad de los casos y aumento de la fragilidad osmótica (Figura 33). Los eritrocitos de pacientes con esferocitosis hereditaria presentan una disminución de Na^+ intracelular y una pérdida de lípidos de la membrana, lo cual explica la disminución del área superficial de la célula.

La esferocitosis se produce por un defecto intrínseco del eritrocito y se han demostrado defectos moleculares de diferentes proteínas que conforman el esqueleto de la membrana eritrocitaria. La presencia de alteraciones del metabolismo, del transporte catiónico, de la fosforilación de las proteínas y de la composición de los lípidos de la membrana, son secundarias a la causa primaria de esta enfermedad. La lesión en la membrana está dada por una pérdida del área de la célula, pero se desconoce si esto se debe a una pérdida física (fragmentación) o a una contracción de la superficie de la membrana, y aunque la mayoría de las evidencias favorecen la fragmentación, no parece ser el único mecanismo que explique este hallazgo. Además, los eritrocitos esferocíticos pierden membrana más rápidamente que los eritrocitos normales cuando se deprime su metabolismo. La concentración de fosfolípidos y colesterol es del 15 al 20 % menor de lo normal debido posiblemente a la disminución de su superficie y se presume que también se produce una pérdida de las proteínas integrales de la membrana.

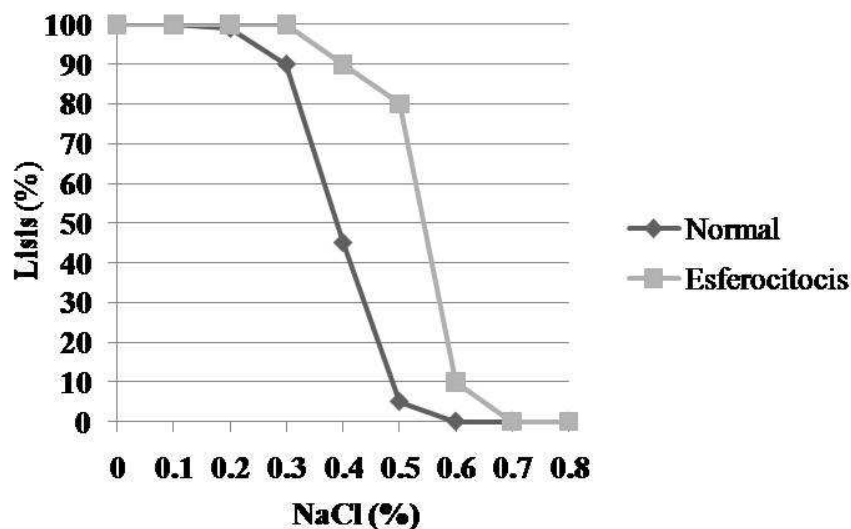


Fig. No. 33. Curva de fragilidad osmótica, donde se compara una persona normal contra una persona con esferocitosis hereditaria.

Anemias hemolíticas

Las anemias hemolíticas se clasifican por su etiología en congénitas y adquiridas. En las primeras, la anomalía reside en un componente del propio eritrocito: membrana, molécula de hemoglobina o alteración metabólica. En las segundas, el causante de la hemólisis es extrínseco al eritrocito, bien a través de mecanismos inmunes, una alteración ambiental o de una microangiopatía. Las anemias hemolíticas congénitas y adquiridas más frecuentes son:

1. Congénitas

- Defectos de la membrana
 - Esferocitosis
 - Eliptocitosis

- Alteraciones metabólicas por defectos enzimáticos
 - En la vía de Embden-Meyerhof
 - En la vía de pentosa-fosfato
- Alteraciones en la hemoglobina
 - Talasemias
 - Hemoglobinas anómalas

2. Adquiridas

- Inmunes
 - Autoinmunes (por anticuerpos calientes o fríos)
 - Isoinmunes (enfermedad hemolítica del recién nacido)
 - Por medicamentos
- Mecánicas
 - Anemia hemolítica microangiopática (Síndrome hemolítico-urémico, hemangioma gigante)
- Infecciosas
 - Malaria
- Tóxicas
 - Agentes oxidantes
 - Arsénico
- Agentes físicos
 - Quemaduras graves

Fundamento

Los defectos en la composición proteínica de la membrana producen una disminución en el cociente superficie/volumen del eritrocito lo que acarrea la pérdida de la forma bicóncava del eritrocito. Así mismo, se producen cambios en la viscosidad citoplásmica como consecuencia de la entrada de agua y aumento del volumen. Debido a ello cuando los eritrocitos se incuban en medios de hipotonicidad gradual, existe entrada de agua al eritrocito hasta sobrepasar el límite de elasticidad del hematíe y por consiguiente se revientan más rápido que un eritrocito normal.

Material e instrumentos

- Sangre venosa anticoagulada
- Una gradilla
- 13 tubos de 13 x 100 mm
- Pipeta de Sahli de 0.02 mL (20 μ L)
- Boquilla
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL
- Centrifuga
- Celdas espectrofotométricas
- Espectrofotómetro

Reactivos

- Heparina
- Solución de depósito de NaCl al 10% (pH=7.4)
- Solución al 1.0% de NaCl

Procedimiento

Método de Dacie Método cuantitativo sin incubación

1. Recolectar 3 mL de sangre venosa heparinizada en un tubo con tapón.
2. Empezando con una solución al 1% se hacen las siguientes diluciones en tubos de 13 x 100 mm:

Tabla No. 21. Curva de fragilidad osmótica con soluciones hipotónicas.

No. de Tubo	NaCl al 1% (ml)	Agua destilada (ml)	NaCl (%)	Hemolisis (%)	Absorbancia
1	0.00	5.00	0.00	100	
2	0.50	4.50	0.10		
3	1.00	4.00	0.20		
4	1.50	3.50	0.30		
5	1.75	3.25	0.35		
6	2.00	3.00	0.40		
7	2.25	2.75	0.45		
8	2.50	2.50	0.50		
9	2.75	2.25	0.55		
10	3.00	2.00	0.60		
11	3.25	1.75	0.65		
12	3.75	1.25	0.75		
13	4.25	0.75	0.85	0	0

3. Se mezcla el contenido de cada tubo antes de agregar la sangre.
4. Homogeneizar perfectamente bien la sangre haciendo girar el tubo circularmente.
5. Agregar a los trece tubos el volumen de 0.2 mL (medido con precisión con la pipeta de Sahli) de sangre del paciente.
6. Se **mezcla** correctamente cada tubo (**NO** agitar, porque se puede hemolizar la sangre).
7. Se dejan a temperatura ambiente por 30 minutos.
8. Vuelven a ser mezclados y se centrifugan a 2000 rpm durante 10 minutos.
9. Leer en un espectrofotómetro a 540 nm el sobrante de cada tubo.

El tubo No. 13 **se usa como blanco**. El tubo No. 1 **corresponde al patrón de 100% de hemólisis**. Para la lectura, el sobrenadante de cada tubo debe ser vertido a la celda cuidadosamente para no incluir las células.

10. Calcular el % de hemolisis de cada tubo:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del 100\% de hemolisis}} \times 100$$

Valores de referencia

NaCl (%)	Hemolisis (%)
0.30	97 – 100
0.35	90 – 99
0.40	50 – 90
0.45	5 – 45
0.50	0 – 5
0.55	0

Actividades

- Expresar la prueba de fragilidad de eritrocitos como una curva sobre papel milimétrico (% de hemólisis = f[NaCl]).
- Indicar la concentración de NaCl cuando:
 - a) Se inicio la hemólisis
 - b) Ocurrió el 50% de hemólisis
 - c) Fue completa al 100% de hemólisis

HEMOGLOBINOPATÍAS

Las hemoglobinopatías son alteraciones en las cadenas globínicas, secundarias a mutaciones genéticas, las cuales pueden ser de dos tipos:

- a) Cualitativas o estructurales: modificación de la secuencia de aminoácidos durante la síntesis de una cadena de globina.
- b) Cuantitativas o síndromes talasémicos: disminución variable de la síntesis de una cadena de globina, sin alteración estructural.

Alteraciones estructurales

Se tiene un registro de más de 500 variantes de hemoglobina en todo el mundo (Tabla 22). Son el resultado de mutaciones genéticas que pueden alterar alguna de las cadenas de globina (alfa, beta, gamma o delta). Las anomalías estructurales se pueden clasificar en cinco grupos para facilitar su identificación:

1. Sustitución de un aminoácido por otro:
 - i. HbS ($\beta^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}}$)
 - ii. HbC ($\beta^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}}$)
 - iii. HbD ($\beta^{121\text{Glu}\rightarrow\text{Gln}}$)
 - iv. HbG ($\alpha^{68\text{Asn}\rightarrow\text{Lys}}$)
 - v. HbE ($\beta^{26\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}}$)
 - vi. HbO-Arab ($\beta^{121\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}}$)
 - vii. HbM ($\alpha^{58\text{His}\rightarrow\text{Tyr}}$ ó $\alpha^{87\text{His}\rightarrow\text{Tyr}}$)
2. Sustitución de más de un aminoácido: HbC-Harlem.
3. Eliminación de uno o más aminoácidos: Hb Leidem (perdida del ácido glutámico).
4. Fusión de cadenas de Hb o hemoglobinas híbridas: Hb Lepore (fusión de las cadenas δ y β).
5. Elongación de la cadena de aminoácidos: Hb Constant Spring que posee 31 residuos adicionales.

Tabla No. 22. Número de anomalías estructurales de las variantes de Hb

	Número de variantes				
	Cadena α	Cadena β	Cadena δ	Cadena γ	Total
Sustitución de un solo aminoácido	199	337	28	70	634
Doble sustitución de aminoácidos	1	18	0	0	19
Eliminación, inserción o ambas	6	16	0	0	22
Cadenas extendidas	7	6	0	0	13
Fusiones	0	10	9	1	10
Totales*	213	387	37	71	698

*El número total de variantes de la Hb (698) es 10 menos que la suma de las primeras cuatro columnas porque cada una de las 10 Hb de fusión se registra en dos columnas (9 entre las cadenas β y δ ; 1 entre las cadenas β y γ).

Las hemoglobinopatías estructurales se transmiten hereditariamente y son de carácter autosómico codominante. El estado homocigoto se caracteriza por la presencia exclusiva de la hemoglobina mutada (No hay HbA). En el estado heterocigoto, si la mutación afecta la cadena β , se observa un 50% de HbA y un 50% de Hb mutada, mientras que si la mutación

afecta la cadena α se observa un 75% de HbA y sólo 25% de Hb mutada (la relación entre los genes α y β son 2/1). Las alteraciones de las cadenas δ y γ no son de importancia clínica ya que difícilmente se detectan por la cantidad de Hb involucrada.

Variantes inestables de la Hb

Existen alrededor de 200 variantes inestables de Hb. La mayoría pertenecientes a la cadena β ; otras pocas pertenecientes a la cadena α y sólo algunas pertenecientes a las cadenas γ y δ . Solo alrededor del 25% de las hemoglobinas inestables causan anemia hemolítica, la cual puede ir desde una anemia leve hasta una crisis hemolítica muy severa con formación de cuerpos de Heinz. Se heredan de manera autosómica dominante y de condición heterocigota, la condición homocigota al parecer es incompatible con la vida.

La inestabilidad de la molécula de hemoglobina se presenta por alguna de las siguientes causas:

1. Sustitución de un bolsillo polar por uno no polar en el interior de la molécula de Hb.
2. Sustitución de aminoácidos alrededor del bolsillo del hemo.
3. Sustitución de las cadenas α y β en el punto de contacto.
4. El remplazo con prolina.
5. La elongación o eliminación de la estructura primaria.

La enfermedad por hemoglobina inestable se presenta desde la infancia primaria, con ictericia y esplenomegalia. La gravedad de la anemia se determina por el grado de inestabilidad de la molécula de Hb, pues está precipita *in vivo* e *in vitro* al exponerse a ciertos factores que no afectan a las Hb normales.

Debido al carácter hereditario de estos padecimientos el tratamiento sólo consiste en controlar y prevenir las crisis hemolíticas, y en los casos muy severos la esplenectomía ayuda a que el secuestro y eliminación de los eritrocitos dañados disminuya. El pronóstico de los individuos con hemoglobinas inestables es incierto, ya que estos padecimientos son raros.

Síndromes talasémicos

Las talasemias son un grupo polifacético de trastornos hereditarios, causados por mutaciones genéticas que disminuyen o anulan la síntesis de una o más cadenas de globina, inhibiendo la producción adecuada de Hb por la alteración en la estructura tetramérica de la misma. Según la naturaleza de estas, se clasifican en:

1. α -talasemia (disminución de cadenas α)
2. β -talasemia (disminución de cadenas β)
3. $\delta\beta$ -talasemia (disminución simultánea de cadenas δ y β)

El mecanismo molecular de las talasemias es muy variable, aunque destacan la delección genética en las α -talasemias y los defectos de transcripción en las β -talasemias. En ambos casos existe un exceso de las restantes cadenas de globina, de forma que en las β -talasemias se observan precipitados de cadenas α en las células eritroides, y en el caso de las α -talasemias, precipitados de cadenas β .

Los dos tipos de talasemia presentan diversas formas clínicas según el carácter homocigoto o heterocigoto del defecto molecular (Tabla 23). La expresividad clínica de la

β -talasemia depende de la cantidad de síntesis de la cadena β ; la forma más grave de β -talasemia es el estado homocigoto en el cual la síntesis de cadenas β es mínima o inexistente (β -talasemia mayor). Al estado doble heterocigoto se le llama β -talasemia intermedia. La forma más leve de β -talasemia es el estado heterocigoto y se conoce como β -talasemia menor o rasgo talasémico.

La forma más grave de α -talasemia es donde existe una ausencia total de cadenas α y se la llama anasarca fetoplacentaria o *hydrops fetalis*. La forma más leve de α -talasemia es totalmente asintomática y solo se puede diagnosticar mediante estudio de ADN. Las otras formas de α -talasemias se caracterizan por presentar anemia de intensidad variable y la presencia de mayor o menor cantidad de hemoglobina H.

Tabla No. 23. Designaciones genéticas en la talasemia

Cuadro Clínico	Genoma
Beta talasemia menor Beta talasemia intermedia Beta talasemia mayor	β/β^0 ; β/β^+ ; $\beta/\delta\beta$ β^0/β^+ ; $\delta\beta/\delta\beta$ β^0/β^0 ; β^0/β^+ Medit; β^+ Medit/ β^+ Medit; $\delta\beta_{Lepore}/\delta\beta_{Lepore}$
Alfa talasemia-1 Alfa talasemia-2 (α -talasemia menor) Alfa talasemia mínima Enfermedad por hemoglobina H	$\alpha^0\alpha^0$: Alfa talasemia con 100% de hemoglobina Bart $\alpha^+\alpha^+$ $\alpha\alpha^+$ $\alpha^0\alpha^+$
α = 2 genes normales α^+ = 1 gen normal y 1 gen ausente α^0 = 0 genes normales β = 1 gen normal β^0 = 0 genes normales β^+ = 1 gen anormal (10 – 50% de cadenas β normales)	

Algunas pruebas de laboratorio útiles para determinar las Hb inestables y talasemias son:

- Análisis de estabilidad molecular de la Hb (precipitación con isopropanol o desnaturalización por calor a 50°C)
- Inducción de cuerpos de Heinz
- Análisis secuencial de aminoácidos
- Electroforesis de Hb
- Cuantificación de la fracción hemoglobínica HbA₂
- Cuantificación de HbF
- Análisis de las cadenas de globina por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) por intercambio iónico.
- Biología molecular de α , β y $\delta\beta$ -talasemia

Fundamento

La estabilidad de la hemoglobina depende fundamentalmente de las fuerzas de unión existentes en dos áreas de la molécula: la unión $\alpha_1\beta_1$ y la unión del hemo con la globina.

Las hemoglobinas normales difícilmente precipitan (o rompen sus fuerzas de unión) o lo hacen en menor grado cuando se calientan a 60°C durante 30 minutos, mientras que varias hemoglobinas inestables son desnaturalizadas completamente a esta temperatura y precipitan en forma de flóculos.

Material e instrumento

- Sangre venosa con anticoagulante
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Equipo para Baño María
- Termómetro
- Centrifuga

Reactivos

- Amortiguador de fosfatos pH=7.4
- Solución salina isotónica (0.85%)

Procedimiento

1. Recolectar 5mL de sangre venosa en un tubo con EDTA y homogenizar por inversión.
2. En un tubo de ensayo de 13 x 100 mm poner 0,5 mL de sangre anticoagulada.
3. Lavar los eritrocitos 4 veces con solución salina isotónica centrifugando a 3000 rpm durante 5 minutos.

Lavado de eritrocitos: Colocar 0,5 mL de sangre total anticoagulada en el tubo de 13 x 100 mm, adicionarle solución salina fisiológica (0,85%) hasta las $\frac{3}{4}$ partes del tubo, colocar un tapón adecuado al tubo y mezclar invirtiendo con cuidado hacia arriba y hacia abajo. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante, de preferencia, con una pipeta Pasteur. ***La indicación de lavar 4 veces, representa repetir el procedimiento 4 veces.***

El residuo de eritrocitos final, es lo que importa para cualquier procedimiento, después de la indicación de lavar los eritrocitos.

4. Desechar el sobrenadante del último lavado y agregar al tubo 2,5 mL de agua destilada.
5. Al hemolizado se le agregan 2,5 mL de amortiguador de fosfatos (pH=7,4). Mezclar y centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
6. En un tubo de ensayo de 13 x 100 mm poner 2 mL del sobrenadante e incubarlo en Baño María a 60°C durante 30 minutos o a 50°C por una hora.

Interpretación

La sangre normal no precipita o lo hace en forma ligera. Un resultado positivo (hemoglobina desnaturalizada presente) se caracteriza por una floculación intensa.

Actividades

- Analizar cada 5 minutos la presencia de flóculo (o precipitado) hasta la culminación de los 30 ó 60 minutos, según sea el caso.
- Reportar en cruces la presencia del precipitado.

INDUCCIÓN DE DREPANOCITOS

La hemoglobinopatía estructural mejor conocida es la HbS, donde ocurre una mutación de la cadena β , por la sustitución del ácido glutámico de la posición 6 con una valina. Esta mutación en la cadena β , altera la solubilidad de la Hb, cuando la célula se desoxigena adopta la forma falciforme característica, por la formación de tactoides o cristales de HbS (Figura 34), el eritrocito regresa a su forma discoidea cuando vuelve a un medio oxigenado. En el estado falciforme la célula se vuelve rígida por la polimerización de las moléculas de Hb, provocando la hemólisis de las células normales. El constante cambio del estado discoideo al estado falciforme produce un cambio irreversible en la membrana del eritrocito con una tendencia a permanecer en la forma drepanocítica.

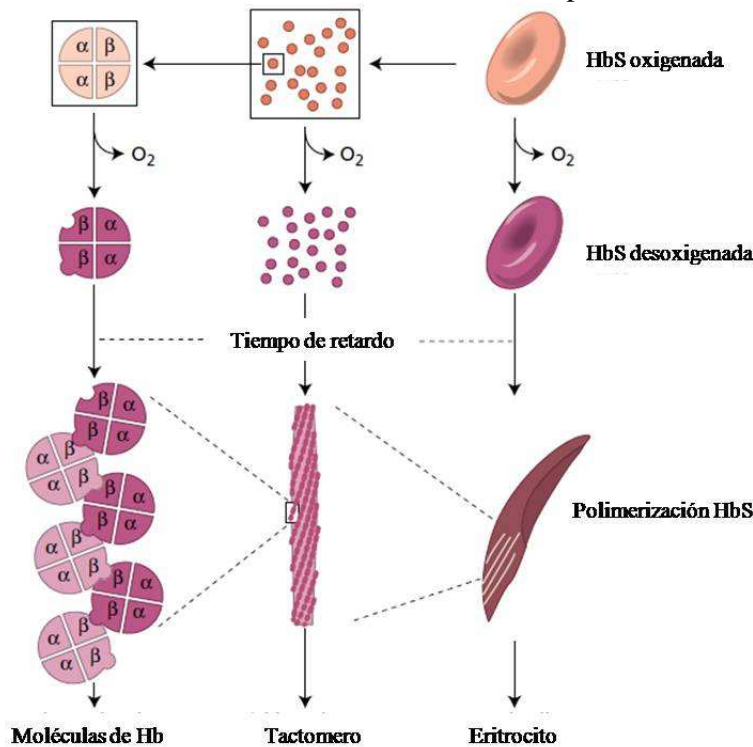


Fig. No. 34. Formación de las células falciformes por polimerización de la HbS

La anemia de células falciformes se observó por primera vez en 1910 por James Herrick. Pero la base patológica y su relación con la molécula de Hb fue descrita por Hahn y Gillespie en 1927. A pesar de ser un padecimiento común en todo el mundo, tiene una mayor incidencia en África. Es un trastorno de carácter autosómico dominante, con un gen procedente de cada padre. Puede ser de carácter homocigoto o heterocigoto con mezclas de otras hemoglobinopatías (HbSC o HbS/ β -tal). El estado homocigoto es el tipo más grave, con una incidencia de 1 por cada 375 nacimientos afroamericanos vivos.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad por HbS pueden variar de la forma asintomática a un cuadro potencialmente fatal, por crisis hemolíticas severas. La anemia hemolítica no se manifiesta en los recién nacidos ya que están protegidos por la gran cantidad de HbF circulante, pero esta comienza a aparecer a partir de la segunda mitad del primer año. A medida que las cadenas β de la HbS reemplazan las cadenas γ de la HbF, los eritrocitos con HbS se hacen susceptibles a la hemólisis, la cual es progresiva hasta desembocar en una esplenomegalia. La vida media de los pacientes con HbS (homocigoto) es de cerca de 45 años y para los pacientes con HbSC de 65 años.

La mayoría de las personas con anemia de células falciformes cursan con episodios de dolor, denominados *crisis*. Hay diversos tipos de crisis: vasooclusivas o dolorosas, aplásicas, megaloblásticas, de atrapamiento y hemolíticas crónicas. Los episodios oclusivos vasculares son los que originan la mayoría de los ingresos hospitalarios, porque estos están

ligados a distintos procesos, como, la acidosis, la hipoxia, la deshidratación, las infecciones y la fiebre, o por la simple exposición al frío. Los órganos que se dañan con mayor frecuencia son los pulmones, hígado, bazo, pene, ojos, los huesos y el sistema nervioso central. La frecuencia de los episodios dolorosos varía de ninguno hasta seis por año. En promedio persisten durante 4 a 5 días, pero pueden llegar a durar semanas. La frecuencia de los infartos esplénicos reduce el tamaño del bazo por cicatrización (autoesplenectomía).

El diagnóstico de la anemia falciforme se establece hasta que se comprueba la solubilidad de la HbS en su forma desoxigenada y se confirma su presencia por electroforesis. Sin embargo la prueba más sencilla para establecer un diagnóstico inicial para la presencia de HbS es la inducción de drepanocitos.

Más que un tratamiento para eliminar las células falciformes se dan tratamientos preventivos para evitar en la medida de lo posible las complicaciones de la enfermedad por células falciformes. Sin embargo están en desarrollo terapéuticas promisorias que pueden modificar la patogenia genética de la enfermedad. Una de estas terapéuticas es la de aumentar la cantidad de HbF en los eritrocitos por acción de la hidroxiurea o butirato, ya que la HbF no polimeriza junto con la HbS.

Electroforesis

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa (soporte), la cual finalmente separa las moléculas por tamaños y carga eléctrica, dependiendo de la técnica que se emplee.

La técnica clásica utiliza una tira recubierta de una sustancia porosa (gel de agarosa, poliacrilamida, etc.) impregnada de un electrolito. Sus extremos se sumergen en dos depósitos independientes que contienen ambos al electrolito y están unidos a los electrodos del generador de corriente. La muestra se deposita en forma de un pequeño trazo transversal en la tira. La distancia de migración se mide en relación a un marcador interno. Las placas son reveladas con sales de plata, azul de Coomassie, o reactivos en particular.

Las diferentes hemoglobinas, al igual que las proteínas del plasma, cuando se colocan en un medio a un determinado pH, presentan diferente carga eléctrica, por lo que pueden ser separadas debido a su distinta movilidad al aplicar un campo eléctrico.

Para la electroforesis de hemoglobina se emplean principalmente dos técnicas:

1. **Electroforesis de hemoglobina a pH alcalino (8,6):** Emplea un soporte de acetato de celulosa y es útil para separar las hemoglobinas normales (A, A₂ y F), además algunas hemoglobinas anormales, tales como, HbS, HbE, HbC y HbD. Determinados tipos de hemoglobina, debido a que poseen una intensidad de carga similar, migran prácticamente al mismo nivel cuando se separan por este tipo de electroforesis.
2. **Electroforesis de hemoglobina a pH ácido (6,0):** Emplea un soporte de gel de poliacrilamida. Es especialmente útil para separar la HbS de la HbD y la HbC de la HbE y permite diferenciar perfectamente la HbA de la HbF.

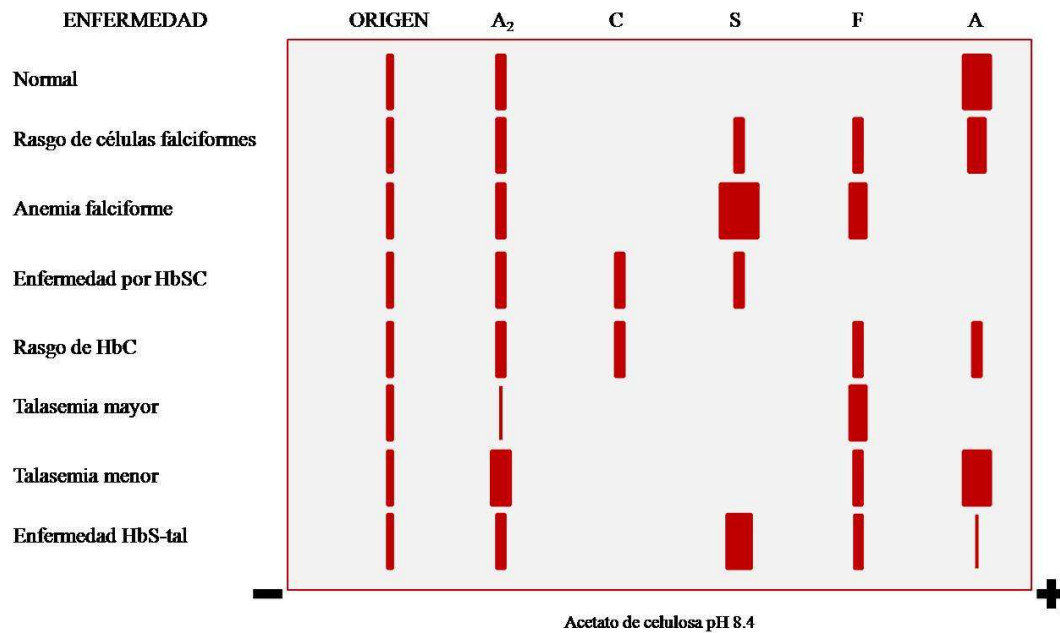


Fig. No. 35. Electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa en medio alcalino, que muestra el patrón de corrimiento de algunas hemoglobinopatías.

Fundamento

La característica principal de la HbS es la de disminuir su solubilidad en medios hipóxicos, por lo cual al colocar una gota de sangre y un agente reductor como el metabisulfito de sodio para generar un ambiente hipóxico mediante el bloqueo de la entrada de oxígeno sellando la preparación, los eritrocitos que poseen HbS adoptarán la forma falciforme por la polimerización de las moléculas de Hb y su cristalización en tactómeros, permitiendo que los drepanocitos sean identificables por medio del microscopio.

Material

- Sangre capilar o venosa anticoagulada
- Lancetas
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio
- Parafina o vaselina

Reactivos

- Metabisulfito de sodio al 2% (recién preparada)
- Solución Salina 0.85%

Procedimiento

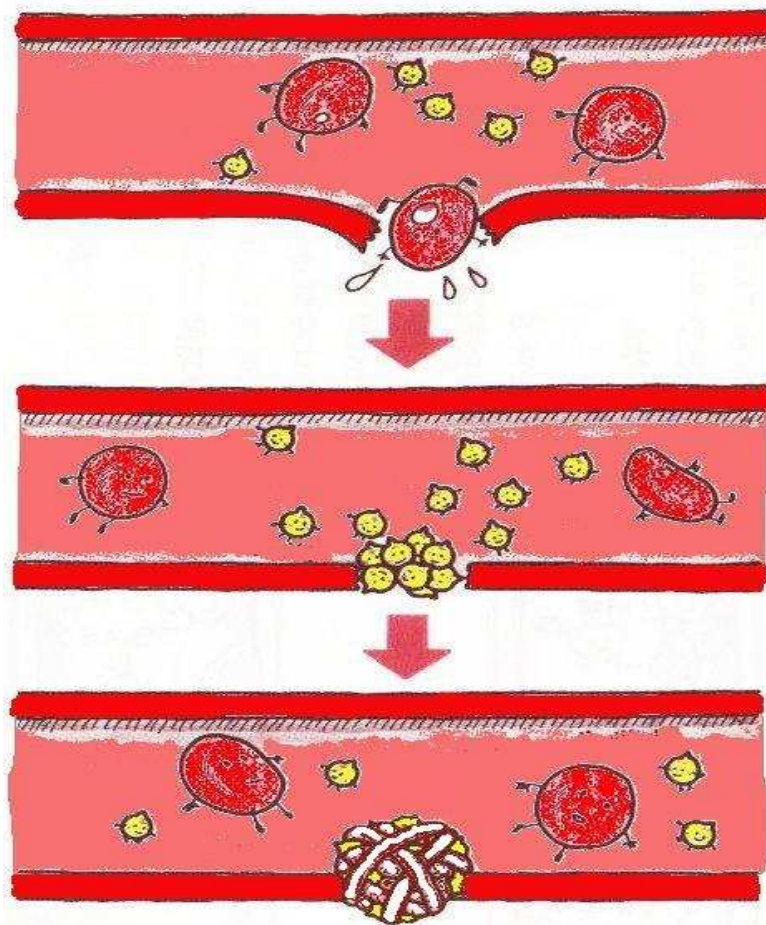
1. Recolectar 3 ml de sangre venosa con EDTA o utilizar sangre capilar.
2. Colocar una pequeña gota de sangre venosa o capilar en un portaobjetos.
3. Adicionarle 1 gota de metabisulfito de sodio al 2%.
4. Mezclar bien y colocar un cubreobjetos, tratando de que no se formen burbujas. El exceso de sangre se elimina con un papel filtro, ejerciendo una suave presión sobre el cubreobjetos.
5. Sellar los bordes del cubreobjetos con vaselina o parafina.
6. Montar otra preparación semejante como se indican desde el paso 3 al 5, pero en lugar de agregar metabisulfito de sodio al 2% poner solución salina al 0.85% (servirá de control).
7. Observarlos inmediatamente al microscopio, después a los 15 y 30 minutos, hasta llegar a las 2 horas. *Para dar la prueba como negativa la observación debe continuarse, observándose por periodos de tiempo mayor hasta completar las 24 horas.*

Interpretación

Cuando la prueba es positiva, del 10 al 100% de los eritrocitos adoptan disposición falciforme en 15 a 30 minutos.

MÓDULO V

Hemostasia



FISIOLOGÍA GENERAL DE LA HEMOSTASIA

La hemostasia es un conjunto de procesos bioquímicos independientes que al interactuar entre sí mantienen la integridad de los vasos sanguíneos para prevenir o detener una hemorragia y así conservar la fluidez de la sangre circulante.

Para que la hemostasia se lleve a cabo después de una lesión, es necesario que intervengan cuatro factores:

- a) Endotelio vascular
- b) Plaquetas
- c) Proteínas plasmáticas (Factores e inhibidores de la coagulación)
- d) Sistema fibrinolítico

1) Endotelio vascular

La integridad estructural de los vasos sanguíneos es fundamental para prevenir las hemorragias. Cuando existe una lesión vascular, se produce una vasoconstricción local que contribuye al cese de la hemorragia y al exponerse el subendotelio proporciona el principal estímulo para la coagulación, pues este sirve como sustrato para la adhesión plaquetaria y su posterior agregación. Las proteínas que se encuentran en el subendotelio son: el colágeno, la fibronectina, la vitronectina, la trombospondina, la laminina, factor tisular (FT) y el factor de von Willebrand (FvW). Además el endotelio sintetiza moléculas tales como: la prostaciclina, el ácido 13-hidroxioctadenoico y el óxido nítrico, que inhiben la agregación plaquetaria.

2) Plaquetas

En condiciones normales las plaquetas circulan por la luz de los vasos sanguíneos con su característica forma de disco, sin embargo cuando ocurre una lesión en el endotelio se desencadenan una serie de eventos bioquímicos que dan inicio al proceso de coagulación. En este proceso de formación del trombo se diferencian diversas etapas secuenciales:

1. Adhesión plaquetaria al colágeno por acción de la glucoproteína (GP) Ib/IX y el FvW.
2. Activación o cambio de forma de las plaquetas de su forma discoidea a esferas grandes con múltiples pseudópodos. También se inicia la actividad intracelular.
3. Agregación plaquetaria por unión de las GPIIb/IIIa y el fibrinógeno de manera intraplaquetaria.
4. Secreción plaquetaria para el reclutamiento de más plaquetas por acción de la trombina, el tromboxano A₂ y el ADP, principalmente.
5. Formación del tapón hemostático primario por las plaquetas que sella la lesión y evita la pérdida de sangre adicional.

3) Factores de la coagulación

Son un grupo de proteínas plasmáticas (Tabla 24) que intervienen para estabilizar el tapón hemostático primario. Estas proteínas son de tres tipos:

- Proteínas estructurales: Proteínas cuya función lleva a la contracción de la estructura del trombo para estabilizarlo. Pertenecen a este grupo el fibrinógeno, el FvW y el factor tisular (FT).
- Zimógenos: Proteínas inertes que requieren de otra proteína para su activación y que estas a su vez puedan activar otras proteínas. En su estado inerte son solubles en el plasma y cuando se activan se hacen insolubles. Pertenecen a este grupo el factor XIII, factor XII, factor XI, factor X, factor IX, factor VII, factor II y proteína C.
- Inhibidores de proteínas: Proteínas cuya función es evitar que una proteína pueda actuar sobre otra. Pertenecen a este grupo la proteína S, activador tisular del plasminógeno, antitrombina III.

Las proteínas que intervienen en la coagulación pueden clasificarse también en función a sus características y a su estabilidad por acción de la temperatura:

- Factores dependientes de la vitamina K: Son proteínas sintetizadas únicamente en el hígado y que requieren de la acción de la vitamina K para su activación al carboxilar el carbono gamma de los residuos de ácido glutámico en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica. Sin esta carboxilación no pueden unirse a los fosfolípidos de las plaquetas mediante puentes de calcio. Pertenecen a este grupo los factores X, IX, VII y II.
- Factores independientes de vitamina K: Proteínas que actúan en ausencia de la vitamina K, ya que no dependen del calcio para realizar su función. A este grupo pertenecen los factores XIII, XII, XI, VIII, V y I.
- Factores lábiles: vW, VIII y V.
- Factores estables: XIII, XII, XI, X, IX, VII, II y I.

Mecanismo de la coagulación

Existen varias teorías que tratan de explicar el mecanismo de la coagulación:

- *Teoría de Seegers*: Fue una de las primeras teorías pero debido a su complejidad se abandonó con rapidez.
- *Teoría de la cascada de Biggs, Douglas y McFarlane* (Figura 36): Esta teoría sostiene que los factores de la coagulación circulan en la sangre de forma inerte, y que cuando estos se activan desencadenan reacciones secuenciales, donde cada proteína activada sirve de cofactor para activar otras proteínas y así sucesivamente hasta lograr la estabilización del tapón hemostático. Esta teoría es la más empleada para el estudio de la coagulación en el laboratorio (*in vitro*), pues a partir de esta teoría se estableció que existen dos vías para la coagulación, las cuales convergen en una vía común:
 - Vía extrínseca. Se denomina extrínseca porque requiere para su inicio la presencia del factor hístico o tisular (proteína transmembranal), puesto de manifiesto tras la lesión del endotelio. Se inicia con la formación de un complejo entre el factor tisular y el factor VII en presencia de Ca^{++} , lo cual produce la activación del factor X. Este, una vez activado (Xa), junto con el factor V y Ca^{++} , transforman la protrombina (II) en trombina (I).

- Vía intrínseca. Esta vía fue denominada intrínseca debido a que no requiere del factor tisular para generar actividad procoagulante. Su inicio tiene lugar con la activación parcial del factor XII en el momento que la sangre entra en contacto con alguna superficie de carga negativa (vidrio y algunas otras sustancias). Una vez activado el factor XII (XIIa) ejerce una actividad proteolítica sobre la precalicreína para transformarla en calicreína, la cual, a su vez, tiene efecto proteolítico sobre el propio factor XIIa. El factor XIIa produce activación inmediata del factor XI, el cual en presencia de Ca^{++} , activa el factor IX para que pueda formar un complejo con los fosfolípidos plaquetarios, el factor VIII y Ca^{++} , capaz de activar el factor X. Este, una vez activado (Xa), junto con el factor V y Ca^{++} , transforman la protrombina (FII) en trombina (FI).

Esta teoría no explica la coagulación *in vivo*.

- *Teoría del “shunt”*: Teoría que trató de demostrar que solo existía una vía para la coagulación sanguínea, al demostrar que parte de la vía intrínseca se activa mediante la vía extrínseca, por lo cual solo existe el mecanismo intrínseco. Más que una teoría solo se trataba de demostrar una derivación del mecanismo de la coagulación *in vivo*.
- *Teoría de los complejos o modelo celular*: De reciente surgimiento explica la coagulación sanguínea en etapas. Mediante la formación de complejos que interactúan unos con otros se logra activar cada uno de los factores de la coagulación hasta conseguir la formación de trombina. Todo este proceso se desarrolla sobre la superficie de las células con una activación plasmática lenta. Se conocen cuatro complejos:
 - **Complejo tisular**: Se integra por el FT y el FVIIa (unido a los fosfolípidos de las plaquetas) y activan al FX.
 - **Complejo tenaza**: Se forma por el FIXa y FX unidos a los fosfolípidos de las plaquetas y el FVIII que no está unido a los fosfolípidos y que necesita de la trombina para activarse.
 - **Complejo protrombinasa**: Integrado por el FXa, el FII unidos a los fosfolípidos mediante puentes de calcio y el FVa.
 - **Complejo inhibidor**: Constituido por la trombomodulina y la proteína S para activar la proteína C.

La finalidad de todos los modelos para la coagulación es explicar las transformaciones bioquímicas que ocurren durante la formación de fibrina, siendo las dos teorías más importantes, el modelo de la cascada, pues esta explica de manera práctica la coagulación sanguínea <<*in vitro*>>, y el modelo celular que logra explicar la coagulación <<*in vivo*>>.

Tabla No. 24. Características de los factores de coagulación

Factor	Nombre	Peso molecular (KDalton)	Actividad funcional	Vida media biológica	Sitio de síntesis	Dependencia de vitamina K	Niveles plasmáticos
I	Fibrinógeno	340	Estructural	90h	Hígado	No	200-400 mg/dL
II	Protrombina	72	Proteasa de serina	60h	Hígado	Si	10-15 mg/dL
V	Proacelerina	330	Cofactor	12-36h	Hígado	No	0.5-1.0 mg/dL
VII	Proconvertina	48	Proteasa de serina	4-6h	Hígado	Si	0.1 mg/dL
VIII:C	Factor antihemofílico	70-240	Cofactor	12h	Hígado	No	1-2 mg/dL
IX	Componente de tromboplastina plasmática	57	Proteasa de serina	20h	Hígado	Si	4 µg/dL
X	Factor de Stuart-Prower	58	Proteasa de serina	24h	Hígado	Si	0.75 mg/dL
XI	Antecedente de tromboplastina plasmática	160	Proteasa de serina	40h	Hígado	No	1.2 mg/dL
XII	Factor de Hageman	80	Proteasa de serina	48-52h	Hígado	No	0.1 mg/dL
XIII	Factor estabilizador de fibrina	320	Transglutaminasa	48-52h	Hígado	No	2.5 mg/dL
Precalicroína		80	Proteasa de serina	6.5 días	Hígado	No	0.29 mg/dL
Cinínógeno de alto peso molecular		120	Cofactor	3-5 días	Hígado	No	0.70 mg/dL
Antitrombina III		68	Inhibidor de proteasa	2.5 días	Hígado	Si	4 mg/dL
Proteína C		62	Proteasa de serina	8-12h	Hígado	Si	4-5 µg/dL

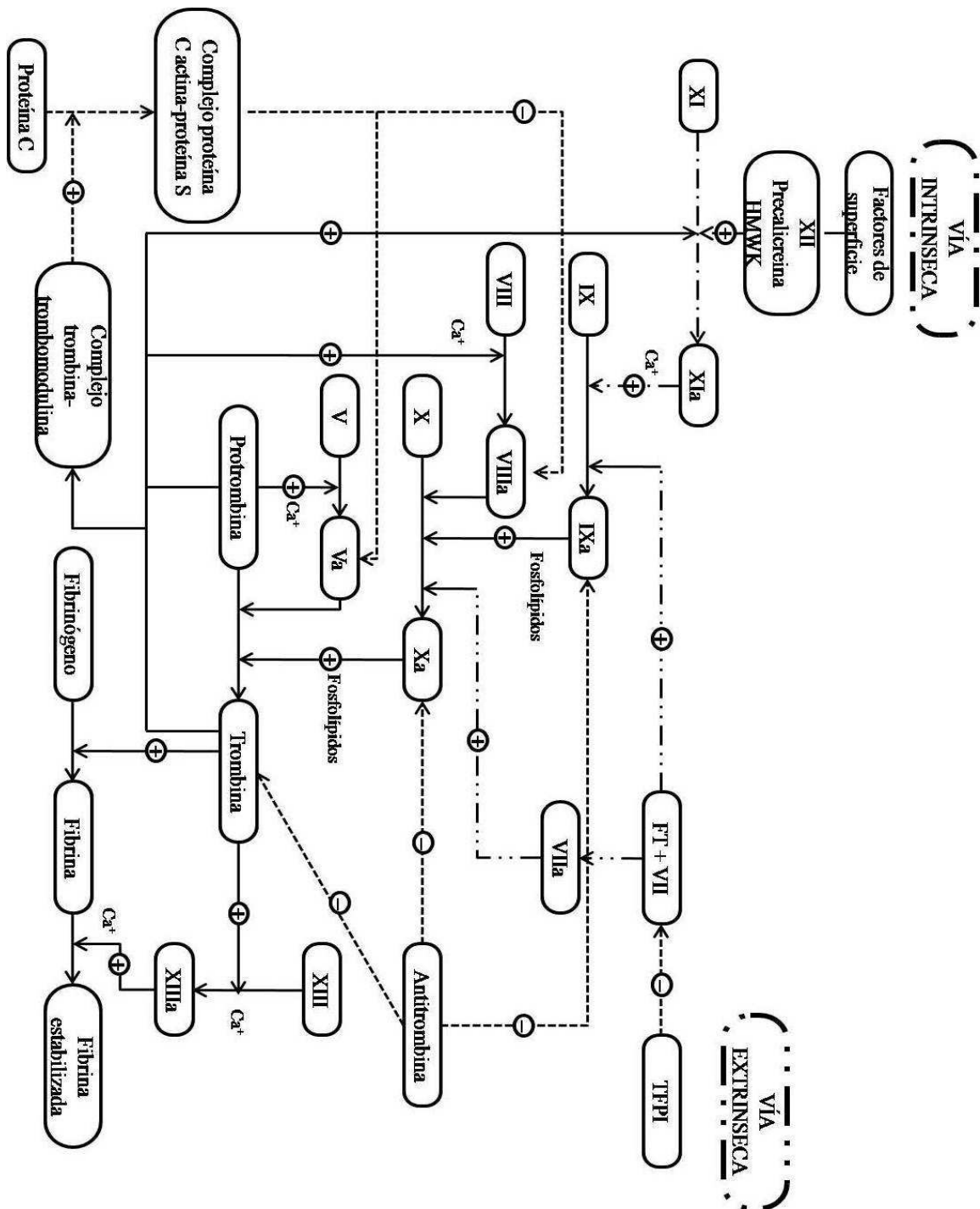


Fig. No. 36. Modelo de la cascada de la coagulación e inhibidores de la coagulación. La vía extrínseca se inicia con la exposición del factor tisular (FT) en el subendotelio y culmina con la activación del factor X (FX). La vía intrínseca se inicia con la activación del factor XI (FXI) por acción de los cininógenos de alto peso molecular y la Precalicerina y termina con la activación del factor FX. La vía común inicia con la activación del FX y termina con la formación de fibrina. Como todos los factores de la coagulación se interrelacionan unos con otros la vía intrínseca y extrínseca no pueden funcionar de manera independiente una de otra.

4) Sistema fibrinolítico

La formación de fibrina es el objetivo de la hemostasia, por lo cual para evitar su formación excesiva es necesaria la activación del sistema fibrinolítico mediada por la plasmina. La plasmina fragmenta las cadenas de fibrina en productos de degradación de la fibrina o PDF (Figura 37). El mecanismo fibrinolítico se desencadena una vez que se estabiliza el coágulo a diferencia de los demás mecanismos de inhibición que interaccionan con los factores de coagulación para regular el proceso.

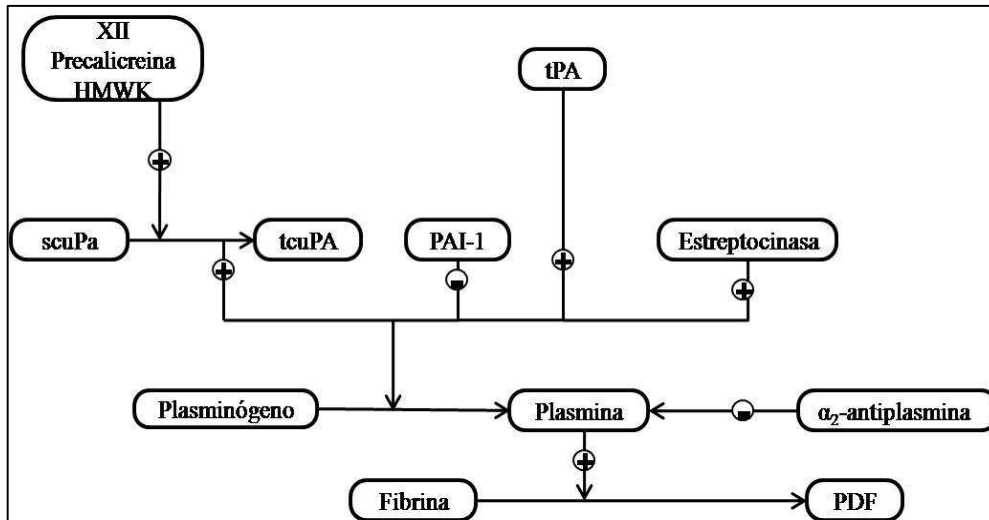


Fig. No. 37. Sistema fibrinolítico

scuPA = prourocinasa

tcuPA = urocinasa

tPA= activador del plasminógeno de tipo tisular

PAI-1= inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1.

Recomendaciones generales para el laboratorio de coagulación

Los buenos resultados en las pruebas de coagulación dependen en su totalidad de la calidad de la muestra, por lo cual es indispensable minimizar el traumatismo durante la flebotomía para prevenir la hemólisis. La sustitución de tubos de vidrio por tubos de plástico disminuye la activación de los factores XII y VII al entrar en contacto con la superficie del tubo.

El anticoagulante de elección para casi todas las pruebas de coagulación es el citrato de sodio a una concentración de 3.2% y una proporción de un volumen de anticoagulante por 9 volúmenes de sangre, pues presenta ventajas sobre los demás anticoagulantes, por tener una osmolalidad más cercana a la del plasma y porque esta concentración se emplea como promedio del intervalo normal en el cálculo del Índice Normalizado Internacional o Radio Normalizado Internacional (INR por sus siglas en inglés).

Una vez que la sangre entra en contacto con el tubo ocurren cambios bioquímicos con los cuales el factor VIII comienza a degradarse con rapidez, por lo cual el NCCLS recomienda que el tiempo para determinar el tiempo de protrombina (TP) no exceda las 24 horas y que para determinar el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) el tiempo no sea mayor a las 4 horas.

Si las muestras no se procesan inmediatamente después de su extracción es recomendable separar el plasma del paquete globular por centrifugación mínimo 10

minutos a 3500 rpm y almacenarla por no más de 2 horas a 4°C, pues así como a temperatura ambiente se inactivan parcialmente los factores V y VIII, la refrigeración prolongada activa el factor VII. Por lo cual para evitar la inactivación o activación de algunos factores es preferible congelar el plasma y almacenar a -20°C hasta su análisis.

Al igual que para toda prueba analítica, la exactitud y precisión de los resultados se controlan mediante el empleo de procedimientos de aseguramiento de la calidad, como la calibración de nuevos lotes de reactivos y el empleo de controles comerciales (mínimo 2 niveles), recordando que la repetición de un estudio de coagulación no mejora la precisión ni la exactitud de la prueba.

TIEMPO DE SANGRADO

Es una prueba sencilla que permite evaluar la hemostasia primaria <<*in vivo*>>. Consiste en medir el tiempo transcurrido desde la realización de una pequeña incisión cutánea hasta que cesa la hemorragia.

Esta técnica fue introducida por primera vez en 1910 por Duke realizando la incisión en el lóbulo de la oreja; sin embargo es poco sensible y menos reproducible que el método de Ivy.

En 1935 Ivy introdujo su propia técnica al emplear un baumanometro y realizando la incisión en la cara anterior del antebrazo, con lo que consiguió una mayor sensibilidad y reproducibilidad de los resultados.

Fundamento

Esta prueba mide la habilidad de los pequeños vasos para responder a una lesión, lo que depende de la integridad de la pared vascular, de su capacidad constrictora y del número y calidad de las plaquetas que formarán el tapón hemostático.

Material

- Sangre capilar
- Lancetas
- Cronómetro
- Papel filtro

Reactivos

- No son necesarios para esta prueba

Procedimiento

Método de Duke

1. Se limpia el lóbulo de la oreja con isopropanol al 70% sin presionar ni o masajear vigorosamente.
2. Dejar secar perfectamente la región limpia.
3. El lóbulo de la oreja debe de estar caliente antes de la punción.
4. Se hace una punción en el área adecuada (Figura 38) en el lóbulo de la oreja, a una profundidad de unos 3 mm con una lanceta estéril adecuada.
5. Tan pronto como se realiza la punción y se observa que empieza a fluir la sangre, se pone en marcha el cronómetro.
6. La sangre debe salir libremente y el lóbulo no se debe comprimir.
7. Absorber la gota de sangre con un trozo de papel filtro cada 15 segundos, procurando de no tocar la superficie del lóbulo de la oreja o de manipular la lesión.
8. El cronómetro se detiene hasta que el papel filtro ya no se manche con la sangre o que no sangre más.

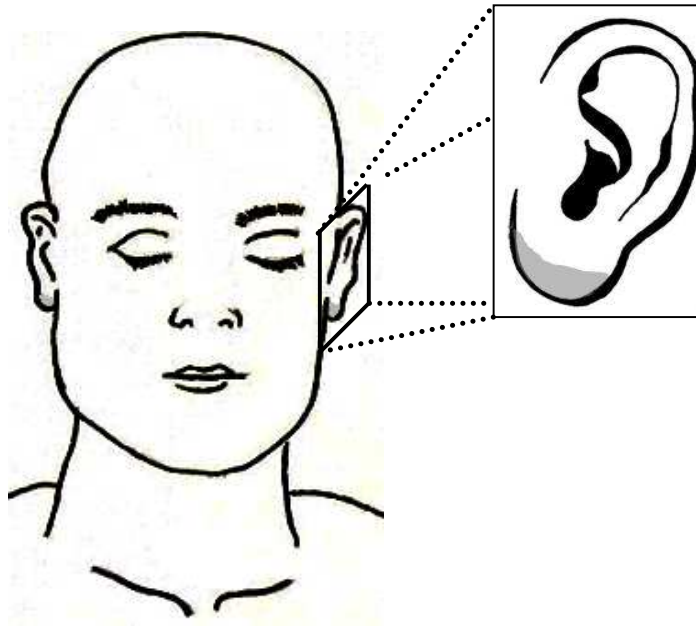


Fig. No. 38. Zona de punción para el método de Duke (zona gris).

Valores de referencia

- 1 a 3 minutos.

Interpretación semiológica

Esta prueba suele ser prolongada en los estados trombocitopénicos, en la enfermedad de Von Willebrand, en algunas deficiencias hereditarias de factores plasmáticos como el V y el VIII (esto es variable y pueden obtenerse valores normales) y en trombotopatías.

El tiempo de sangrado es normal en hemofilia A y B, en hipoprotrombinemia y en general en la hipofibrinogenemia hereditaria.

Luego de la ingesta de aspirina el tiempo de sangría se prolonga, por lo que debe tenerse la certeza de que el paciente no la ingirió.

TIEMPO DE COAGULACIÓN DE SANGRE TOTAL

El tiempo de la coagulación sanguínea es una prueba muy poco sensible y nunca se debe utilizar como prueba selectiva. Se usa a menudo para guiar la terapéutica con heparina, pero los resultados obtenidos son a menudo inseguros, por esto son preferibles pruebas como el tiempo de tromboplastina parcial activada. A pesar de ello, el tiempo de coagulación sanguínea se realiza en la mayoría de los laboratorios a causa de que se pueden obtener muchos datos de la inspección periódica del coágulo.

Fundamento

El tiempo necesario para que la sangre se coagule en un tubo de cristal es la medida de la actividad total del sistema intrínseco de la coagulación. La inspección periódica del coágulo permite la valoración de las propiedades físicas del mismo (tamaño, aspecto y fuerza mecánica), su estabilidad, ritmo y extensión de su retracción.

Material

- Sangre capilar
- Capilares sin heparina (orilla azul)
- Lancetas estériles
- Baño María a 37°C
- Termómetro
- Cronómetro

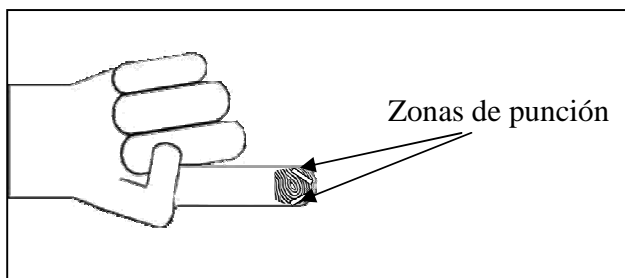
Reactivos

- No son necesarios para esta prueba

Procedimiento

Método capilar

1. Limpiar la zona de punción con una torunda con alcohol (de preferencia el pulpejo del dedo anular).
2. Dejar que el alcohol se seque.
3. Puncionar hasta una profundidad de 3mm con una lanceta estéril. Poner en marcha el cronómetro.



4. Se desecha la primera gota de sangre, a continuación se llena un capilar sin heparina hasta las dos terceras partes.
5. A partir del tercer minuto de la punción, se invierte el capilar constantemente hasta observar que no haya desplazamiento de la sangre. Si es necesario, se rompe el capilar para observar el tiempo en que se forman los hilos de fibrina o en su defecto, tratar que una gota de

desplazamiento de la sangre. Si es necesario, se rompe el capilar para observar el tiempo en que se forman los hilos de fibrina o en su defecto, tratar que una gota de

la punta caiga sobre un papel, para poder observar si se ve un hilo entre el capilar y el papel (Figura 40).

6. Si ya no hay desplazamiento o se observan los primeros hilos de fibrina, es el momento en que se detiene el cronómetro.

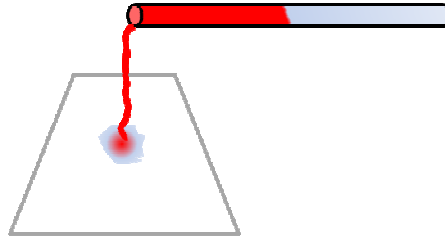


Fig. No. 40. Visualización del hilo de fibrina que se forma entre el papel y el capilar con sangre.

Valores de referencia

- Los valores oscilan entre 3 a 5 minutos.

Interpretación semiológica

Un tiempo de coagulación normal no descarta la existencia de un trastorno de la coagulación, pero un tiempo prolongado es siempre índice de un defecto severo de la misma, que puede deberse a una deficiencia de cualquiera de los factores que intervienen en la formación del coágulo de fibrina, con excepción de una deficiencia pura de los factores VII y XIII; pero el método es mucho más sensible a los defectos de los factores que intervienen en la activación por contacto y en la formación del activador intrínseco de la protrombina. Solo se prolonga cuando la deficiencia es muy grave, por ejemplo, deficiencia de:

- Fibrinógeno (Factor I)
- Protrombina (Factor II)
- Factor V
- Factor VIII
- Factor IX
- También en presencia de anticoagulantes circulantes o exceso de heparina.

Esta prueba no se ve influenciada por los niveles de factor VII.

En la hemofilia (A o B) se encuentra prolongando si los niveles son suficientemente bajos.

La prueba carece de valor para las insuficiencias ligeras de distintos factores, por que basta una cantidad pequeña de trombina para producir un coágulo de fibrina. Es menos útil para las anomalías de las últimas etapas de la coagulación (factores V, X o II), pues dichas etapas son rápidas en comparación con las primeras. La trombocitopenia no afecta en los tiempos de coagulación ya que se requiere de un mínimo de plaquetas para iniciar el proceso de coagulación.

RETRACCIÓN DEL COÁGULO

Cuando se produce una lesión en un vaso sanguíneo se pierde sangre, inmediatamente se activa el proceso hemostático para formar un coágulo que tape la lesión y limitar el sangrado. Durante este proceso, se forma fibrina. Estas hebras se entrecruzan (gracias a la trombina) para formar una red de fibrina que atrapa a las plaquetas y que a la vez ayuda a mantener el coágulo que se forma en el lugar de la lesión. El tapón hemostático inicial o primario está formado por plaquetas y posteriormente cuando el sistema de coagulación se activa; se forma el tapón hemostático secundario (coágulo de fibrina) y ocurre la retracción del coágulo para formar un tapón hemostático más efectivo. Cuando ocurre esta retracción <<*in vivo*>> el plasma que se encuentra atrapado entre las células es expulsado, dejando un tapón casi exclusivamente de puras plaquetas envuelto en una malla de fibrina, por lo cual esta prueba se emplea para evaluar:

1. La concentración de fibrinógeno.
2. La formación de fibrina y su estabilización.
3. La cantidad y capacidad contráctil de las plaquetas para regresar a su forma original por la acción de sus proteínas estructurales (actina) para compactar el coágulo.
4. La actividad fibrinolítica.

Este proceso ocurre en el organismo para que la presión en el flujo sanguíneo se normalice, pues el tapón plaquetario debe permanecer en el sitio hasta que los fibroblastos reparen la lesión.

Fundamento

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

Material

- Sangre venosa
- Tubos cónicos o tubos de centrifuga graduados de 15 mL
- Alambre enroscado (1mm de grosor)
- Cronómetro
- Baño María a 37°C

Reactivos

- No son necesarios para esta prueba

Procedimiento

Prueba clásica

1. Extraer 5 mL de sangre venosa.
2. Colocar la sangre en un tubo cónico o un tubo graduado (5 mL o un volumen exactamente medido).
3. Poner en marcha el cronómetro.
4. Colocar el alambre en el tubo con sangre. En medio del alambre colocar un aplicador de madera para facilitar la adhesión del coágulo.
5. Colocar el tubo en un baño María a 37°C durante 1 hora.
6. Después de transcurrido el tiempo se saca cuidadosamente el alambre junto con el aplicador, y se deja escurrir dentro del tubo el coágulo unido al alambre durante 1 o 2 minutos.
7. Se lee el volumen del líquido que quedó en el tubo. Este volumen se anota como porcentaje del volumen inicial de sangre completa en el tubo.
8. Se calcula el porcentaje del volumen de suero que quedó en el tubo cónico con relación al volumen total inicial.

$$\begin{array}{r} 5 \text{ mL (volumen inicial) ----- } 100 \% \\ \text{Volumen de suero residual ----- } X \% \end{array}$$

Valores de referencia

- ❖ 48 – 64 % (promedio 55%)

Interpretación semiológica

Esta prueba es dependiente de:

- El número de plaquetas y su actividad funcional, aunque en algunas ocasiones no se relaciona muy bien con el número de plaquetas (en ciertas condiciones da normal aún con 30 000 plaquetas/ μ L).
- La concentración de fibrinógeno. Un aumento importante de fibrinógeno reducirá la retracción por efecto de volumen, mientras que lo opuesto ocurre en casos de hipofibrinogenemia.

Cuando la cantidad de fibrinógeno está reducida, el coágulo puede ser muy pequeño.

En presencia de una actividad fibrinolítica activa puede disolverse el coágulo: choque, quemaduras, etc.

Con un valor bajo del hematocrito, la masa del coágulo será proporcionalmente pequeño y puede dar valores muy elevados.

La retracción del coágulo está alterada si hay trombocitopenia y trombostenia de Glanzman (alteración funcional). La eritrocitosis también interfiere en la retracción del coágulo, así como el aumento de la tasa de fibrinógeno. La anemia facilita la retracción.

TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA (TTPa)

Constituye una medida del sistema intrínseco de coagulación. El TTPa depende de la totalidad de factores de la coagulación involucrados en las fases, excepto calcio, plaquetas y factores VII y XIII.

Fundamento

Es un tiempo de recalcificación del plasma sin plaquetas al que se le agrega un sustituto plaquetario (tromboplastina parcial).

El plasma del paciente provee todos los factores de coagulación, excepto el ion calcio y las plaquetas. El anticoagulante remueve el calcio de la sangre y la centrifugación, las plaquetas. La emulsión de fosfolípidos reemplaza a las plaquetas, la prueba resulta normal en presencia de deficiencias plaquetarias cualitativas o cuantitativas.

En general el TTPa se emplea para detectar valores de Factores de la primera fase de coagulación (XII, XI, IX, VIII) que para los de la fase 2 y 3. También se usa para detectar anticoagulantes circulantes.

Material e instrumentos

- Sangre venosa con citrato de sodio
- Plasma citratado pobre en plaquetas
- Pipeta Pasteur con bulbo
- Pipeta serológica de 1 mL
- Micropipetas de 100 μ L o de volumen variable
- Puntillas para micropipeta
- Asa bacteriológica limpia
- Vaso de precipitados de 100 mL
- Centrifuga
- Baño María a 37°C
- Termómetro
- Cronómetro
- Tubos de ensayo de 13x100 mm

Reactivos

- Cefalina, caolín o cualquier emulsión comercial de fosfolípidos
- Cloruro de calcio 0,025 M

Procedimiento

1. Recolectar sangre venosa en un tubo Vacutainer de tapón azul celeste y mezclar la sangre con el anticoagulante por inversión. La proporción de la sangre y el anticoagulante deben ser exactos, por lo cual el tubo debe ser llenado hasta la marca de drenado.
2. Centrifugar a 3000rpm por 20 minutos o 3500rpm durante 10 minutos. Es muy importante que la centrifugación elimine por completo las plaquetas, es decir debe obtenerse un plasma pobre en plaquetas.

3. Extraer cuidadosamente el plasma de la muestra centrifugada mediante una pipeta Pasteur y colocarlo en un tubo de ensayo de 13x100 mm.
4. En tubos diferentes y perfectamente etiquetados colocar el plasma(s) problema(s), el cloruro de calcio y el reactivo para TTP en un baño María a 37°C.
5. En un tubo de 13x100 mm limpio, seco y etiquetado adicionar los reactivos en el siguiente orden (un tubo para n-muestras que se deseen medir):

Tabla No. 25. Procedimiento para el TTPa

Reactivos	Cantidad (µL)
Emulsión comercial de fosfolípidos	100
Plasma problema	100
Incubar la mezcla exactamente 2 minutos	
CaCl ₂ 0.025 M	100
Poner en marcha el cronómetro en el momento en que se adiciona el calcio.	
Agitar brevemente para homogeneizar el contenido, mantener en el baño unos 25 segundos.	

6. Se examina la reacción de la mezcla a intervalos de 1 á 2 segundos para comprobar la coagulación; inclinando lentamente el(los) tubo(s) de manera que la mezcla alcance cerca de la mitad del tubo y con una asa bacteriológica, perfectamente limpia, tratar de jalar el plasma para poder observar la formación de la fibrina.
7. Detener el cronómetro.
8. El tiempo de coagulación es el intervalo entre la adición del calcio y la aparición de las primeras trazas de fibrina en la mezcla.
9. Es esencial por lo menos usar un control normal y realizar todas las pruebas por triplicado⁴.

Valores de referencia

El tiempo normal de TTPa es de 32-46 segundos. Estos valores deben corregirse para cada laboratorio de acuerdo con los obtenidos por mezclas de plasmas frescos normales y con los reactivos usados.

Interpretación semiológica

El TTPa de 50 segundos superior al control normal se considera anormal. La prueba esta prolongada en las deficiencias de uno o más de los Factores XII, XI, X, VIII, V, II y I.

Debido a que la prueba es más sensible a la deficiencia de los factores de contacto, está se hace especialmente dependiente de la concentración del FVIII, de manera que elevaciones reactivas en este factor, pueden enmascarar deficiencias moderadas de otros factores.

<<*In vivo*>> la deficiencia de los factores de contacto no representan un riesgo hemorrágico, sin embargo en el laboratorio esto se ve reflejado en la prolongación del

⁴ Este paso dependerá de la carga de trabajo y únicamente cuando se trate de procedimientos manuales, en un proceso automatizado solo se repiten las muestras que salen de los valores de referencia y en base a los criterios del laboratorio.

TTPa y cuya anomalía es un simple hallazgo de laboratorio cuando el paciente no presenta cuadros hemorrágicos.

El TTPa es muy sensible a la presencia de heparina fraccionada, por lo cual es la prueba de elección para dar seguimiento a los pacientes en tratamiento con este anticoagulante.

Las cinco causas más comunes de un TTPa prolongado son:

1. CID (coagulación intravascular diseminada);
2. Hepatopatías;
3. Hemaferesis múltiples con sangre almacenada;
4. Tratamiento con heparina;
5. Presencia de un anticoagulante o inhibidor circulante (comúnmente anticoagulante lúpico).

Cuando los tiempos son anormales, es recomendable realizar pruebas de sustitución o corrección para orientar al médico, en cuanto a si la alteración es por la presencia de un inhibidor circulante o por deficiencia de algún factor; sin embargo frecuentemente se efectúan pruebas confirmatorias específicas para cada factor y se pasan por alto las pruebas de corrección por que consumen mucho tiempo.

Pruebas de corrección de TTPa y TP

La corrección de TTPa y TP implica mezclar el plasma problema con una serie de derivados sanguíneos con un contenido conocido del factor. Los componentes sanguíneos comúnmente usados son cuatro: plasma normal, suero, plasma adsorbido con sulfato de bario y plasma envejecido (Tabla 26).

Tabla No. 26. Derivados sanguíneos para las pruebas de corrección de TTPa y TP y los factores que contienen cada uno

Derivado	Factores presentes	Factores ausentes
Plasma normal	I, II, III, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII	Ninguno
Suero	VII, IX, X, XI, XII	I, V, VIII, XIII*, II*
Plasma adsorbido	I, V, VIII, XI, XII, XIII	II, VII, IX, X
Plasma envejecido	I, II, III, VII, IX, X, XI, XII, XIII	V, VIII

*Puede estar presente, pero en concentraciones bajas.

En la tabla 27 se presentan los factores deficientes detectados por las pruebas de corrección. Las anomalías detectadas deben ir seguidas por pruebas específicas para la detección de cada factor.

Tabla No. 27. Pruebas de corrección para el TTPa y el TP

Deficiencia del factor	TP	TTPa	Plasma normal	Plasma envejecido	Suero	Plasma adsorbido
X	Anormal	Anormal	Corrige TP	Corrige TP	Corrige TP	No corrige TP
V	Anormal	Anormal	Corrige TP y TTPa	No corrige TP y TTPa	No corrige TP y TTPa	Corrige TP y TTPa
II	Anormal	Anormal	Corrige TP y TTPa	Corrige TP y TTPa	No corrige TP y TTPa	No corrige TP y TTPa
I	Anormal	Anormal	Corrige TP y TTPa	Corrige TP y TTPa	No corrige TP y TTPa	Corrige TP y TTPa
VII	Anormal	Normal	Corrige TP	Corrige TP	Corrige TP	No corrige TP
XII	Normal	Anormal	Corrige TTPa	Corrige TTPa	Corrige TTPa	Corrige TTPa
XI	Normal	Anormal	Corrige TTPa	Corrige TTPa	Corrige TTPa	Corrige TTPa
IX	Normal	Anormal	Corrige TTPa	Corrige TTPa	Corrige TTPa	No corrige TTPa
VIII	Normal	Anormal	Corrige TTPa	No corrige TTPa	No corrige TTPa	Corrige TTPa

Ejemplo: tomaremos como ejemplo la Tabla 27 y la fila que está sombreada indicando que el Factor VIII se encuentra deficiente. Se utilizará la información descrita en la Tabla 28.

Tabla No. 28. Ejemplo del factor VIII que se encuentre deficiente en una muestra

PRUEBA	FACTORES MEDIDOS							
1) TP	I	II	V	X	VII			Normal
2) TTPa	I	II	V	VIII	IX	XI	XII	Anormal
3) Hasta este punto se eliminan los factores que coinciden (se encuentran tachados), quedando como factores sospechosos: VIII, IX, XI y XII (los factores X y VII se encuentran aparentemente presentes ya que la prueba de TP resulto normal y además, son factores que no coinciden con la prueba del TTPa). Al plasma problema se les adiciona plasma adsorbido y suero, respectivamente, resultando lo siguiente al TTPa:								
4) Plasma normal adsorbido	I	V	VIII	XI	XII	XIII		Corrige TTPa
5) Suero Normal	VII	IX	X	XI	XII	XIII		No corrige TTPa
6) En el paso 4 estamos adicionando esos factores y la prueba corrige, por lo que nos indica que los factores sospechosos son: VIII, IX, XI, XII y XIII pero en el paso 5 estamos agregando el IX, XI, XII y XIII y la prueba no corrige, indicando así, que esos factores no son los deficientes. El único factor que queda y que al ser adicionado corrige la prueba es el VIII . Los demás ejemplos se analizan de la misma manera.								

TIEMPO DE PROTROMBINA (TP)

El procedimiento del TP permite evaluar la generación de trombina y la formación de fibrina en la vía extrínseca. El TP es sensible especialmente a las deficiencias del FVII y a los factores involucrados en la vía común (FII, FV, FX). En presencia de iones calcio, la tromboplastina tisular forma complejos con el FVII y lo activa, ofreciendo una superficie para la activación de los factores X, V y II. Los resultados para esta prueba pueden variar de laboratorio a laboratorio en función de la tromboplastina comercial empleada, por tal motivo la OMS diseñó un método de estandarización para evitar discrepancias en los resultados de un mismo paciente en tratamiento con anticoagulantes.

Fundamento

Cuando se añade calcio y un extracto hístico, el Factor VII reacciona con el Factor hístico y se forma un producto que convierte el Factor X en su forma activa, el Factor Xa; este a su vez, reacciona con el Factor V, con el calcio y con los fosfolípidos del Factor hístico para formar la protrombina extrínseca que convierte la protrombina en trombina. Entonces, la trombina convierte el fibrinógeno de los Factores V, VII, X, protrombina (II) y fibrinógeno (I), y esta prueba mide la actividad total de estos Factores.

Material e instrumentos

- Sangre venosa anticoagulada
- Plasma citratado pobre en plaquetas
- Pipeta Pasteur con bulbo
- Pipetas serológica de 1 ml
- Micropipetas de 100, 200 μ L o de volumen variable
- Puntillas para micropipeta
- Asa bacteriológica limpia
- Vaso de precipitados de 100 ml
- Centrífuga
- Baño María a 37°C
- Termómetro
- Cronometro

Reactivos

- Tromboplastina Hística Comercial⁵

Procedimiento

1. Recolectar 4,5 mL de sangre venosa en un tubo Vacutainer de tapón azul celeste. La proporción de sangre y anticoagulante deben ser exactos.
2. Homogenizar perfectamente bien la sangre, mediante inversión del tubo.

⁵ Existen en el comercio extractos liofilizados de placentas humanas. La adición de estabilizadores garantiza una preparación rápida de una suspensión estable. Este extracto liofilizado ya contiene al ion calcio, que está adaptado a los requerimientos de la prueba. (Por ejemplo: THROMBOREL S).

3. Centrifugar 20 minutos a 3000 rpm o 10 minutos a 3500 rpm. Es muy importante que la centrifugación elimine por completo las plaquetas, es decir, debe obtenerse un plasma pobre en plaquetas.
4. Extraer el plasma de la muestra centrifugada cuidadosamente mediante una pipeta Pasteur y verterlo en un tubo de 13x100 mm.
5. En tubos separados, limpios, secos y etiquetados respectivamente colocar en un baño maría el plasma y la mezcla de la tromboplastina/calcio a 37°C, en el siguiente orden:

Tabla No. 29. Procedimiento para el TP

Reactivos	Cantidad (µL)
Plasma problema	100
Incubar el plasma a 37°C durante 1 minuto	
Mezcla de tromboplastina hística-cloruro de calcio	200
Poner en marcha el cronómetro en el momento en el que se coloca la mezcla (tromboplastina hística-cloruro de calcio).	
Agitar brevemente para homogeneizar el contenido, mantener en el baño unos 5 segundos.	

7. Sacar el tubo del baño, introducir el asa bacteriológica en la mezcla.
8. Mover el asa bacteriológica hacia arriba y hacia abajo hasta que se observe el coágulo de fibrina en el asa.
9. Detener el cronómetro.
10. Es esencial por lo menos usar un control normal y realizar todas las pruebas por triplicado.

TP como control en la terapia anticoagulante oral

Actualmente a muchos pacientes se les administra anticoagulantes orales en el tratamiento y profilaxis de trastornos trombóticos. El monitoreo de pacientes anticoagulados se hace en base en el Tiempo de Protrombina.

Debido a que el TP es muy sensible a la deficiencia del FVII, la respuesta de la prueba a la cantidad de los factores involucrados en esta vía dependerá de la tromboplastina comercial empleada, motivo por el cual la OMS desarrollo un método de estandarización denominado INR (radio o razón normalizada internacional).

Las fuentes tisulares tienen una procedencia muy variada y esto trae como consecuencia la variación de la sensibilidad y la variación del propio TP. Dadas estas circunstancias se buscó una escala común en la que se pudiera reportar el TP:

- **El Índice de Sensibilidad Internacional (ISI).** Escala diseñada para reportar el TP basado en un sistema de referencia primario.

Para cada lote de tromboplastina se determina un valor de ISI mediante una calibración frente a una preparación de referencia. Este dato lo tiene que especificar el fabricante.

El ISI asignado a cada lote de reactivo para TP se valora contra una preparación del reactivo de referencia de trabajo. Esta referencia de trabajo se calibra a su vez contra un

estándar (referencia primaria) de aceptación internacional por poseer un ISI de 1,0. Por lo cual, la tromboelastina más sensible tiene un ISI menor de 1,0 y las menos sensibles tienen un ISI mayor a 1,0.

El valor del ISI es crucial para el cálculo del INR, un mínimo error en el ISI ejerce un gran efecto en el valor del INR, ya que el ISI es el exponente en la fórmula para obtener el INR:

$$\text{INR} = \text{RP}^{\text{ISI}}$$

RP = Ratio de protrombina

ISI = Asignado por cada fabricante

El RP es una relación entre el TP del paciente y el TP normal (estándar o pool de plasmas):

$$\text{RP} = \frac{\text{TP}_{\text{paciente}}}{\text{TP}_{\text{control}}}$$

La expresión de resultados puede expresarse también mediante el empleo de la fórmula derivada de la curva obtenida por Quick:

$$\text{Actividad protrombínica (\% del normal)} = \frac{\text{K}}{\text{TP-a}}$$

TP = Tiempo de protrombina en segundos

K = 330

a = 8,7

Los valores de K son los logrados para tromboelastinas de 12 segundos. Para tiempos de protrombina normales distintos de 12 segundos debemos emplear la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad protrombínica (\% del normal)} = \frac{\text{TP normal en segundos} - 8,7}{\text{TP paciente en segundos} - 8,7}$$

En la actualidad el valor del INR es una referencia para vigilar el uso de anticoagulantes orales, por lo cual siempre debe incluirse en el informe de los estudios de coagulación, tomando en cuenta que solo es un valor útil para aquellos casos en que se esté llevando un tratamiento con anticoagulante oral (Tabla 30). Hoy en día la obtención del valor del INR es más sencillo, pues los coagulómetros automatizados calculan el valor al momento de realizar la prueba.

Tabla No. 30. Límites del INR en diversos tratamientos

INR	Condición
2,0 – 2,5	Profilaxis de trombosis venosa profunda.
2,0 – 3,0	Tratamiento de trombosis venosa profunda; tromboembolia pulmonar; infarto de miocardio; estenosis mitral; fibrilación auricular; isquemia cerebral transitoria.
3,0 – 4,5	Tratamiento de recurrencias de trombosis venosa profunda; tromboembolia pulmonar, injertos vasculares; válvulas cardíacas artificiales.

Valores de referencia

Los valores de referencia para los procesos de coagulación deben ser establecidos por cada laboratorio en base al tipo de población que atienden. Para el caso del TP los valores de referencia también van en relación a la tromboplastina empleada. En promedio el tiempo es:

- 12 – 14 segundos (dependiendo de la tromboplastina utilizada)
- % actividad del paciente⁵ > 80%
- Expresado en Radio de Protrombina⁶ $\leq 1,2$
- INR < 5

Interpretación semiológica

El TP se prolonga en los casos de deficiencia de los FVII y los factores de la vía común.

La prueba es muy sensible a la hipo o disfibrinogenemia y a cualquier trastorno de polimerización de la fibrina.

Las deficiencias de vitamina K y la terapia anticoagulante oral con dicumarínicos disminuyen los niveles de los factores dependientes de la vitamina K (FII, FVII, FIX, FX, proteína C y proteína S) prolongan el TP.

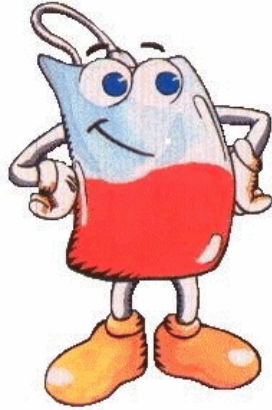
El TP también se prolonga en casos de coagulopatía grave, como en la coagulación intravascular diseminada (CID).

La presencia de anticoagulantes circulantes prolongadores del TP se describió en casos de Lupus Eritematoso, leucemia y otras enfermedades sistémicas.

Actividades

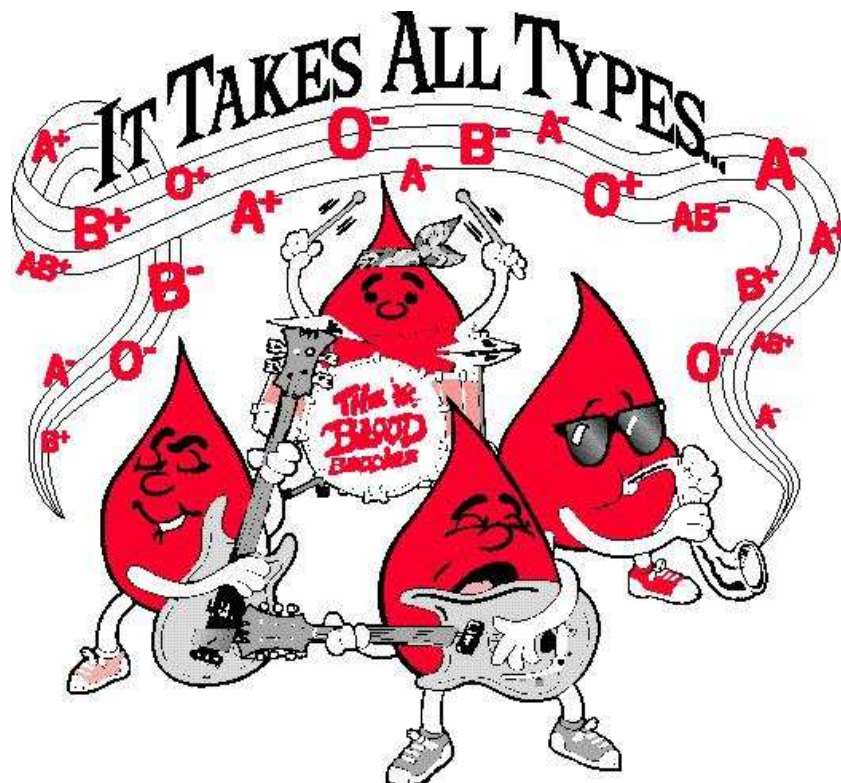
- Determinar el TP del paciente en segundos.
- Establecer el TP en segundos de la Tromboplastina utilizada (11 segundos).
- Calcular el Radio de Protrombina (RP)
- Establecer el ISI de la tromboplastina utilizada.
- Calcular el INR

⁶ Método alternativo más antiguo para reportar el TP. Se calcula multiplicando el cociente del TP del paciente y el TP control por 100.



MÓDULO VI

Inmunohematología y
Banco de Sangre



SISTEMA ABO

En 1899, Shattock informa sobre un fenómeno curioso entre eritrocitos de una persona y el suero de otra, sin embargo, no es hasta 1900 cuando Karl Landstainer, quién descubre las diferencias de la sangre entre grupos de personas y con su teoría sobre la especificidad de las reacciones serológicas, dio así inicio a la era inmunológica de la historia de la transfusión sanguínea. Este hallazgo llevó a Landstainer a establecer 3 grupos sanguíneos: A, B y O, al observar la aglutinación de los eritrocitos de una persona con el suero proveniente de otra. El descubrimiento del sistema ABO lo llevo a ser merecedor del Premio Nobel de Medicina 30 años mas tarde. Dos años después de este hallazgo, Alfredo Von Decastello y Adriano Sturdi descubren un cuarto grupo sanguíneo, el AB. Numerosos descubrimientos surgieron a partir del sistema ABO y en 1908 Ottenberg y Epstein postulan la forma de herencia sin aportación de pruebas, en el mismo año Emil von Dungern y Ludwing Hirzfeld establecen que el tipo de herencia corresponde a las leyes de Mendel.

Una nueva y excitante fase en el estudio de los grupos sanguíneos se inició a partir de 1939 con los trabajos de Levine, Landstainer y Wiener, quienes establecieron las bases para el conocimiento de un nuevo sistema: el Rh y su papel fundamental en la etiología de la enfermedad conocida como *Eritroblastosis fetal* o *Enfermedad hemolítica del recién nacido* (E. H. R. N.)

El estímulo científico desarrollado por estos descubrimientos fue de tal magnitud que dio origen al nacimiento de una nueva especialidad, la *Inmunohematología*, de la cual Landstainer fue su líder hasta 1943, cuando acaeció su muerte. La rápida expansión de la terapia transfusional y el desarrollo de métodos serológicos de mayor sensibilidad han conducido al descubrimiento de una gran variedad de grupos sanguíneos.

Se han descrito cerca de 400 antígenos de grupos sanguíneos, sin embargo el sistema ABO fue el primero de los sistemas de grupos sanguíneos y es el más importante en la medicina transfusional.

Landstainer demostró que los eritrocitos contenían por lo menos dos factores, designados como aglutinógenos A y B, con los cuales se podía explicar los cuatro grupos que existían y así postuló que cada persona podía tener uno de ellos (A o B), ambos (AB) o ninguno (O). Reconoció la presencia de anticuerpos en el suero y señaló la relación reciproca que había entre ellos y los antígenos presentes en los eritrocitos, demostrando que cuando un determinado antígeno estaba ausente, su correspondiente anticuerpo se encontraba en el suero o plasma. Así, ha quedado establecido que los antígenos del sistema ABO son los únicos para los cuales existe el correspondiente anticuerpo, siendo ello una característica constante y predecible en el suero de los individuos normales (Tabla 31).

Tabla No. 31. Antígenos y anticuerpos del sistema ABO.

Grupo sanguíneo/fenotipo	Antígenos	Anticuerpos	Genotipo
O	H	Anti-A y Anti-B	OO
A(A ₁ o A ₂)	A(A ₁ ó A ₂)	Anti-B	AO o AA
B	B	Anti-A	BO o BB
AB	A y B	Ninguno	AB

La herencia del sistema ABO es controlada de acuerdo a las leyes de Mendel y se integra de cuatro genes alélicos: A (A_1 ó A_2), B y O de una serie de genes alélicos menos frecuentes como son: A_3 , A_x , A_m , etc. En la mayoría de los casos la herencia es directa y la combinación de los tres alelos, determinan los cuatro grupos sanguíneos: A, B, AB y O. La forma en que estos genes controlan la producción de antígenos ABO fue establecidos por Bernstein en 1924, cuya teoría señala que cada individuo hereda dos genes ABO, uno de cada padre, y que estos genes determinarán la presencia de los antígenos ABO en los eritrocitos de las personas.

Cuando los antígenos de los glóbulos rojos están constituidos por proteínas (Ej. Rh y K) son, presumiblemente, los productos directos del gen; pero cuando aquéllos son carbohidratos (Ej. A y Le^a), son determinados indirectamente por enzimas (transferasas) que son los productos del gen; estas enzimas transfieren el azúcar apropiado, determinando especificidad sobre una estructura cuya síntesis puede ser determinada por uno o más genes no relacionados entre sí. Algunos alelos que no producen algún efecto reconocible, son denominados “amorfos”.

En casi todos los sistemas heredados en los autosomas, los alelos son co-dominantes. El único grupo sanguíneo en el que el gen no es portado en un autosoma es el Sistema Xg, el cual es portado en el cromosoma X.

Los genes del sistema ABO, ubicados en el cromosoma número 9, están estrechamente relacionados, con los de otros sistemas de grupos sanguíneos, como son el Hh, Ii, Lewis y P, ya que la conformación de las moléculas de carbohidratos de sus determinantes antigénicos (inmunodominantes) está dada por la interacción entre los productos génicos de estos sistemas (cromosoma 19). También se relacionan con la condición de secretor ubicada asimismo en el cromosoma número 19.

Bioquímica de los antígenos

Gran parte del conocimiento que se tiene acerca de la bioquímica de los antígenos ABH provienen de los estudios realizados en las sustancias A, B y H presentes en las secreciones. La razón para ello es que estas sustancias se encuentran en muy pequeñas cantidades en los eritrocitos, en cambio su concentración es superior en las secreciones. Las investigaciones en estos productos establecieron, que la especificidad de estas sustancias ABH era debida a estructuras de carbohidratos unidos a polipéptidos.

La purificación de las glicoproteínas específicas de los grupos sanguíneos demostró que están formados por carbohidratos en un 80-90% y el 10-20% restantes por aminoácidos (15 aa), los cuales estos últimos aparentemente no juegan ningún papel en la especificidad del grupo sanguíneo de la molécula.

La información genética que tiene cada individuo (genotipo) condiciona la síntesis de enzimas que transfieren a la cadena de carbohidratos el azúcar que le confiere la determinante antigénica específica (inmunodominante). Así, tenemos inicialmente la fucosiltransferasa, que transforma la sustancia precursora fundamental en sustancia H; a la N-galactosaminiltransferasa que transforma a la sustancia H en sustancia A y a la galactosiltransferasa que transforma la sustancia H en sustancia B. Las diferencias entre las enzimas para grupo A y B son puntuales; los individuos del grupo O sintetizan una proteína sin actividad enzimática que, por tanto, no es capaz de agregar ningún azúcar a la sustancia H (Figura 41). Se han definidos seis alelos de O, todos ellos sin actividad enzimática.

Los antígenos ABH están presentes en la mayoría de las células del organismo, incluyendo plaquetas y leucocitos. Un 80% de la población poseen un gen secretor dominante (Se). Estas personas presentan antígenos solubles ABH en los tejidos y líquidos corporales, por ejemplo, plasma, saliva, semen e inclusive en el sudor.

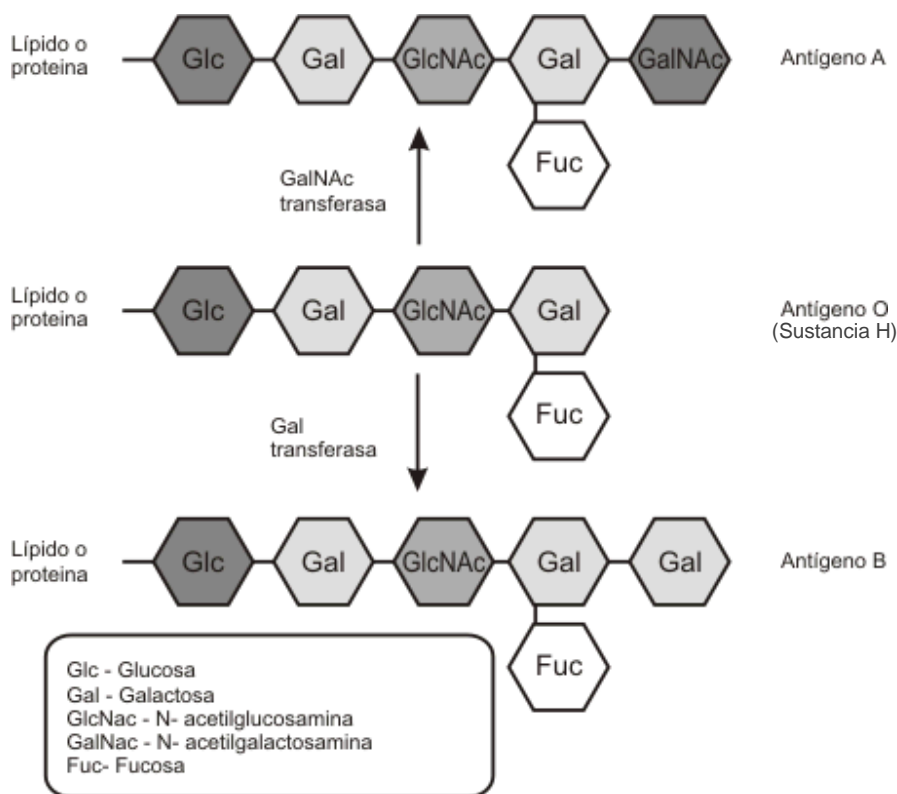


Fig. No. 41. Representación esquemática de la síntesis bioquímica de los antígenos del sistema ABO. Existe una cadena principal de azúcares, a la cual se le denomina sustancia precursora y se compone de Glc-Gal-GlcNAc-Gal. La ausencia de fucosa expone esta cadena precursora en el fenotipo Bombay (O_h).

Anticuerpos del Sistema ABO

Los anticuerpos del Sistema ABO son principalmente IgM e IgG (Tabla 32) y muy raramente IgA. Los primeros (IgM) también son denominados naturales, aglutinantes o *completos*, se desarrollan regularmente después que el individuo ha sido expuesto a la inmunización ambiental; en su aparición no ha ocurrido ningún evento inmunizante reconocible. Individuos con anticuerpos anti-A y anti-B en su suero y que tienen un estímulo inmunizante específico pueden producir anticuerpos inmunes de la misma especificidad pero con diferente comportamiento biológico. La inmunización puede ser secundaria a un embarazo ABO incompatible, transfusión de eritrocitos incompatibles, de plasma conteniendo sustancias de grupo sanguíneo, inyección de sustancias A y B purificadas con la intención de producir antisueros de altos títulos, o inoculación con productos virales o bacterianos que contienen sustancias activas de grupo sanguíneo. Después del estímulo inmunizante, el título y la avidéz de los anticuerpos aumenta,

desarrollando propiedades hemolíticas y se hace más difícil su neutralización con sustancias solubles de grupo sanguíneo; también se hacen activos a 37°C. Estos cambios son frecuentes en personas de grupo O, pero ocasionalmente pueden observarse en las de grupo A y B.

Los segundos (IgG e IgA) se conocen también como anticuerpos incompletos porque son capaces de adherirse al eritrocito pero no generan aglutinación y únicamente aparecen después de una estimulación antigénica.

Tabla. No. 32. Características serológicas de los anticuerpos del Sistema ABO

Característica	IgM	IgG
Temperatura óptima de reacción	< 37°C (4° – 20°C)	37°C
Tipo de reacción	Enzimática	Antiglobulina
Neutralización por sustancias de grupo sanguíneo	Completa	Parcial
Presente en fenotipo	A y B	O
Capacidad para atravesar placenta	No	Si (IgG ₁ e IgG ₃)
Causan enfermedad hemolítica	No	Si
Especificidad	Anti-A y Anti-B	Anti- AB
Tipo de respuesta inmune	Primaria	Secundaria
Mecanismo de producción	Natural (completos)	Inmune (incompletos)
Capacidad para activar complemento	Si	Si
Fijación a monocitos/macrófagos	No	Si
Hemolisis <<in vitro>>	No	Si
Reacción en solución salina	Si	No
Agglutinación directa	Si	No

Determinación del Sistema ABO

La determinación del grupo ABO es la prueba más importante del banco de sangre ya que es la base fundamental para determinar la compatibilidad de la sangre. El Sistema ABO se integra de dos partes: Antígenos presentes en la membrana eritrocitaria y anticuerpos correspondientes presentes en el plasma. Bajo condiciones normales, todos los individuos poseen anticuerpos contra los antígenos que no estén presentes en sus propias células. De esta manera se establece una interrelación constante y predecible entre los antígenos y anticuerpos del sistema, lo cual constituye la base fundamental para que en la determinación del Sistema ABO, se realicen dos pruebas:

1. Prueba celular para determinar los antígenos presentes en la membrana eritrocitaria.
2. Prueba sérica o inversa, para determinar los anticuerpos presentes.

Las dos pruebas son complementarias entre si y por lo tanto se realizan al mismo tiempo, pues una verificara los resultados de la otra. Deben realizarse a temperatura ambiente (20 a 24°C), la incubación a 37°C debilita la reacción. En caso de que exista discrepancia entre ambas pruebas debe hacerse una investigación adicional para detectar la fuente de la misma, ya que esta revelara una condición que podría ser de importancia

clínica (Ej. Crioaglutininas, leucemias, linfomas, carcinoma de estómago, inmunodeficiencias) o un error analítico.

Reactivos para la tipificación del sistema ABO

Los reactivos empleados en la clasificación de los antígenos se preparaban a partir de anticuerpos policlonales naturales o inmunes de sangre humana y en ocasiones animal. Ahora se preparan con anticuerpos monoclonales derivados de cultivos de células secretoras o hibridomas. Estos anticuerpos son altamente específicos por lo cual ofrecen resultados confiables y definitivos bajo condiciones normales. Estos reactivos deben cumplir con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA1-1993.

Para la clasificación del suero, se deben emplear, en lo posible células fenotipadas A₁ y A₂, B Rh positivo y O Rh positivo. Esta prueba no debe practicarse en placa, porque generalmente la concentración de los anticuerpos no es lo suficientemente alta para causar la aglutinación de los eritrocitos sin centrifugar.

Técnicas para la determinación de grupos sanguíneos

Existen 3 técnicas para la determinación de grupos sanguíneos: La primera técnica empleada fue la prueba en placa; posteriormente surgió la prueba en tubo, representando un avance técnico sobre la prueba en placa, además, amplió la gama de pruebas realizadas en el laboratorio de inmunohematología que siguen empleándose hasta hoy en día en la mayoría de los laboratorios clínicos y bancos de sangre. Actualmente, dentro de las técnicas más recientes se encuentra la técnica llamada gel-centrifugación desarrollada por el Dr. Yves Lapiere, la cual emplea una matriz de gel (sephadex) en microtubos para atrapar aglutinados de eritrocitos producidos por una reacción antígeno-anticuerpo. Existen 3 formulaciones básicas del gel:

1. Gel neutro: Solo contiene gel, para determinar la prueba inversa ABO, investigación de anticuerpos fríos y pruebas enzimáticas.
2. Gel específico: Es una mezcla de gel con un antisuero específico. Se emplea para la tipificación de grupo sanguíneo.
3. Gel antiglobulina: Es una mezcla de gel con antiglobulina humana y/o fracciones de complemento. Se utiliza en las pruebas de Coombs.

La técnica de gel-centrifugación representa un avance técnico sobre el uso de la técnica en tubo, por ser un método que ofrece reacciones e interpretación de resultados de manera estandarizada. Emplea volúmenes bajos de muestra (microtécnica), las reacciones son estables permitiendo lecturas posteriores y por más de un analista. Además las reacciones pueden ser fotocopiadas y leídas por equipos automatizados eliminando los aspectos subjetivos.

Fundamento

La membrana eritrocitaria posee una gran cantidad de antígenos de grupo sanguíneo, pertenecientes a distintos sistemas.

La tipificación ABO por norma debe hacerse de los antígenos eritrocitarios (prueba directa) y de los anticuerpos presentes en el suero de la misma muestra de sangre (prueba inversa)

La ausencia o presencia de los antígenos de un individuo del sistema ABO solo se logra a través de la exposición de los eritrocitos del individuo con antisueros monoclonales conocidos comerciales (Anti-A, Anti-B o Anti-AB) o mediante la exposición del suero del individuo contra eritrocitos fenotipados (A₁, A₂, B y O), debido a que en el suero se encuentran los anticuerpos recíprocos de este sistema.

La presencia de los antígenos o de los anticuerpos se evidencia por la formación de aglutinados macroscópicos de una reacción simple antígeno-anticuerpo.

Material e instrumentos

- Sangre venosa anticoagulada
- Suspensión de eritrocitos al 5%
- Suero
- Pipeta Pasteur con bulbo
- Aplicadores de madera
- Centrifuga clínica

Reactivos

- Solución salina fisiológica (SSF) al 0.85%
- Suero comercial anti-A monoclonal (color azul)
- Suero comercial anti-B monoclonal (color amarillo)
- Suero comercial anti-AB policlonal (incoloro)
- Eritrocitos fenotipados A₁, A₂, B y O suspendidos

Procedimiento:

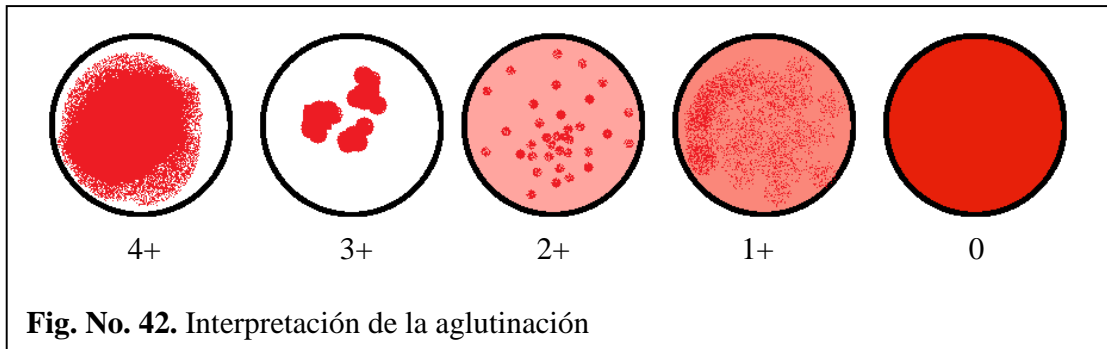
PRUEBA CELULAR EN TUBO

1. **Lavado de eritrocitos:** Colocar 0,5 ml de sangre total anticoagulada en el tubo de 13 x 100 mm, adicionarle solución salina fisiológica (0,85%) hasta las $\frac{3}{4}$ partes del tubo, colocar un tapón adecuado al tubo y mezclar invirtiendo con cuidado hacia arriba y hacia abajo. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante, de preferencia, con una pipeta Pasteur.
2. Eliminar el sobrenadante y preparar una suspensión de eritrocitos al 5% en SSF (por ejemplo: 0,25 mL de eritrocitos en 4,75 mL de SSF).
3. Seleccionar 3 tubos de 13 x 100 mm e identificarlos con marcador como A, B y AB respectivamente.
4. Colocar en el tubo marcado A, una gota de suero anti-A (azul); en el tubo B, una gota de anti-B (amarillo) y en el tubo marcado AB (incoloro) una gota de suero Anti-AB.

5. Agregar a cada tubo una gota de la suspensión de eritrocitos al 5% y mezclar.
6. Centrifugar a 3400 rpm por 15 segundos o 1000 rpm por 1 minuto.
7. Desprender el botón de células del fondo del tubo agitándolo suavemente; inclinarlo hasta la posición horizontal para apreciar completamente la aglutinación y cuantificarla en cruces.
8. Anotar inmediatamente, tubo en mano, los resultados de la aglutinación (Ver figura 42).

PRUEBA SÉRICA EN TUBO

1. El tubo de muestra colectada sin anticoagulante (así como está desde que se vació en el tubo) se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos.
2. En caso de que aun se vea la fibrina después de centrifugar y no se pueda extraer el suero, ésta se despegará de las paredes del tubo con un aplicador de madera (o en su defecto con la punta de una pipeta Pasteur) empujándola hacia el fondo y sin sacar nada del tubo; se vuelve a centrifugar (si se remueve y se saca el coágulo, éste atrapa suero y en ocasiones no se logra obtener el suero deseado. Es recomendable desechar el concepto de que para obtener suero se debe remover el coágulo).
3. Se separa el suero de los eritrocitos. El suero debe colocarse en otro tubo debidamente identificado.
4. Identificar apropiadamente 4 tubos de 13x100 mm, de la siguiente manera: A, A₁, B y O.
5. Colocar 2 gotas de suero en estudio en cada tubo.
6. Agregar una gota de eritrocitos fenotipados como A₁ al tubo marcado como A₁; una gota de eritrocitos identificados como A₂ al tubo marcado con A₂; una gota de eritrocitos B en el tubo marcado como B y una gota de eritrocitos O en el tubo marcado como O.
7. Mezclar agitando los tubos. Si desea potenciar la aglutinación, los tubos pueden ser incubados durante 5 minutos o más a la temperatura del laboratorio.
8. Centrifugar a 3400 rpm 15 segundos ó a 1000 rpm 1 minuto.
9. Observar el sobrenadante contra un fondo blanco bien iluminado para detectar hemólisis.
10. Desprender el botón de células del fondo del tubo con movimientos giratorios suaves, inclinarlo hasta la posición horizontal y leerlo contra un fondo bien iluminado para apreciar completamente los aglutinados dispersos (Tabla 33)
11. Anotar inmediatamente, tubo en mano, los resultados de la aglutinación.



- 4+ Aglutinación total de los eritrocitos en un cúmulo grande en un fondo claro.
- 3+ Dos o tres aglutinados grandes en un fondo claro.
- 2+ Aglutinados pequeños, de igual tamaño, en un fondo rojo.
- 1+ Aglutinados muy pequeños, pero definidos, en un fondo rojo.
- 0 No hay aglutinación.

Tabla No. 33. Procedimiento para la determinación de antígenos del sistema sanguíneo ABO

	Prueba celular en tubo			Prueba sérica en tubo				Interpretación
	1	2	3	4	5	6	7	
Tubos de 13x100 mm								
Antisero comercial	Anti-A 1 gota	Anti-B 1 gota	Anti-AB 1 gota	/	/	/	/	
Eritrocitos del paciente al 5%	1 gota	1 gota	1 gota	/	/	/	/	
Eritrocitos fenotipados al 5%	/	/	/	A 1 gota	A ₁ 1 gota	B 1 gota	O 1 gota	
Suero del paciente	/	/	/	2 gotas	2 gotas	2 gotas	2 gotas	
Centrifugar a 3400 rpm por 15 segundos o a 1000 revoluciones por un minuto.								
Interpretar aglutinación								

Interpretación de los resultados

En la tabla 34 se expresan los resultados de las pruebas realizadas. Discrepancias entre la prueba celular y la sérica causan dificultades en la interpretación del grupo ABO. Si ello ocurre cada resultado debe ser anotado en el espacio correspondiente de la hoja de resultados, pero el espacio designado para la interpretación debe dejarse en blanco hasta que el problema sea debidamente aclarado.

Tabla No. 34. Interpretación de los resultados en la determinación del sistema ABO

Prueba celular (Eritrocitos conocidos/sueros conocidos)			Prueba sérica (suero desconocido/Eritrocitos conocidos)		Interpretación del grupo sanguíneo
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	A ₁	B	
-	-	-	+	+	O
+	-	+	-	+	A
-	+	+	+	-	B
+	+	+	-	-	AB
-	-	+	-	+	Subgrupo A
-	-	+	+	+	Subgrupo A más anticuerpo

+ = aglutinación

- = No hay aglutinación

Discrepancias entre la prueba celular y la prueba sérica

Los resultados de las pruebas con eritrocitos y con suero pueden ser discrepantes debido a:

- Los problemas intrínsecos de los eritrocitos o del suero.
- Problemas relacionados con la prueba.
- Errores técnicos.

Falsos negativos

Pueden tener lugar debido a:

1. No agregar reactivo o suero a un tubo.
2. No identificar la hemolisis como una reacción positiva.
3. Uso de una relación inapropiada entre suero y/o reactivo con los eritrocitos
4. No centrifugar suficientemente las pruebas.
5. No incubar las pruebas a temperaturas de 20-24°C o menores.
6. Interpretación o **registros incorrectos** de los resultados de las pruebas.

Falsos positivos

Pueden ocurrir por:

1. Centrifugación excesiva de los tubos.
2. Uso de reactivos, eritrocitos o solución salina contaminados.
3. Uso de material de vidrio sucio.
4. Autoaglutinación de los eritrocitos del paciente y realización sólo del grupo directo sin autotestigo.
5. Interpretación o **registros incorrectos** de los resultados de las pruebas.

Toda discrepancia debe investigarse y resolverse antes de emitir un resultado definitivo. Si se trata de una unidad de sangre donada, ésta debe conservarse aparte y no transfundirse hasta que no se haya resuelto la discrepancia. El primer paso debe ser repetir

la prueba con la misma muestra, si la discrepancia persiste se debe realizar en una muestra nueva y verificar que los reactivos no estén contaminados.

SISTEMA Rh

El sistema Rh es después del ABO el más importante de los sistemas de grupos sanguíneos, por sus implicaciones clínicas en la transfusión sanguínea y en la etiopatogenia de la enfermedad hemolítica del recién nacido.

En su descubrimiento ocurrieron dos hallazgos relevantes. El primero de ellos acaeció en 1930, por la publicación de Levine y Stetson de su histórico trabajo describiendo como una madre que terminaba de dar a luz a un feto muerto y macerado, había desarrollado una severa reacción hemolítica por la transfusión de sangre proveniente de su esposo. Ellos descubrieron que el suero de la madre aglutinaba los eritrocitos de su esposo y el 85% de las sangres humanas ABO compatibles. El antígeno responsable demostró ser independiente de los ya conocidos ABO, MN y P.

En la interpretación de estos hallazgos, postularon que la madre había sido inmunizada, desarrollando anticuerpos contra un antígeno del cual ella carecía pero que estaba presente en los eritrocitos del feto, a su vez, heredado del padre. Cuando la paciente fue transfundida con la sangre de su esposo, el anticuerpo reaccionó con dicho antígeno causando la reacción hemolítica.

Un segundo hallazgo, esta vez experimental, se produce en 1940, como resultado de las experiencias en animales, de Landstainer y Wiener. Ellos inmunizaron conejos y cobayos inyectándoles eritrocitos del *Macacus rhesus*; aislaron un anticuerpo que, convenientemente diluido por ser un heteroanticuerpo, aglutinaba los eritrocitos de los monos *rhesus* y también el 85% de las sangre humanas. Los sujetos cuyos eritrocitos aglutinaban con el suero anti-*rhesus* fueron denominados Rh positivos, y el 15% restante, Rh negativos.

El siguiente paso fue la demostración de Wiener Peters que el anticuerpo Rh, aparentemente el mismo que había sido elaborado en animales contra los eritrocitos del mono *rhesus*, podía ser encontrado en el suero de algunas personas quienes habían presentado alguna reacción hemolítica después de haber recibido transfusiones de sangre ABO compatibles. Hasta el momento todo sugería que el antígeno presente en el eritrocito del *Macacus rhesus* y el hallado en los humanos era el mismo, por consiguiente, los correspondientes anticuerpos deberían poseer igual especificidad.

Hasta 1961 no quedó completamente aclarada la confusión entre el anticuerpo de origen humano y el anticuerpo anti-*rhesus* de origen animal. Sin embargo, ya para entonces se había generalizado tanto el término de Rh en la transfusión humana que resultaba imposible modificarlo, aun cuando Levine había sugerido que al anticuerpo anti-*rhesus* de conejo se le diera el nombre de anti-LW en honor a sus descubridores.

Hoy en día se sabe que se trata de dos sistemas genéticos completamente independientes, cuyos antígenos pueden ser reconocidos por anticuerpos diferentes.

Antígenos del sistema Rh

El Sistema Rh es codificado por dos genes ubicado en el cromosoma uno; el gen RHD es responsable de la síntesis de una proteína que atraviesa la membrana lipídica del eritrocito 12 a 13 veces y conforman los determinantes correspondientes al antígeno D. Las personas con D negativo no poseen la información correspondiente a este gen, por lo que se considera deletado; en las personas con D negativo de origen africano y asiático se ha encontrado el gen en el locus correspondiente, aunque es inactivo.

El segundo gen, denominado RHC, comprende cuatro alelos. CE, ce, Ce y cE. Éstas determinantes se encuentran ubicadas en una sola proteína, que, al igual que la del antígeno D, entra y sale a través de la membrana 12 veces y posee 417 aminoácidos (Figura 43).

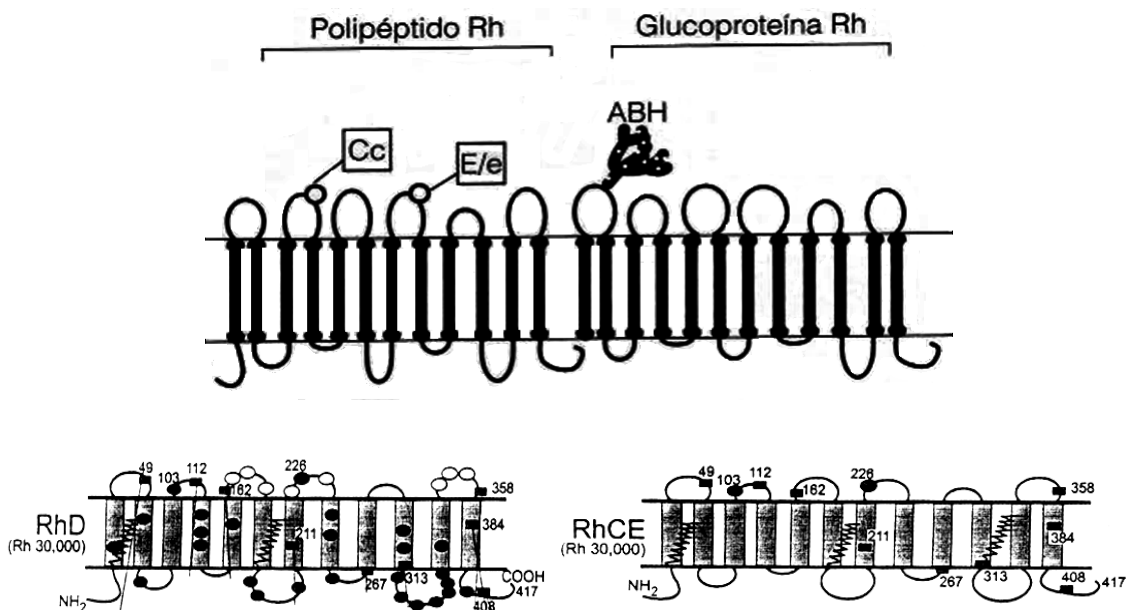


Fig. No. 43. Esquema de la ubicación de los determinantes específicos para los antígenos del sistema Rh. **RhCE**: contiene los antígenos C o c (2° bucle) y E o e (4° bucle) **RhD**: expresa el antígeno D (aminoácidos D-específicos en 3°, 4° y 6° bucle)

El primer antígeno humano del sistema Rh fue el antígeno D, si todos los individuos fueran homocigotos para este antígeno (DD), no existirían sujetos Rh negativos, sin embargo, el hecho de que existan los Rh negativos, sugería la existencia de un alelo, denominado d, pero hasta ahora no ha podido comprobarse este alelo. El sistema Rh es más complejo de lo que parece, pues se han encontrado más de 48 antígenos, pero solo 5 se consideran de importancia clínica: Existe el alelo D y dos pares de alelos antitéticos (*Cc* y *Ee*). Los genes del sistema Rh se hallan en el cromosoma 1, están estrechamente relacionados y se heredan de forma conjunta.

Desde el descubrimiento del sistema Rh en 1940, se fueron postulando varias teorías acerca del modelo de herencia y la nomenclatura que debía de emplearse para este sistema, sin embargo, en 1977 la Organización Mundial de la Salud (OMS), para evitar las divergencias en el sistema Rh recomendó que se empleara la nomenclatura de Fisher (Tabla 35). La nomenclatura de Fisher supone la existencia de tres loci o genes separados pero estrechamente ligados en haplotipos en el mismo cromosoma. Los denomina por separado y los haplotipos resultantes se expresan por la conjunción de tres letras. Los haplotipos más comúnmente heredados son CDe y cde, para los sujetos con Rh positivo y Rh negativo respectivamente.

El modelo genético más reciente es el descrito por Tippett (1986). En él se propone dos locus estructurales estrechamente ligados, D y CcEe como base para la producción del antígeno Rh. Para los ocho fenotipos Rh más comunes se describen dos alelos en el primer locus: D y no D. En el segundo locus CcEe se necesitan cuatro alelos que incluyen: ce, Ce,

cE y CE. En 1900, Colin y colaboradores secuenciaron los dos genes descritos por Tippett y demostraron que el locus Rh de los individuos Rh positivos está compuesto por dos genes diferentes. En los individuos D negativos uno de estos genes se halla ausente. Se sugiere la hipótesis de que uno de estos genes Rh codifica el polipéptido D y el otro gen codificara los polipéptidos C/c y E/e. Estos hallazgos confirmaron el modelo de Tippett con la excepción de que el alelo no D parece no existir. Adicionalmente, la Sociedad Internacional de transfusión Sanguínea agregó la terminación numérica para los antígenos del Rh, basándose en la nomenclatura descrita por Rosenfield.

Tabla No. 35. Algunos de los genotipos probables del sistema Rh a partir de los fenotipos más frecuentes, según la nomenclatura de Fisher.

Fenotipo Rh	Genotipo probable	Estatus Rh
DCcee	$DcE/dce (R^1 r)$	Positivo
DCCee	$DcE/DcE (R^1 R^1)$	Positivo
DccEe	$DcE/dce (R^2/r)$	Positivo
DccEE	$DcE/DcE (R^2/R^2)$	Positivo
DCcEe	$DcE/DcE (R^1/R^2)$	Positivo
ddccee	$dce/dce (rr)$	Negativo

Nomenclatura de Rosenfield: R = Rh positivo, r = Rh negativo, 1 = C, 2 = E

Anticuerpos del sistema Rh

A diferencia del sistema ABO, en donde existen anticuerpos naturales, las personas Rh negativos no contienen bajo condiciones normales, anticuerpos anti-Rh. La formación de este anticuerpo es casi siempre el resultado de la exposición del antígeno, sea por transfusión o por el embarazo al tener contacto con eritrocitos que contienen el antígeno D, por lo tanto, la naturaleza de los antígenos es inmune. La antigenicidad del factor Rh es mayor que la de cualquier otro grupo sanguíneo. Así, la administración de sangre de un individuo Rh positivo a otro Rh negativo tiene un 50% de probabilidades de quedar inmunizado (sensibilizado) y provocar la aparición del anticuerpo específico.

Relativa importancia del antígeno D

El antígeno D, es hasta ahora el más inmunogénico de los antígenos Rh, siendo por lo menos 20 veces más inmunogénico que el c, que es el siguiente más potente de los antígenos Rh.

Los anticuerpos contra antígenos del sistema RH en su gran mayoría son del tipo IgG, que no activan el complemento; es importante mencionar que anti-E frecuentemente es considerado como natural regular.

Fundamento

Para identificar el aglutinógeno Rh se usa un antisuero específico y su presencia se pone de manifiesto por la aglutinación de los eritrocitos.

Material e instrumentos

- Sangre venosa anticoagulada
- Suspensión de eritrocitos al 5%
- Pipeta pasteur
- Bulbo para pipeta pasteur
- Aplicadores de madera
- Centrifuga clínica

Reactivos

- Solución Salina Fisiológica (SSF) al 0,85%
- Suero anti-D monoclonal (Rh₀)
- Suero D control

Procedimiento

PRUEBA CELULAR EN TUBO

1. Homogeneizar perfectamente bien el tubo de sangre anticoagulada por inversión del tubo.
2. Lavar los eritrocitos una vez con SSF, centrifugado a 3000 rpm/5 min. **Lavado de eritrocitos:** Colocar 0,5 ml de sangre total anticoagulada en el tubo de 13 x 100 mm, adicionarle solución salina fisiológica (0,85%) hasta las $\frac{3}{4}$ partes del tubo, colocar un tapón adecuado al tubo y mezclar invirtiendo con cuidado hacia arriba y hacia abajo. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante, de preferencia, con una pipeta Pasteur.
3. Eliminar el sobrenadante y preparar una suspensión de eritrocitos al 5% en SSF.
4. Identificar apropiadamente un tubo de vidrio de 13 x 100 mm, y agregar 1 gota de antisuero-D (Rh₀) y 1 gota de suspensión de eritrocitos al 5% y mezclar.
5. Identificar como tubo control un tubo de vidrio de 13 x 100 mm, y agregar 1 gota de suero-D control y 1 gota de suspensión de eritrocitos al 5% y mezclar.
6. Centrifugar inmediatamente durante 1 minuto a 1500 revoluciones.
7. Agitar cuidadosamente el sedimento, inclinar el tubo lentamente hasta la forma horizontal y examinar la aglutinación sobre fondo claro. (En este tubo se puede continuar la prueba D débil).

Tabla No. 36. Procedimiento de determinación del Antígeno Rh.

	Indicaciones	Factor Rh D	Control	Interpretación
	Tubos 13 x 100 mm	1	2	
1	Antisuero Comercial D (Rh ₀)	1 gota	Nada	
	Suero control D	Nada	1 gota	
2	Suspensión de eritrocitos del paciente al 5%	1 gota	Nada	
3	Centrifugar el tubo No. 1 a 500 revoluciones por 1 minuto			
4	Interpretar aglutinación: Si el resultado es positivo la prueba aquí termina. Si el resultado es negativo hay que continuar el Coombs (D débil)	(+) → (-) ↓	Nada	Rh positivo

Interpretación

Los resultados posibles se observan en el cuadro siguiente:

Tabla No. 37. Interpretación del sistema Rh

Tubo con anti-Rh	Tubo con control Rh	Interpretación
+	-	Rh positivo*
(+) débil	-	Posible D débil**
-	-	Rh negativo; o posible D débil (practicar la prueba Coombs)**
+	+	Autoaglutinación (Investigar dicha situación)

*Si la prueba se interpreta como Rh positivo, aquí termina el procedimiento en el paso 6 y no se hace variante D débil del antígeno D.

**Si la prueba se interpreta como posible D débil o Rh negativo, se continúa con los mismos tubos de ensayo del paso 7 del procedimiento antes descrito, al paso 7 del procedimiento que se describe en la prueba de variante D débil del antígeno D.

EXPRESIONES DÉBILES DEL ANTÍGENO D (D PARCIAL O DÉBIL)

No todos los eritrocitos pueden ser clasificados como Rh positivo o negativo, mediante las pruebas de aglutinación directa con los sueros anti-Rh. La mayoría de las muestras de sangre, de una reacción de aglutinación macroscópica, muy definida y clara, inmediatamente después de la centrifugación; estas células que así reaccionan pueden ser fácilmente clasificadas como Rh positivo. Otras, no muestran aglutinación directa; sin embargo, no pueden ser clasificadas como Rh negativo porque el antígeno D puede estar presente en tales células pero débilmente expresado, por lo que se requiere de pruebas adicionales como la de antiglobulina para poderlo demostrar. Estos tipos de reactividad son debidos a variantes del antígeno D y los individuos cuyos eritrocitos exhiben tal comportamiento son clasificados como D parcial débil.

Antiguamente el D^u (D débil) se consideraba como un antígeno ajeno al D, sin embargo hoy se sabe que en realidad se trata de un alelo débil del D; la mayoría de las veces está asociada a los antígenos C o E y es rara en la raza blanca. La importancia práctica del D débil radica en que puede sensibilizar a un receptor D negativo. Con la utilización de reactivos monoclonales se detectan la mayoría de alelos débiles del antígeno D, sin embargo, cada laboratorio debe considerar las pruebas más apropiadas para la detección de estos D débil, con el fin de evitar la transfusión de sangre erróneamente clasificada como Rh negativa.

Algunas variantes del antígeno D relacionadas a expresiones débiles de este antígeno, pueden ser las siguientes:

1. Efecto de posición: DC en posición trans, que debilita la expresión del D.
2. Codificación genética para menor número de sitios antígenicos R⁰.
3. Antígeno D incompleto que se relaciona con los epítopes que conforman el antígeno Rh; se han descrito nueve epítopes identificados con sueros monoclonales anti-D, que permiten caracterizar siete categorías de células. En la categoría seis, se identifican epítopes D3, D4 y D9, mientras, en la categoría tres, se identifican nueve epítopes.

La baja frecuencia de las variantes débiles del antígeno D (D débil) explica su falta de trascendencia clínica. Algunos de estos individuos pueden producir anticuerpos anti-D contra el epítope que no tienen, lo que explica la observación de individuos con Rh D positivo con anticuerpo anti-D en su suero.

Aparte de las variaciones de los antígenos D que se mencionan arriba, y que son más o menos comunes, hay otros hallazgos que alteran la simplicidad de la concepción del sistema Rh como un conjunto de tres haplotipos con tres unidades de variación:

- Antígenos de más:
 - Antígeno G.
 - Antígenos compuestos (cooperación de de dos genes vecinos en el mismo haplotipo, pero situados en posición *cis*).
 - Antígenos indiferenciados.
- Antígenos de menos (antígenos deprimidos o silenciosos)
- Antígenos asociados
 - Antígeno LW (confundido inicialmente con el descubierto por Levine y que dio origen al Rh).

LA PRUEBA DE ANTIGLOBULINA HUMANA O DE COOMBS

Prueba empleada para demostrar la presencia de antígenos o anticuerpos de grupos sanguíneos, así como también en el diagnóstico de la enfermedad hemolítica del recién nacido.

El fundamento de la prueba de Coombs se basa en los siguientes principios:

1. Los anticuerpos y el complemento humano son globulinas y además son diferentes a las de otras especies, por lo tanto, se comportan como antígenos cuando se inyectan en otros organismos.
2. Si un animal (conejo, chivo, caballo) es inyectado con globulinas humanas purificadas o con el suero total, este animal las reconoce como extrañas y elabora anticuerpos contra ellas; estos anticuerpos tendrán especificidad antiglobulina humana.
3. El suero antiglobulina humana obtenido reaccionará específicamente con las globulinas humanas. Si moléculas de globulinas, sean anticuerpos o complemento se fijan en la membrana del eritrocito, el suero antiglobulina se combinará con ellas y causará aglutinación de las células. En cambio, si los eritrocitos no están sensibilizados, no habrá aglutinación.

En resumen, se puede decir que el principio de la prueba de antiglobulina humana o de Coombs es muy simple: detectar inmunoglobulina de la clase IgG y/o fracciones de complemento (C3d), unidos a la membrana eritrocitaria. No se considera necesario incluir alguna otra actividad contra las demás inmunoglobulinas (IgM, IgA), en este reactivo.

La sensibilización de los eritrocitos se puede producir en dos formas:

- a) *<<In vivo>>*, es decir, cuando la reacción del antígeno y su correspondiente anticuerpo se efectúa en el organismo, mientras ambos están circulando, como por ejemplo, en casos de anemia hemolítica autoinmune, de enfermedad hemolítica del recién nacido, etc.
- b) *<<In vitro>>*, la sensibilización de los eritrocitos por el anticuerpo se realiza en un tubo de ensayo en el laboratorio, donde se mezclan e incuban eritrocitos adecuados con el suero en estudio. Si en el suero existen anticuerpos contra antígenos presentes en los eritrocitos, se producirá la reacción antígeno-anticuerpo y los eritrocitos quedarán sensibilizados.

Existen dos métodos para la prueba de la antiglobulina humana:

- a) **Prueba de Coombs directa:** Se emplea para detectar anticuerpos o fracciones de complemento en la superficie del eritrocito cuando ha ocurrido una sensibilización *<<in vivo>>* (Figura 44). Este tipo de sensibilización puede presentarse en alguno de los siguientes casos:
 - i. Enfermedad hemolítica del recién nacido.
 - ii. Anemia hemolítica autoinmune.
 - iii. Anemia hemolítica medicamentosa.
 - iv. Reacción hemolítica postransfusional.

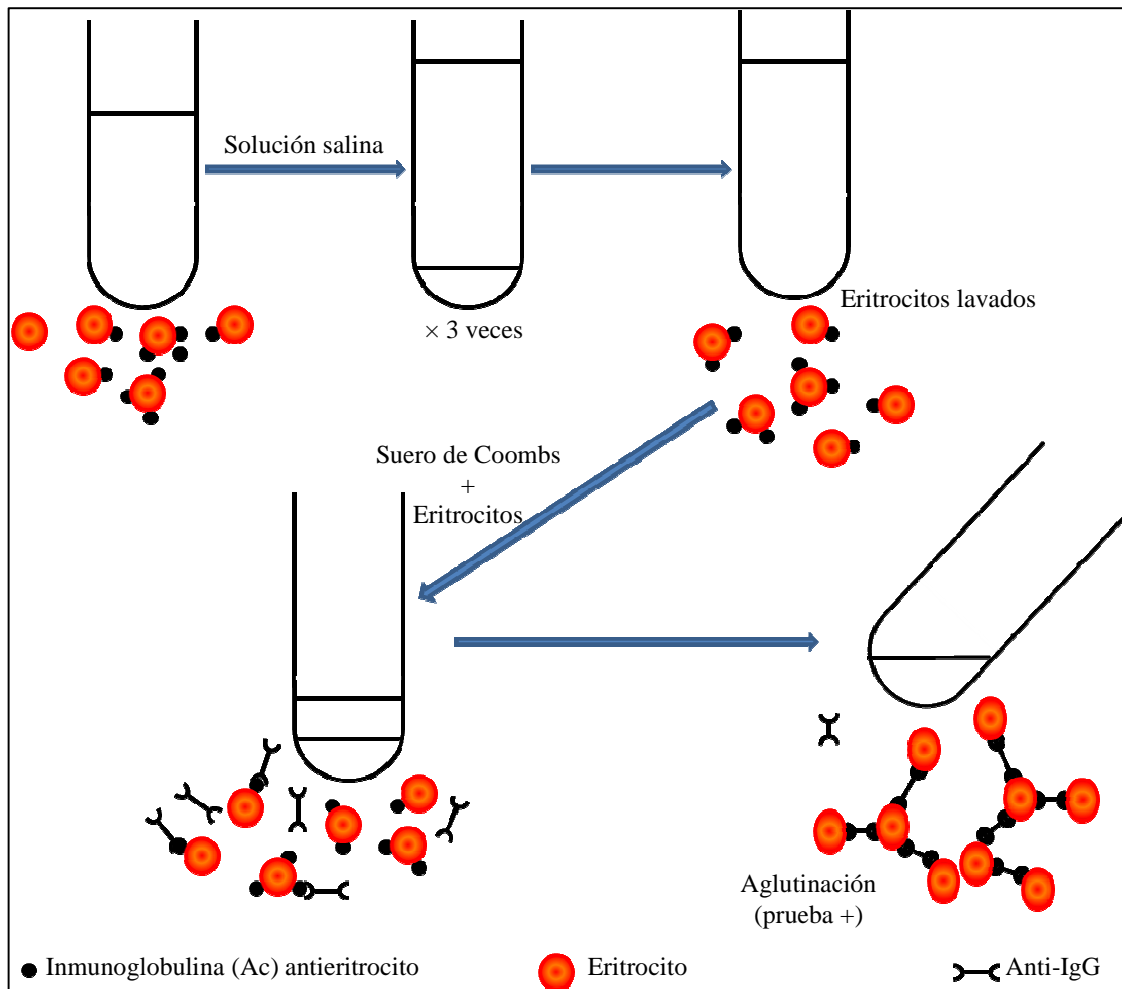


Fig. No. 44. Esquema de la prueba de Coombs directa

- b) **Prueba de Coombs indirecta:** Se emplea para detectar anticuerpos incompletos en el suero del paciente. Es un procedimiento de dos etapas, pues requiere de una sensibilización de eritrocitos <<in vitro>>, y posteriormente la reacción propia de la antiglobulina (Figura 45). Se emplea para la detección de anticuerpos irregulares.

Interpretación del resultado

La reacción antígeno-anticuerpo más importante empleada en el banco de sangre es la aglutinación. En ella el anticuerpo reacciona con el antígeno que es parte de una estructura de mayor tamaño como son los eritrocitos, formándose masas o aglutinados que pueden ser evidenciados a simple vista.

La reacción de aglutinación de los eritrocitos ocurre en dos fases o etapas: la primera, representa la reacción inmunoquímica específica conocida como la sensibilización y en la cual el anticuerpo se une al antígeno [Ej. Tipificación de grupos sanguíneos y Rh0 (D)]. La segunda fase representa el proceso físico de la aglutinación, que resulta de la unión de los eritrocitos mediante puentes de anticuerpos (Ej. Prueba de Coombs).

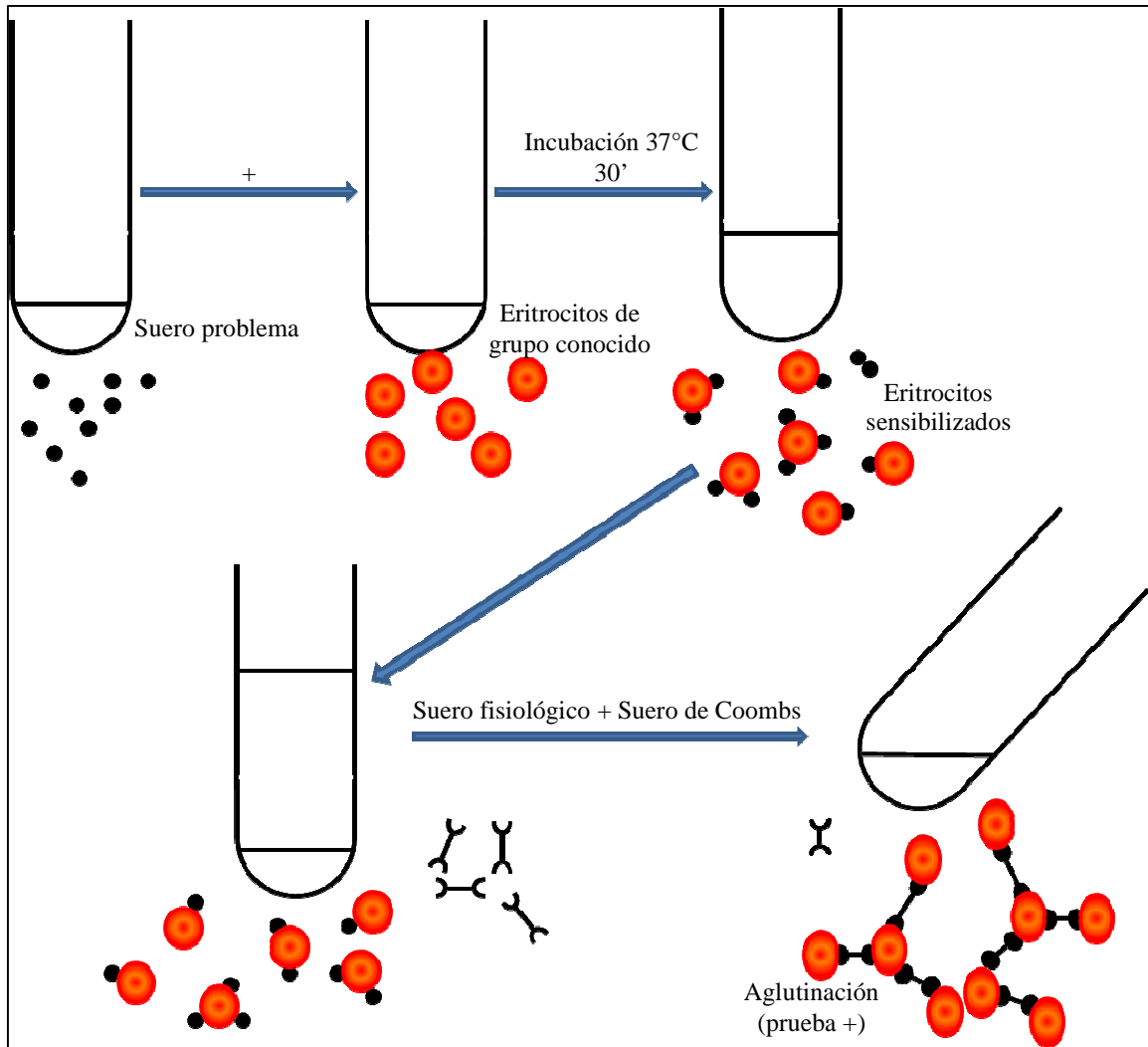


Fig. No. 45. Esquema de la prueba de Coombs indirecta.

Si la primera y/o principalmente la segunda fase muestran aglutinación, se interpreta positiva, la intensidad de la reacción se debe señalar en cruces, como se muestra en la Figura 42. No debe olvidarse la posibilidad de errores capaces de ocultar el resultado de la prueba de Coombs (Tabla 38).

Tabla No. 38. Causas de error en la prueba de Coombs

Falsos positivos

Sensibilización eritrocitaria *in vitro* por anticuerpos naturales o complemento por mantener mucho tiempo la muestra a 4°C.

Lavado insuficiente de los eritrocitos.

Fijación inadecuada del suero antiglobulina.

Reacción con el recubrimiento de algunos tubos de vidrio.

Reticulocitos elevados en la muestra analizada.

Falsos negativos

Tiempo insuficiente de incubación.

Dilución incorrecta del suero antiglobulina.

Suero antiglobulina de poca sensibilidad o caducado.

Cuando el anticuerpo presente es anti-IgA.

Lavado inadecuado de los eritrocitos que conlleve a la neutralización o eliminación de los anticuerpos fijados a su superficie.

Empleo de material sucio.

Reactivos antiglobulínicos humano

El reactivo antiglobulínico humano o suero de Coombs, se obtiene al inmunizar animales con globulinas del suero humano, estas pueden ser inmunoglobulinas purificadas (IgG, IgM, IgA) y/o fracciones de complemento (C3b, C3d, etc.), produciéndose antiproteínas humanas en el suero animal, las que se purifican tras adsorción con eritrocitos humanos lavados que eliminan las aglutininas no deseadas.

Los sueros antiglobulínicos se obtienen de forma policlonal y mediante la tecnología de hibridomas, ambos pueden ser poliespecíficos o monoespecíficos:

- Poliespecíficos: Contienen anticuerpos anti-inmunoglobulinas y anti-complemento.
- Monoespecíficos: Contienen un único anticuerpo; Anti-IgG, Anti-IgA, o Anti-IgM si no tienen actividad anti-complemento. Anti-C3d si no tienen actividad anti-inmunoglobulina.

Fundamento

No todos los eritrocitos pueden ser clasificados como Rh positivo o Rh negativo, mediante las pruebas de aglutinación directa con los antisueros anti-D. El antígeno D puede estar presente en tales células pero débilmente expresado.

1°. <<*In vitro*>>, la sensibilización de los eritrocitos por el anticuerpo se realiza en un tubo de ensayo en el laboratorio, donde se mezclan e incuban eritrocitos del paciente con el anti-D. Si en los eritrocitos existen los antígenos correspondientes al antisuero-D, se producirá la reacción antígeno-anticuerpo y los eritrocitos quedaran sensibilizados. Si los eritrocitos carecen del antígeno D, los eritrocitos no quedaran sensibilizados.

2°. El suero antiglobulina reaccionará con las globulinas humanas. Si las moléculas de anti-D se fijan en la membrana del eritrocito, el suero antiglobulina se combinará con ellas y causará aglutinación de las células. En cambio, si los eritrocitos no están sensibilizados (debido a la falta del antígeno D) no habrá aglutinación.

Material e instrumentos

- Sangre venosa anticoagulada
- Suspensión de eritrocitos al 5%
- Pipeta Pasteur
- Bulbo para pipeta Pasteur
- Centrífuga
- Baño María a 37°C

Reactivos

- Solución Salina fisiológica (SSF) al 0,85%
- Suero anti-D (Rh₀) monoclonal
- Antiglobulina humana o *Suero de Coombs* poliespecífico (Frasco gotero de color verde)

Procedimiento

DETERMINACIÓN DE LA AUSENCIA O DE EXPRESIONES DÉBILES DEL ANTÍGENO D

Para esta prueba, pueden ser usados los mismos tubos de la determinación del antígeno D, a menos que las instrucciones del fabricante señalen otro método.

Fase I

1. Homogenizar perfectamente bien el tubo de muestra de sangre anticoagulada por inversión del tubo.
2. Lavar los eritrocitos anticoagulados una vez con SSF, centrifugado a 3000 revoluciones durante 5 minutos. **Lavado de eritrocitos:** Colocar 0,5 mL de sangre total anticoagulada en el tubo de 13x100 mm, adicionarle solución salina fisiológica (0,85%) hasta las $\frac{3}{4}$ partes del tubo, colocar un tapón adecuado al tubo y mezclar invirtiendo con cuidado hacia arriba y hacia abajo. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante, de preferencia, con una pipeta Pasteur.

3. Eliminar el sobrenadante y preparar una suspensión de los eritrocitos al 5% en SSF.
4. Identificar apropiadamente un tubo de vidrio de 13 x 100 mm, y agregar 1 gota de antisuero-D (Rh_0) y 1 gota de suspensión de eritrocitos al 5% y mezclar.
5. Identificar como tubo control un tubo de vidrio de 13 x 100 mm, y agregar 1 gota de suero-D control y 1 gota de suspensión de eritrocitos al 5% y mezclar.
6. Centrifugar inmediatamente durante 1 minuto a 1500 rpm.
7. Agitar cuidadosamente el sedimento, inclinar el tubo lentamente hasta la forma horizontal y examinar la aglutinación sobre fondo claro. (En este tubo se puede continuar la prueba D débil).

Fase II

1. Agitar homogéneamente el contenido del tubo e incubar a 37°C durante 30 minutos. Incorporar un segundo tubo que solo contenga 2 gotas de suspensión de eritrocitos al 5% como control negativo e incubarlo también a 37°C durante 30 minutos. *Cada muestra al que se le determine el factor Rh y que pase a la Fase II se le debe incorporar un tubo Control (Ejemplo: Si se está haciendo una muestra debe haber 2 tubos; si se está determinando en 2 muestras debe haber 4 tubos y así sucesivamente).*
2. Centrifugar los 2 tubos (o los que se estén determinando) durante 2 minutos a 3000 rpm. Decantar completamente toda la solución salina.
3. Agregar unas gotas de sol. salina fresca a los tubos, resuspender las células y luego agregar más salina para realizar el segundo lavado, llenando el tubo hasta las $\frac{3}{4}$ partes con sol. salina y homogenizar.
4. Centrifugar nuevamente y repetir el mismo procedimiento hasta completar 4 lavados (Pasos 8, 9 y 10).
5. Inmediatamente después del cuarto lavado, agregar 2 gotas de reactivo de antiglobulina humana a cada uno de los dos tubos y mezclar.
6. Centrifugar a 3400 rpm por 15 segundos o a 1000 rpm por 1 minuto.
7. Resuspender suavemente el botón de células del fondo de los tubos y leer en cruces la aglutinación (Figura 42).

Tabla No. 39. Procedimiento analítico de la prueba de Coombs indirecta.

Fase I				
	INDICACIONES	ANTÍGENO D	CONTROL	INTERPRETACIÓN
	Tubos 13x100 mm	1	2	
1	Antisuero comercial D (Rh ₀)	1 gota	Nada	
	Suero control D	Nada	1 gota	
2	Suspensión de eritrocitos del paciente al 5%	1 gota	Nada	
3	Centrifugar el tubo No. 1 a 1500 revoluciones por minuto			
4	Interpretar aglutinación Si el resultado es positivo la prueba aquí termina Si el resultado es negativo hay que continuar el Coombs	(+) → (-)	Nada	Rh positivo
↓				
Fase II				
5	Suspensión de eritrocitos del paciente al 5% (la misma muestra que la utilizada en el paso 2)	Este tubo viene del paso 4	1 gota	
6	Incubar a 37°C los tubos No. 1 y 2 durante 30 minutos			
7	Centrifugar ambos tubos a 3000 revoluciones por minuto			
8	Decantar el sobrenadante de ambos tubos			
9	Resuspender los botones de ambos tubos hasta ³ / ₄ partes con salina.			
10	Centrifugar ambos tubos a 3000 revoluciones por 2 minutos (Repetir del paso 8 al 10 tres veces más hasta obtener ambos tubos finalmente decantados)			
11	Suero de Coombs (color verde)	1 gota	1 gota	
12	Centrifugar a 3400 revoluciones por 15 minutos o a 1000 revoluciones por minuto.			
13	Interpretación de aglutinación	(-)	(-)	Rh negativo
		(+)	(-)	Rh positivo

Interpretación de la prueba de Coombs

Si se observa aglutinación positiva, indicara la presencia de la variante D débil en la membrana eritrocitaria, por lo que se clasificara al sujeto como Rh positivo variante débil (D débil).

Como control siempre deberá practicarse una prueba directa de antiglobulina mediante los eritrocitos problemas.

Algunas normas de bancos de sangre establecen que es necesario hacer la determinación del D débil cuando se trata de donantes, no así en los receptores, quienes deben recibir sangre Rh negativo.

En la experiencia de algunos autores, consideraron que las normas de banco de sangre deben requerir que:

1. Toda sangre con resultado negativo debe ser procesada para la prueba D débil, mediante el método de la antiglobulina humana.
2. Si se trata de un donante que resulta ser D débil positivo, debe ser interpretado y considerado como Rh positivo y la sangre debe ser transfundida a un receptor Rh positivo.
3. Cuando se trata de un receptor D débil positivo, debe ser interpretado y considerado como Rh positivo. Este paciente puede ser transfundido con sangre Rh positivo.
4. Es obligatorio en la realización de la prueba D débil, incluir el procesamiento simultáneo de un control por el método de Coombs directo. En aquellos casos en que esta prueba control resulte positiva, la prueba D débil se invalida y el receptor deberá ser transfundido con sangre Rh negativo, hasta que se esclarezca el resultado.
5. Las mujeres embarazadas D débil positivo, cuyo hijo sea Rh positivo, no genera problema alguno con la inmunoglobulina anti-Rh.

ANTICUERPOS IRREGULARES

Todas las células sanguíneas poseen en su membrana glicoproteínas o glicolípidos que pueden actuar como antígenos (Ag) y provocar la formación de anticuerpos (Ac) en las personas que carecen de ellos, a este fenómeno se le denomina como aloinmunización. Desde el punto de vista de la medicina transfusional, los anticuerpos contra antígenos sanguíneos se clasifican de la siguiente forma:

- *Anticuerpos contra aloantígenos*: los producidos contra antígenos de eritrocitos, leucocitos y plaquetas.
- *Anticuerpos contra los propios antígenos del individuo*: autoanticuerpos producidos contra antígenos de eritrocitos y plaquetas, y cualquier anticuerpo derivado de las enfermedades autoinmunes. En este contexto podemos considerar a los autoanticuerpos como regulares e irregulares, y dividir a los aloanticuerpos como sigue (Tabla 40):
 - *Regulares naturales*: los producidos contra el sistema ABO.
 - *Irregulares naturales*: Anti-A1, Anti-M, Anti-N, Anti-P1, Anti-E, entre otros.
 - *Irregulares inmunes*: Anti-Rh-Hr (Anti-D, Anti-C, Anti-c, y otros), Anti-Kell, Anti-Duffy.

Tabla No. 40. Clasificación de los aloanticuerpos de los sistemas sanguíneos

Anticuerpos	Naturales	<p><i>Regulares</i>: Ac presentes durante toda nuestra vida, son de tipo IgM y de amplio espectro térmico; su producción inicial está relacionada con la exposición a bacterias (sistema ABO). Son espontáneamente aglutinantes y no poseen capacidad hemolizante. No pueden atravesar la barrera placentaria.</p> <p><i>Irregulares</i>: Ac que pueden producirse en cualquier etapa de nuestra vida, su periodo serológico es variable y están relacionados con alimentos y Ag bacterianos; son de tipo IgM que actúan entre 4–27°C (H, I, i, M, N, P, Le, A1, E, etc.).</p>
	Inmunes	<p><i>Irregulares</i>: Ac producidos por transfusiones o embarazos, su duración serológica es variable, el tipo de Ac que los caracterizan son de tipo IgG que actúan normalmente a 37°C y que tiene capacidad para fijar o no complemento (sistema Rh-Hr, Diego, Duffy, Kell, Kidd y otros). No siempre son espontáneamente aglutinantes y poseen capacidad hemolizante. Son capaces de atravesar la barrera placentaria.</p>

En base a lo anterior se establece entonces que los anticuerpos irregulares son aquellos que no se encuentran de manera natural en un individuo, pues son resultado de la exposición a un antígeno ajeno al organismo del individuo al momento de la transfusión o

en las mujeres en el embarazo; estos anticuerpos son dirigidos contra antígenos fuera del sistema ABO. Estos anticuerpos inmunes (adquiridos) son regularmente inmunoglobulinas G (IgG), las cuales producen hemólisis extravascular en el bazo o en el hígado mediante fagocitosis de los complejos Ag-Ac.

Los aloanticuerpos irregulares más comunes entre nuestra población son los que involucran a los sistemas:

- Rh-Hr
- MNSs
- P1
- Kidd
- Duffy
- Kell
- Lewis
- Diego
- Lutheran

Rastreo ó búsqueda de anticuerpos irregulares

La inmunohematología, junto con la medicina transfusional, es una rama de la patología clínica que se ocupa de las siguientes materias: transfusión de sangre y de sus componentes; patogenia y diagnóstico, prevención y tratamiento de la inmunización (sensibilización) relacionada con el embarazo y pruebas leucocitarias para el trasplante de órganos.

Se ha comprobado que existen distintos tipos de Ac en base a su tamaño, peso, temperatura óptima de reacción, medio de reacción, etc. Sin embargo de todas estas características la más importante es la temperatura óptima de reacción, pues la temperatura tiene efectos inversamente proporcionales con la constante de equilibrio y la velocidad de reacción si esta se aleja del rango ideal de trabajo. De acuerdo a la temperatura óptima de reacción, estos Ac se dividen en dos grupos: anticuerpos fríos y anticuerpos calientes.

- a) *Anticuerpos fríos*: reaccionan a temperaturas entre 4 y 27°C. No son importantes desde el punto de vista transfusional, pues generalmente no son activos a temperatura corporal, sin embargo pueden influir o interferir en la clasificación sanguínea de las personas y en las pruebas de compatibilidad realizadas a temperatura ambiente. Estos Ac son de tipo IgM, cuyo peso molecular es de 950 KD y su mejor medio de reacción es el salino. Los Ac fríos van dirigidos contra los sistemas MN, Lewis y P1. Entre estos Ac sólo M y N han sido relacionados con la enfermedad hemolítica del recién nacido, cuya severidad va de leve a moderada.
- b) *Anticuerpos calientes*: se han denominado así porque su temperatura óptima de reacción es 37°C. Estos Ac tienen una relevante importancia clínica ya que se les asocia con reacciones transfusionales de intensidad moderada a severa, que pueden llegar a ocasionar la muerte; son los principales causantes de la enfermedad hemolítica del recién nacido. Estos Ac son de clase IgG, cuyo peso molecular es de 150 KD y reaccionan mejor en medio proteico (albúmina).

Banco de sangre y su objetividad

Un Banco de sangre es el establecimiento autorizado para obtener, recolectar, conservar, aplicar y proveer sangre humana, así como para analizar y conservar, aplicar y proveer componentes de la misma.

La Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA2-1993, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos, aplica las siguientes definiciones para los productos o componentes sanguíneos:

- **Unidad:** Volumen de sangre o componente sanguíneo recolectado de un solo donante en una bolsa o recipiente que contenga anticoagulante adecuado y suficiente.
- **Sangre fresca:** Tejido hemático no fraccionado, de menos de seis horas después de su recolección.
- **Sangre total:** Tejido hemático no fraccionado, de más de seis horas después de su recolección.
- **Componentes de la sangre:** Fracciones separadas de una unidad de sangre u obtenidas por aféresis.
 - **Concentrado de eritrocitos:** Fracción que contiene principalmente glóbulos rojos, como resultante de la remoción casi completa del plasma de la sangre recolectada.
 - **Concentrado de eritrocitos pobre en leucocitos:** Glóbulos rojos en los que se ha eliminado la mayor parte del plasma y de otras células sanguíneas por remoción de la capa blanca sobrenadante.
 - **Concentrado de eritrocitos lavados:** Glóbulos rojos de los que se han removido en proporción suficiente el plasma y otras células sanguíneas, mediante baños sucesivos con solución salina isotónica.
 - **Concentrado de eritrocitos congelados:** Glóbulos rojos en una solución criopreservadora, que permite incrementar su periodo de vigencia conservados a bajas temperaturas.
 - **Concentrado de leucocitos:** Glóbulos blancos recolectados por aféresis o preparados mediante fraccionamiento de unidades de sangre fresca.
 - **Concentrado de plaquetas:** Trombocitos recolectados por aféresis o preparados mediante fraccionamiento de unidades de sangre fresca.
 - **Plasma envejecido:** El que en cualquier momento después de la recolección ha permanecido seis horas o más a temperaturas por arriba de menos 18° C.
 - **Plasma desprovisto de crioprecipitado:** El remanente después de haber separado algunos factores de coagulación por técnicas de precipitación en frío.
 - **Plasma fresco:** El que se encuentra en el lapso de las primeras seis horas después de la recolección.
 - **Plasma fresco congelado:** El que se congela en el lapso de las primeras seis horas, después de la recolección y así se conserva.
 - **Crioprecipitado:** Fracción proteica del plasma fresco congelado que precipita al descongelarse en condiciones controladas.

Muestras piloto

Toda unidad de sangre siempre debe tener muestras piloto, las cuales son muestras sanguíneas que acompañan a cada unidad de sangre o de eritrocitos. Estas muestras serán tomadas en el momento de la donación por la persona que extraiga la sangre y estarán marcadas desde antes de la toma de la sangre para indicar que son idénticas al contenido de la unidad de sangre total.

En el laboratorio de Banco de Sangre el objetivo determinante es dar al paciente donde se encuentre, el producto o productos tales como: Paquete globular (concentrado de eritrocitos), Plasma fresco, Plasma congelado, Plasma rico en plaquetas, Concentrado plaquetario, Concentrado leucocitario y Crioprecipitado; los cuales deben estar en cantidad suficiente en el momento preciso y con los estudios pertinentes que avalen su inocuidad.

Dentro de estos estudios se encuentra un grupo de pruebas denominadas como pruebas pretransfusionales. Este procedimiento asegura de manera adecuada la compatibilidad eritrocitaria y plasmática, por las siguientes pruebas:

1. Grupo sanguíneo ABO (visto en la práctica anterior).
2. Determinación del factor Rh₀ (D) (visto en la práctica anterior). Ratificación del Rh₀ (D) del donador cuando el paciente es Rh₀ (D) negativo (visto en la práctica anterior).
3. Investigación de anticuerpos irregulares fuera del sistema ABO.
4. Pruebas cruzadas de compatibilidad.

Todos y cada uno de estos exámenes deben estar bajo control. Para este fin, el empleo de un grupo de células de perfil fenotípico conocido (panel) no es solo útil sino “*indispensable*”.

La transfusión de componentes sanguíneos se considera entonces como un procedimiento relativamente seguro, inocuo y eficaz. Sin embargo, la terapia transfusional conlleva riesgo de reacciones adversas, desde leves hasta muy severas que incluso pueden provocar la muerte. Estas reacciones adversas no siempre son registradas y reportadas en forma adecuada, por lo tanto los riesgos de la transfusión deben ponderarse en comparación con los beneficios terapéuticos esperados. Por todo esto el personal de salud debe ser capaz de reconocer y manejar las diferentes reacciones adversas de la transfusión y emplear los medios disponibles para eliminar o minimizar tales riesgos al paciente.

Anticuerpos irregulares

Las normas de Banco de Sangre establecen que debe practicarse la investigación de anticuerpos irregulares en el suero de:

- ✓ Donadores de sangre.
- ✓ Candidatos a recibir transfusión.
- ✓ Mujeres embarazadas, para detectar anticuerpos que puedan causar enfermedad hemolítica del recién nacido o discrepancias en las pruebas cruzadas en el momento del parto, en caso de que la paciente requiera ser transfundida.
- ✓ Para aclarar discrepancias del sistema ABO.
- ✓ En el estudio de reacciones hemolíticas transfusionales.
- ✓ En el estudio de anemia hemolítica autoinmune.

En los donantes, la investigación tiene por finalidad detectar anticuerpos irregulares para prevenir su transferencia al receptor. Las normas de la Asociación Americana de Bancos de Sangre recomiendan especialmente, que esta prueba debe realizarse en aquellos donantes con historia de transfusiones anteriores o embarazos.

En los receptores de sangre, la prueba cruzada, como prueba pretransfusional completa, acorta y facilita la transfusión, dándole mayor seguridad.

El estudio pretransfusional de rastreo de anticuerpos irregulares es habitual para determinar la existencia de anticuerpos contra otros antígenos diferentes a los comprendidos en el sistema ABO. Para esto se estudian anticuerpos contra eritrocitos de grupo O, para los cuales no se espera aglutinación por anticuerpos anti-A o anti-B, pero si puede haber aglutinación por otro tipo de anticuerpos.

A estas células O se les denomina “Células Panel”, pues son una mezcla de eritrocitos y antígenos conocidos. Al conjunto de reactivos de eritrocitos con un fenotipo conocido se le conoce como Panel de anticuerpos irregulares, los antígenos para los cuales son tipados los eritrocitos de estos paneles siempre se indican en una Tabla de trabajo que acompaña a cada lote de reactivo.

El empleo del Panel es para realizar una identificación de anticuerpos irregulares presentes en un receptor y descubrir su especificidad. Tras la identificación del anticuerpo irregular presente, se debe elegir para el paciente una unidad de sangre negativa para el antígeno correspondiente al anticuerpo inesperado identificado.

Fundamento

En la membrana del eritrocito se encuentra una gran variedad de antígenos de grupo sanguíneo, pertenecientes a varios sistemas.

La determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos del receptor presentes en su suero, dirigidos contra los antígenos eritrocitarios del panel para determinar su especificidad, se ponen en evidencia al formarse el complejo Ag-Ac, el cual puede observarse como aglutinación o hemólisis.

Material e instrumentos

- Gradilla para tubos de ensayo
- Centrífuga
- 10 – 15 tubos de ensayo de 13x100 mm preferentemente limpios y “secos”
- Pipetas Pasteur
- Baño maría a 37°C
- Carta control del panel de trabajo, la cual cambia cada 15 días (Solicitar al asesor)

Reactivos

- LISS (Solución de Baja Fuerza Iónica: NaCl 0,03 M y glicina 0,3 M)
- Reactivo de antiglobulina humana poliespecífico (Coombs)
- Solución salina fisiológica (0,85%)
- Panel de células de fenotipo conocido (Antígenos conocidos en los eritrocitos)
- Suero problema proporcionado por el asesor (Ac irregular desconocido)
- Eritrocitos sensibilizados para el control de Coombs

Procedimiento

1. Numerar 10 tubos de 13 x100 mm (1 al 10).
2. Colocar en cada tubo 2 gotas del suero problema, usando una pipeta Pasteur.
3. Agregar en cada tubo una gota de eritrocitos del correspondiente frasco del panel. Ejemplo: en el tubo 1, agregar una gota de células del frasco identificado como el No. 1 (frasco de células) y así sucesivamente hasta el final.
4. Mezclar cada tubo (1 al 10) y centrifugar a 3400 rpm por 20 segundos.
5. Observar cada tubo para detectar hemólisis en el sobrenadante. Leer la aglutinación en cruces y anotar los resultados, tubo en mano (figura 42).

Nota: Si algún tubo presenta aglutinación o hemólisis en alguno de los pasos, anotarlo y eliminarlo; continuar el procedimiento con los demás.

6. Incubar a 37°C durante 15 minutos.
7. Centrifugar a 3400 rpm por 20 segundos. Si hay hemólisis o aglutinación, anotar tubo en mano los resultados en cruces.
8. Lavar todos los tubos restantes (los que continúan siendo negativos) 4 veces con solución salina fisiológica de la siguiente manera: Agregar 3 mL de solución salina fisiológica, resuspender y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos, eliminar el sobrenadante, volver a agregar 3 mL de solución salina fisiológica, repitiendo el procedimiento 4 veces.

9. Eliminando el ultimo sobrenadante y secando las células invirtiendo el tubo completamente vertical (sin miedo de perder las células restantes) sobre un papel absorbente. Agregar a cada tubo 2 gotas de reactivo de antiglobulina humana poliespecífico (Coombs).
10. Mezclar, centrifugar a 3400 rpm durante 20 segundos, leer la aglutinación y anotar tubo en mano los resultados en cruces (si algún tubo va resultando aglutinado o con hemolisis anotar y eliminarlo).
11. Comprobar los resultados negativos, haciendo la prueba de control de Coombs (consumo de Coombs) y anotar los resultados.
12. Control de Coombs. A los todos los tubos que resultaron negativos hasta la prueba de Coombs, se apartan y se les agrega 1 gota de eritrocitos sensibilizados a cada uno.
13. Mezclar, centrifugar a 3400 rpm durante 20 segundos, leer la aglutinación. Todos los tubos deben de resultar positivos.

Es extremadamente importante leer cuidadosamente cada reacción y registrarla en cruces, pues ello puede ser de gran ayuda para la interpretación de una reacción por efecto de dosis o de múltiples anticuerpos con títulos diferentes (Figura 42).

Interpretación de los resultados

Una forma rápida y sencilla para la interpretación del panel es el estudio de exclusión o descarte de posibles anticuerpos, basado en la no reactividad del anticuerpo con aquellas células del panel que poseen determinados antígenos. Es decir, si el suero no reacciona con una determinada célula del panel en todas las fases de la prueba, significa que el o los Ac presentes en el suero no están dirigidos contra los antígenos presentes en esa determinada célula. En cambio, el anticuerpo tendrá especificidad contra el o los antígenos que estén en las células que resulten aglutinadas.

El primer paso para la interpretación del panel es observar el autocontrol, que son las células del paciente suspendidas en su propio suero y tratadas en la misma forma que el resto de las células del panel. Si el autocontrol es negativo, sirve de comparación para otras células del panel que no reaccionen, o que reaccionen en forma muy débil. Si es positivo, permite igualmente compararlo en diferentes fases con las células que aglutinen. (El autocontrol no se realizara ya que el asesor solo proporcionara el suero problema).

Actividades

- Analizar los resultados en base al ejemplo presentado.
- Reportar los resultados de igual manera que la Tabla 42.
- Anexar la carta control.

Ejemplo

Todos los paneles de eritrocitos conocidos traen anexo una carta en la que se proporcionan los antígenos que contiene cada una de las células que forman el panel. Para este ejemplo se emplea una carta descriptiva para 11 tubos de DiaMed-ID® (Tabla 42).

La identificación de un solo Ac puede realizarse por simple observación de los resultados positivos y negativos.

Usando el panel, cuya carta descriptiva se da en la Tabla 42, se obtuvieron los siguientes resultados para el suero problema: reacción positiva en los tubos 3 y 5. En la Tabla 43 se da un ejemplo de cómo anotar los resultados obtenidos.

Tabla No. 42. Carta control de DiaMed-ID para una prueba de 11 tubos.

	Rh-Hr						Kell		Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS				Luteran	
	D	C	E	c	e	C ^w	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P1	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b
1	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+
3	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+
4	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+
5	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+
6	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+
7	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	
8	+	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+
9	0	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+
10	0	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+
11	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	+	+	+

0 = Antígeno ausente + = Antígeno presente

Tabla No. 43. Resultados del enfrentamiento del suero problema con el Panel de células de la Tabla anterior.

Donador.....		Fecha.....		
Grupo sanguíneo y Rh.....		Interpretación (anticuerpo encontrado).....		
		Revisó.....		
Tubo	Sol. salina o LISS a 37°C/15'	Coombs	Consumo de Coombs	Resultados
1	0	0	0	
2	0	0	0	
3	+	-	+	Positivo (37°C)
4	0	0	0	
5	+	-	+	Positivo (37°C)
6	0	0	0	
7	0	0	0	
8	0	0	0	
9	0	0	0	
10	0	0	0	
11	0	0	0	

0 = Antígeno ausente + = Antígeno presente

Se compara este esquema de resultados, con la carta descriptiva (Tabla 44) buscando si hay alguna columna que tenga un esquema o patrón igual. En este caso la columna E tiene el mismo patrón que el suero problema (Tabla 43).

Tabla No. 44. Carta control del Panel comparada con los resultados del problema.

	Rh-Hr						Kell		Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS				Luteran		Problema		
	D	C	E	c	e	C ^w	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P1	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b			
1	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	0
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	0	+	0	0	0
3	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	-
4	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0
5	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	-
6	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0
7	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0
8	+	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	0
9	0	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0
10	0	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0
11	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+	+	0	+	+	0	0	0
																					TA/ 15'	37°C/ 20'	Coombs	

Para rectificar se hace reaccionar las células problema en suero anti-E; no debe haber reacción, puesto que estas células deben ser E negativas y por tanto no deben tener el antígeno E, por lo cual formaron el anticuerpo anti-E.

Presencia de varios anticuerpos. Siempre debe tenerse en mente que un suero puede tener más de un anticuerpo. Por ejemplo, es bastante común encontrar sueros que tienen anti-E y anti-c, o bien, anti-c y anti-e. En estos casos el patrón del suero problema no coincide con ninguno de los patrones señalados en la carta descriptiva. Se observan reacciones de intensidad variable, independientemente del fenómeno de dosis.

BANCO DE SANGRE Y LAS PRUEBAS CRUZADAS

La prueba de compatibilidad es un proceso de laboratorio que permite conocer si existe compatibilidad serológica entre la sangre de un donante y la de un receptor.

La metodología varía según los recursos del servicio y la urgencia del caso, aunque de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-003-SSA-1993) siempre debe incluirse la técnica de la antiglobulina humana como mínimo. El procedimiento debe ser lo más simple posible, sin comprometer la exactitud, porque la complejidad aumenta el riesgo de cometer errores.

Existen varios métodos, algunos de los cuales son muy sensibles a ciertos tipos de anticuerpos; sin embargo la prueba más importante es la prueba cruzada, pues incluye la realización de una serie de procedimientos que tienen como finalidad asegurar al paciente los mayores beneficios de la transfusión.

Tanto la prueba de compatibilidad como la prueba cruzada mayor tienen como objetivos:

- a) Garantizar que los eritrocitos a transfundir son ABO compatibles con el receptor.
- b) Detectar anticuerpos en el suero del receptor que estén dirigidos contra antígenos presentes en los eritrocitos del donante.

Ambas pruebas tienen sus limitaciones y entre ellas podemos señalar las siguientes:

- No garantizan la supervivencia normal de los eritrocitos transfundidos.
- No previenen la inmunización del receptor.
- No detectan todos los errores en la clasificación del sistema ABO.
- No detectan errores en la clasificación del factor Rh en el donante o en el receptor, a menos que el suero contenga anticuerpos anti-Rh.
- No previenen reacciones hemolíticas tardías, secundarias a respuestas anamnésicas a antígenos contra los cuales el paciente había sido previamente inmunizado, pero cuyos anticuerpos no eran demostrables en el momento que se practicaron las pruebas.
- No detectan anticuerpos antileucocitarios, antiplaquetarios o contra proteínas del suero (IgG, Gm, etc.).
- No previenen reacciones febriles o alérgicas provocadas por la sangre transfundida.
- *No detectan errores secretariales o administrativos.*
- Por último, no detectarán anticuerpos a menos que el procedimiento sea practicado correctamente y que el suero y las células hayan sido adecuadamente preparados.

La prueba de compatibilidad es una prueba analítica de laboratorio que comprende una serie de procedimientos que deben ser realizados cuidadosamente para que la transfusión de sangre sea segura. Internacionalmente se han establecido los siguientes procedimientos:

- Solicitud del producto y datos relevantes del paciente (receptor).
- Identificación y recolección de las muestras sanguíneas del receptor.
- Estudios y pruebas del donador.
- Determinación de los antígenos ABO/Rh del receptor.
- Detección de anticuerpos irregulares en el receptor.
- Selección de componentes ABO/Rh apropiados para el receptor.

- Realización de pruebas cruzadas.
- Comparación entre resultados actuales y el historial de las pruebas transfusionales realizadas con anterioridad (en caso de que existan).
- Reidentificación y control clínico del receptor.

Pruebas cruzadas

Antes de realizar esta prueba, se debe verificar que la muestra de sangre del receptor y del donante estén correctamente identificadas, clasificadas y que los resultados estén anotados en el registro de transfusiones.

Si en el estudio del receptor se identifican discrepancias en la determinación del sistema ABO/Rh y Coombs directo, éstas deben resolverse antes de proceder a la prueba cruzada. Cuando por razones clínicas es necesario efectuar la transfusión antes de resolver algún problema, deberá seleccionarse el grupo ABO y Rh que no represente un riesgo para el paciente. Por ejemplo, si existen dudas en la determinación del antígeno D, debe usarse sangre Rh negativo; pero si la discrepancia se presenta con el sistema ABO, la sangre seleccionada deberá ser del grupo O.

Vale la pena señalar que si la prueba cruzada mayor es importante para la transfusión, no menos lo es la prueba de detección de anticuerpos.

Considerando que el 90% de los anticuerpos clínicamente significantes pueden ser demostrados en los procedimientos de detección (cuando éstos se realizan correctamente), entonces, la prueba cruzada mayor tendría tres objetivos:

1. Confirmar una vez más que existe compatibilidad ABO entre receptor y donante.
2. Detectar un anticuerpo en el suero del paciente que no se demostró en la prueba de detección, porque el correspondiente antígeno no estaba presente en las células detectoras o células pantalla (Panel).
3. Cumplir con las regulaciones que establecen las organizaciones de banco de sangre y las legislaciones de los diferentes países.

Tradicionalmente, la prueba cruzada se ha realizado en dos partes, sin embargo consta de tres partes:

- a) **Prueba cruzada mayor:** Consiste en mezclar el suero del receptor con los eritrocitos del donante.
- b) **Prueba cruzada menor:** Detecta anticuerpos irregulares en el suero del donador y ratifica algún error de clasificación ABO/Rh. Consiste en mezclar suero del donante con los eritrocitos del receptor.
- c) **Prueba autotestigo:** Permite detectar una prueba antiglobulina directa positiva, así como la presencia de rouleaux y otras reacciones autoinmunes. Se realiza con una gota de eritrocitos lavados del receptor más dos gotas de suero del receptor.

Como su nombre lo expresa, la prueba cruzada mayor es mucho más importante para la seguridad de la transfusión, que la prueba menor.

Los Bancos de Sangre y los componentes de transfusión sanguínea

El servicio de Banco de Sangre asegura que la recolección, procesamiento y transfusión de sangre y componentes sanguíneos se realicen de acuerdo a los requerimientos especificados.

La valoración riesgo/beneficio es la primera premisa del Banco de Sangre. La mejor manera de evitar riesgos transfusionales es no transfundir en situaciones no indicadas. Por lo cual la responsabilidad del banco de sangre es el asegurar la entrega de componentes sanguíneos idóneos para cada receptor, esta responsabilidad implica el entregar unidades de componentes con el mínimo riesgo de inmunización, asegurando de este modo que no existe un riesgo de discrepancia y reacción transfusional importante.

Actualmente la medicina transfusional es posible gracias a la donación de sangre, la cual puede emplearse como unidad total o fraccionarla en sus diferentes componentes, los principales componentes sanguíneos se mencionan a continuación:

- A. **Sangre total:** Una unidad de sangre total tiene un volumen aproximado de 520 mL (450 mL de sangre + 60-70 mL de solución anticoagulante conservadora). El hematócrito medio es de 36-40%. Su vida de almacenaje es de aproximadamente 35 días a una temperatura de 1-6°C.
- B. **Concentrados de hematíes:** Se preparan a partir de sangre total mediante sedimentación o centrifugación. Deben tener como mínimo, una cantidad de Hb de 45g/unidad y un hematócrito del 70-80%, en un volumen de 250-350 mL. Habitualmente se conservan a 4°C (1-6°C) durante 35 o 42 días dependiendo de la sustancia conservadora empleada. Si se congelan se almacenan en glicerol a -40°C durante 10 años.
- C. **Concentrado de plaquetas:** Consisten en plasma rico en plaquetas separado de la sangre dentro de las 6 horas siguientes a su recogida. Cada unidad contiene 5.5×10^{10} o más plaquetas, el volumen depende de la temperatura de conservación, 50 mL si se mantiene a 22°C y 20 mL si se conserva de 2-6°C. Pueden conservarse durante 5 en agitación constante.
- D. **Plasma fresco congelado:** Se separa de la sangre total y se debe congelar dentro de las 6 horas posteriores a su recogida. El volumen es de 225-250 mL. Se almacena congelado entre -30 a -70°C por un periodo de un año.
- E. **Crioprecipitado:** Debe prepararse dentro de las primeras 6 horas después de la extracción. Contiene FVIII y FvW. Cada unidad tiene en promedio 80 UI de factor VIII y al menos 250 mg de fibrinógeno. El volumen es de 10-15 mL y se almacena congelado entre -30 a -70°C durante un año; después de descongelado dura 4 horas.

Fundamento

La prueba de compatibilidad permite conocer si existe compatibilidad serológica entre la sangre de un donante y la de un receptor. Este procedimiento incluye la prueba cruzada, que consiste en poner en contacto el suero del receptor con eritrocitos del donante (prueba cruzada mayor) y eritrocitos del receptor con suero del donante (prueba cruzada menor). Esta prueba es requerimiento fundamental, porque es la mejor manera de detectar anticuerpos que puedan dañar los eritrocitos transfundidos y causar una reacción hemolítica transfusional. La incompatibilidad de las sangres puede provocar desde una simple aglutinación hasta una reacción hemolítica, por tanto la seguridad del paciente depende no solo de que las técnicas se realicen de forma adecuada, sino también de la debida identificación de grupos sanguíneos de receptor y donador.

Material e instrumentos

- Sangre venosa anticoagulada de un donante y de un receptor
- Suero del donante y del receptor
- Suspensión de eritrocitos al 5% del donante y del receptor
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Centrífuga
- Baño María a 37°C
- Termómetro

Reactivos

- Solución salina fisiológica al 0,85%
- Suero de Coombs
- Eritrocitos sensibilizados

Procedimiento

PRUEBA CRUZADA MAYOR

1. Seleccionar un donante y un receptor a los cuales ya se les ha realizado la verificación de los antígenos ABO/Rh.
2. Recolectar sangre venosa en dos tubos, uno de tapón lila y uno de tapón rojo para el donante (D) y realizar el mismo procedimiento para el receptor (R). Asegurarse de identificar correctamente los cuatro tubos.
3. A partir de las muestras de tapón lila del donador (D) y del receptor (R), preparar una suspensión de eritrocitos al 5% respectivamente.
4. Centrifugar ambos tubos de tapón rojo para obtener el suero del donante (D) y del receptor (R).

Fase I

5. Identificar un tubo de 13x100mm como prueba mayor (PM) y colocar en el, 2 gotas de suero del receptor (SR).
6. Agregar una gota de suspensión de eritrocitos al 5% del donador (D) y centrifugar a 3400 rpm/15'' o a 1000 rpm/1' (asegurarse que las pipetas empleadas para agregar

las células y el suero sean del mismo calibre, con el fin de mantener la proporción de suero a células en 2:1).

7. Observar el sobrenadante para detectar hemólisis. Desprender suavemente el tapón de células del fondo del tubo para observar si hay aglutinación. Anotar el resultado tubo en mano.

Fase II

8. Si el tubo resulta negativo, mezclar e incubar 15 minutos a 37°C.
9. Centrifugar según las normas (centrifugar a 3400 rpm/15'' o a 1000 rpm/1'), observar el sobrenadante para evidenciar la hemólisis, desprender suavemente el tapón de células del fondo del tubo y anotar los resultados, tubo en mano.

Fase III

10. Si el tubo continúa negativo, lavar los eritrocitos 4 veces con solución salina. Añadir solución salina hasta $\frac{3}{4}$ partes del tubo, mezclar y centrifugar a 3000 rpm durante 2 minutos.
11. Después del cuarto lavado y habiendo desechado el último sobrenadante, agregar 2 gotas de reactivo de Coombs poliespecífico y mezclar.
12. Centrifugar inmediatamente y leer desprendiendo suavemente el botón de células. Examinar si hay aglutinación, emplear ayuda visual (lupa, microscopio u otro) en caso de resultados negativos.
13. Anotar el resultado tubo en mano.
14. Si la prueba resulta negativa, añadir al tubo una gota de células control de Coombs, centrifugar, leer y anotar los resultados. **Esta prueba debe ser positiva, de lo contrario, los resultados no son válidos y el procedimiento debe repetirse por completo.**

PRUEBA CRUZADA MENOR

1. Identificar un tubo de 13x100mm como prueba menor (Pm) y colocar en el, 2 gotas de suero del donador (SD) y 1 gota de suspensión de eritrocitos al 5% del receptor (ER). Proceder de la misma forma que para la prueba mayor.

AUTOCONTROL

Es una prueba adicional que se realiza paralelamente con las pruebas cruzadas. Consiste en agregar en un tercer tubo debidamente identificado (AC):

1. Dos gotas de suero del receptor (SR).
2. Una gota de suspensión de eritrocitos al 5% del receptor (ER).
3. Procesar simultáneamente con la prueba mayor (PM) y la prueba menor (Pm), siguiendo el mismo procedimiento aplicado.

Este paso permite detectar una prueba de antiglobulina directa positiva, así como la presencia de rouleaux y otras anormalidades séricas que puedan causar problemas en la prueba mayor. Algunos centros realizan como parte del estudio del receptor la prueba de antiglobulina directa, suprimiendo el autocontrol en la prueba cruzada.

Interpretación

Se considera que existe compatibilidad si no se visualiza hemólisis o aglutinación en ninguno de los pasos de la prueba. Sin embargo el hecho de que la prueba sea compatible no garantiza que el suero del donador este exento de anticuerpos eritrocitarios clínicamente significativos; sólo indica que no se encuentran anticuerpos reactivos contra las células del receptor.

Cuando la prueba cruzada sea positiva (incompatible) pero exista aglutinación o hemólisis en la prueba autocontrol, el problema debe ser identificado. Si existen aloanticuerpos inesperados presentes en el suero del receptor estos deben ser identificados para usar el antisuero correspondiente y así confirmar que los eritrocitos del donador carecen del correspondiente antígeno.

Las pruebas cruzadas también pueden presentar incompatibilidad cuando hay presencia de autoanticuerpos, interacciones adversas con reactivos o por la formación de rouleaux, en todos estos casos el problema debe ser identificado y resuelto antes de entregar la sangre para transfusión.

Tabla No. 45. Diagrama de procedimientos en las pruebas cruzadas

	Fase I	Fase II	Fase III	Resultado
Prueba mayor (PM): Suero del receptor (SR) y eritrocitos del donador (ED)	<p>Tubo PM 2 gotas SR + 1 gota ED Aglutinación y/o hemólisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Negativo • Positivo: En este punto se termina la prueba 	<p>Al mismo tubo PM agregar: 2 gotas albúmina bovina / Incubar 15' a 37°C Aglutinación y/o hemólisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Negativo • Positivo: En este punto se 	<p>Al mismo tubo PM agregar: 2 gotas de Coombs Aglutinación y/o hemólisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Negativo • Positivo: En este punto se termina la prueba. 	<p>Si no se visualizo hemólisis o aglutinación en alguna de las fases: Compatibilidad</p>
Prueba menor (Pm): Eritrocitos del receptor (ER) y suero del donador (SD)	<p>Tubo Pm 2 gotas ER + 1 gota SD Aglutinación y/o hemólisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Negativo • Positivo: En este punto se termina la prueba 	<p>Al mismo tubo Pm agregar: 2 gotas albúmina bovina / Incubar 15' a 37°C Aglutinación y/o hemólisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Negativo • Positivo: En este punto se 	<p>Al mismo tubo Pm agregar: 2 gotas de Coombs Aglutinación y/o hemólisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Negativo • Positivo: En este punto se termina la prueba. 	<p>Si no se visualizo hemólisis o aglutinación en alguna de las fases: Compatibilidad</p>
Autocontrol (AC): Suero del receptor (SR) y eritrocitos receptor (ER)	<p>Tubo AC 2 gotas SR + 1 gota ER Aglutinación y/o hemólisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Negativo • Positivo: En este punto se termina la prueba 	<p>Al mismo tubo AC agregar: 2 gotas albúmina bovina / Incubar 15' a 37°C Aglutinación y/o hemólisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Negativo • Positivo: En este punto se 	<p>Al mismo tubo AC agregar: 2 gotas de Coombs Aglutinación y/o hemólisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Negativo • Positivo: En este punto se termina la prueba. 	<p>Cuando la prueba es positiva, permite detectar una prueba de Coombs directa positiva, interacción adversa con los reactivos o rouleaux.</p>

Anexo I

Procedimiento para la operación del sistema ADVIA 120

Inicio de día

1. Encender CPU y monitor del equipo ADVIA 120.
2. Iniciar sesión en Windows NT oprimiendo las teclas “ctrl+alt+supr” cuando la computadora muestre la pantalla de inicio de sesión.
3. Esperar a que cargue el software de ADVIA 120. Cuando la computadora termine de cargar el software, mostrara la ventana Iniciar/Cerrar sesión. Un mensaje en la línea de estado indica “Analizador no preparado”.
4. Encender el analizador oprimiendo el pulsador “On” en la pantalla táctil del equipo. Un mensaje en la línea de estado indica “Preparación del sistema en marcha”.
5. Iniciar una sesión en el sistema ADVIA 120 ingresando operador y contraseña.
6. Verificar el estado de proceso de arranque cuando se muestre la pantalla *Estado del sistema*. Esto se refiere a comprobar el estado de reactivos y los conteos de fondo. Si los conteos de fondo no están dentro de los límites hacer clic en el botón “Actualizar” para ejecutar otro ciclo de conteo de fondo. Si algún resultado sigue siendo inaceptable, realizar un lavado del sistema (consultar la guía del operador que se encuentra dentro del mismo sistema).
7. Dar clic en la pantalla “Opciones de sistema” → y actualizar la fecha para crear una nueva carpeta en el archivo *raw data*.
8. Dar clic en el icono de llave de tuercas que aparece en la parte derecha de la barra de estado para desplegar la lista de mantenimiento programado, proceder a realizar cada opción que aparezca y actualizar fecha de realización.
9. Procesar los controles para el sistema ADVIA 120, por el modo que más se emplee durante la jornada de trabajo (muestreador manual de tubo abierto, muestreador manual de tubo cerrado o automuestreador):
 - ADVIA TEST point Hematology Control Low
 - ADVIA TEST point Hematology Control Normal
 - ADVIA TEST point Hematology Control High
 - ADVIA TEST point Control Retic Low
 - ADVIA TEST point Control Retic High
10. Aceptar los controles si estos se encuentran dentro de $\pm 2SD$ (desviación estándar) con respecto a la media. Si los parámetros de control de calidad (CC) se encuentran dentro de este rango las casillas del panel de CC serán de color verde, si los parámetros de CC son igual o mayor de $\pm 3SD$ con respecto a la media las casillas serán de color rojo (+3SD) o amarillo (-3SD). Borrar los controles cuando se salgan del rango establecido.

Uso del automuestreador

Nota: Sólo si se cuenta con identificación de muestras por código de barras.

1. Insertar los tubos de muestra en una gradilla o rack para el sistema ADVIA 120 con la etiqueta de código de barras mirando hacia el frente (frente es el que presenta los códigos de barras que indican la posición de cada tubo y el número de rack).
2. Colocar el o los racks en la bandeja de entrada de muestras con las etiquetas mirando a la parte delante del equipo.

3. Oprimir el pulsador “Comenzar/Detener” en la pantalla táctil del equipo o en la pantalla de rutina del monitor.

Uso del muestreador manual de tubo cerrado

1. Identificar la muestra con el lector externo de código de barras (si se cuenta con identificación de muestras por código de barras) o introducir la identificación de la muestra con el teclado en la pantalla de “identificación manual de muestra”.
2. Insertar y empujar el tubo que contiene la muestra bien mezclada dentro del muestreador manual de tubo cerrado.
3. Sujetar el tubo hasta que la aguja de aspiración se introduzca en el tubo. La muestra es aspirada automáticamente y el indicador de muestreo parpadea.
4. Retirar el tubo cuando se escuche un timbre o hasta que el indicador deje de parpadear.

Uso del muestreador de tubo abierto

1. Identificar la muestra con el lector externo de código de barras (si se cuenta con identificación de muestras por código de barras) o introducir la identificación de la muestra con el teclado en la pantalla de “identificación manual de muestra”.
2. Mezclar la muestra por inversión (mínimo 10 veces).
3. Retirar el tapón del tubo y colocar la muestra debajo de la cánula de aspiración.
4. Subir el tubo hasta que la cánula este sumergida en la muestra, teniendo cuidado de que no toque el fondo del tubo.
5. Presionar la placa de aspiración que se encuentra detrás de la cánula. La muestra es aspirada automáticamente y el indicador de muestreo parpadea.
6. Retirar el tubo cuando se escuche un timbre o hasta que el indicador deje de parpadear.
7. Tapar nuevamente el tubo de la muestra.

Validación de resultados

1. Hacer clic en el menú Admin → Revisión/Edición.
2. Revisar los resultados mostrados y de acuerdo a los criterios de aceptación de resultados que se empleen se asigna un estatus: Aceptar, Repetir o Borrar.

Apagado del equipo o fin de día

1. Ir al menú Personalizar → Configuración → Fin de día.
2. Seleccionar la casilla de Cerrar Q.C. para transferir el archivo de CC diario al archivo de CC acumulado.
3. Hacer clic en Ok para iniciar la depuración de la base de datos.
4. Hacer clic en salir y confirmar.
5. Ir al menú Operaciones de rutina → Iniciar/Cerrar sesión.
6. Hacer clic en la opción “Apagar NT” y esperar a que se cierre el sistema.
7. Presionar el pulsador Off en la pantalla táctil del analizador cuando aparezca en el monitor el mensaje “Ahora puede apagar el ordenador”
8. Apagar el CPU y el monitor

Anexo II PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

INDICACIONES: Estas soluciones se van a preparar al inicio del curso, y se dividirán en 2 tipos que son:

- a) Aquellas que pesarán, disolverán y repartirán a cada equipo (2 personas) el mismo día de su preparación.
- b) Aquellas que SOLAMENTE se pesarán y guardarán hasta el día de su uso. Se tomarán en cuenta las siguientes instrucciones, para cada una de las soluciones:
 1. Pesar cada una de las sales de una solución y colocarlas en pequeñas bolsillas por separado y bien selladas, indicando: Nombre de la sal y cuanto se pesó. Esto para cada sal.
 2. Juntar cuantas bolsitas se hayan pesado en una bolsa con la siguiente etiqueta:

NOMBRE DE LA SOLUCIÓN
EN QUE VOLUMEN SE VA A DISOLVER
FECHA
NOMBRE DE LA PERSONA QUE PESÓ
 3. Entregar al Asesor.

Todas las soluciones se preparan con agua destilada.

1. EDTA (potásico o sódico) al 10% (P/V).

Prepararla y repartir 15 ml/Equipo.

EDTA..... 10 g
c.b.p..... 100 mL

2. Alcohol al 70%.

Cada equipo prepara su alcohol.

Etanol absoluto..... 70 mL
c.b.p. 100 mL

3. Solución diluyente de Drabkin.

Pesar, etiquetar y guardar (Determinación de Hemoglobina).

Ferricianuro de potasio.....0,20 g
Cianuro de potasio..... 0,05 g
Bicarbonato de sodio.....1,00 g
c.b.p..... 1000 mL

4. Líquido diluyente de Hayem.

Pesar, etiquetar y guardar (cuenta de eritrocitos).

Cloruro de mercurio..... 0,25 g
Cloruro de sodio.....0,50 g
Sulfato de sodio anhídrido.....2,50 g
c.b.p..... 100 mL

5. Líquido de Turk (Solución de ácido acético al 2%).

Prepararla y repartir 50 mL/Equipo.

Ácido acético glacial.....10 mL
Solución de violeta de Genciana al 1%..... 5 mL
c.b.p..... 500 mL

6. Oxalato de amonio al 1%

Pesar, etiquetar y guardar (Cuenta de plaquetas).

Oxalato de amonio.....1 g
Merthiolate..... 4 gotas
c.b.p. 100 mL

7. Colorante de Wright para sangre.

Este reactivo lo preparan los asesores.

En un mortero tritúrese 1 g del colorante en polvo certificado, agregando pequeñas cantidades de alcohol metílico absoluto (libre de acetona). Agréguese un total de 600 mL de alcohol. La evaporación del alcohol producirá un precipitado en las laminillas; si esto sucede, agréguese 20 mL de alcohol metílico por 100 mL de solución colorante. Déjese madurar el tiempo ya establecido en su laboratorio para sus tinciones.

8. Solución amortiguadora de fosfato para la tinción de Wright (pH de 6,8 a 7,2).

Este reactivo lo preparan los asesores.

Solución concentrada A: Se disuelven 27,6 g de fosfato sódico monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en 1000 mL de agua destilada (0,2 M):

Solución concentrada B: Se disuelven 28.39 g de fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4 ; ó 53,62 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$) en 1000 mL de agua destilada (solución 0,2 M también). Se mezclan los volúmenes de soluciones concentradas que se mencionan en la Tabla A-1, y se afora a 200 mL para obtener los valores correspondientes de pH:

TABLA A-1. Tabla de concentraciones.

mL de Solución A	ml de Solución B	c.b.p. 200 ml	pH final
51	49	100	6,8
45	55	100	6,9
39	61	100	7,0
33	67	100	7,1
28	72	100	7,2

8. Colorante para reticulocitos.

Reactivos comerciales.

Azul de cresilo brillante (hidrosoluble) o Nuevo azul de metileno.....1,0 g
Cittrato de sodio.....0,4 g
c.b.p de cloruro de sodio al 0,85 %.....100 mL

9. Solución de depósito al 10 % de cloruro de sodio (pH=7.4).

Pesar, etiquetar y guardar (prueba de Fragilidad Osmótica).

Cloruro de sodio.....9 g
 Na_2HPO_41.37 g
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$0,25 g
c.b.p.....100 mL

10. Solución al 1.2% de cloruro de sodio.

Viene de la solución anterior.

Se prepara diluyendo 60 mL (sol. anterior No. 10) de la solución de depósito de cloruro de sodio al 10 % (pH=7,4), hasta 500 mL.

11. Amortiguador de fosfato pH=7,4

Pesar, etiquetar y guardar (Hemoglobinas inestable).

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$0,9493 g
 KH_2PO_4 0,1814 g
c.b.p..... 100 mL

12. Solución Salina Isotónica (0,85%).

Pesar, etiquetar y guardar.

NaCl8,5 g
c.b.p.....1000 mL

13. Metabisulfito de sodio al 2%.

Pesar, etiquetar y guardar (Inducción de drepanocitos)

Metabisulfito de sodio.....0,5 g
c.b.p.....25 mL

14. Cloruro de calcio 0,025 M.

Reactivo comercial

Cloruro de calcio anhídrido.....0,28 g
c.b.p.....100 mL

OTRAS SOLUCIONES ALTERNATIVAS

1. Oxalato de potasio al 30% (P/V)

Oxalato de potasio.....30 g
c.b.p..... 100 mL

2. Oxalato de amonio y de potasio⁷.

Oxalato de amonio.....1.2 g
Oxalato de potasio.....0,8 g
c.b.p.....100 mL

3. Citrato de sodio (sal trisodica) al 3.8% (P/V).

Citrato de sodio.....3,8 g
c.b.p.....100 mL

4. Líquido diluyente de Dacie.

Solución de formaldehido al 40%.....10,0 mL
Solución de citrato disodico o trisódico 3% (p/v)..... 990 mL

5. Líquido diluyente de Gower.

Sulfato de sodio anhídrido..... 12.5 g
Ácido acético glacial..... 33,3 mL
c.b.p.....200 mL

6. Solución diluyente para cuenta de plaquetas.

Azul de cresil brillante.....100 mg
Citrato de sodio..... 3,8 g
Formaldehido al 40%.....0,2 mL
c.b.p.....100 mL

7. Colorante Wright-Giemsa.

Colorante de Wright.....9,0 g
Colorante de Giemsa.....1,0 g
Glicerina Neutra.....90,0 mL
Alcohol Metílico.....2,91 L

Colocar en un mortero los colorantes de Wright y Giemsa. Tratar de disolver los colorantes agregados poco a poco la glicerina y el metanol, "trituyendo" con la mano del

⁷ Este anticoagulante en solución se utiliza en una proporción de 0,1 mL/mL de sangre.

mortero y vertiendo lo ya disuelto en un frasco ámbar grande. Continuar así hasta disolver lo más posible los colorantes y agotar la glicerina y el metanol. Vaciar en el frasco ámbar lo que quede de los colorantes no disueltos en el mortero, enjuagándolo con el metanol restante. Dejar madurar el colorante 2 a 3 semanas, agitando diariamente. Filtrar antes de usar.

8. Solución Buffer para tinción de Wright (pH=6,4).

Fosfato disódico anhídrido.....	9,47 g
Fosfato monopotásico.....	9,08 g
c.b.p.....	1000 mL

9. Solución de Nuevo Azul de Metileno para Reticulocitos.

Oxalato de potasio.....	1,6 g
Colorante nuevo azul de metileno.....	0,5 g
c.b.p.....	100 mL

10. Solución al 1% en alcohol metílico de Azul de cresilo brillante.

En un matraz disolver 1g de azul de cresilo brillante en 90 mL de alcohol metílico y completar hasta 100 mL.

Referencias:

1. Vives CJA, Aguilar B JL. *Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología*. 3ª ed. España: Elsevier-Masson, 2006
2. Ruíz RG. *Fundamentos de interpretación clínica de los exámenes de laboratorio*. México: Editorial Medica Panamericana; 2004.
3. Ruiz AGJ. *Fundamentos de Hematología*. 3ª ed. México: Panamericana; 2003.
4. Miale JB. *Hematología medicina de laboratorio*. España: Reverte, 1985.
5. Morán VL. *Obtención de muestras sanguíneas de calidad analítica, mejora continua de la calidad preanalítica*. México: AMBC-Panamericana; 2001.
6. Rodak BF. *Hematología. Fundamentos y aplicaciones clínicas*. 2ª ed. Argentina: Manual Moderno; 2002.
7. Lewis SM; Bain BJ; Bates I. *Dacie y Lewis Hematología práctica*. 10ª ed. España: Elsevier; 2008.
8. McKenzie SB. *Hematología clínica*. 2ª ed. México: Manual Moderno; 2000.
9. Beutler E; Kipps TJ; Coller BS; Seligsohn U; Lichtman MA. *Williams Hematología*. 6a ed. México: McGraw-Hill; 2000
10. Hoffbrand AV; Catovsky D; Tuddenham EGD. *Postgraduate Haematology*. Fifth edition. USA: Blackwell Publishing Ltd; 2005.
11. Alcaraz LJL. *Banco Central de Sangre*. México: Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social; 2005.
12. Moyano, HR. *El banco de sangre y la medicina transfusional*. México: Medica Panamericana; 2004.
13. Mollison, PL. *Transfusión de sangre en medicina clínica*. España: Reverte; 1987.
14. Romero RT... [et al.]. *Manual de Técnicas y Procedimientos en Banco de Sangre*. 2ª Ed. México: Editorial Prado, 2003
15. Overfield J, Dawson M, Hamer D. *Trasnfusion Science*. 2nd Edition. Malta: Scion Publishing Ltd, 2008
16. Treseler, K. M. *Laboratorio clínico y pruebas de diagnostico*. México: Manual Moderno; 1999.
17. Hillman RS; Boggs DR; Thomson AR. *Manual de Hematología*. 2ª ed. México: Manual Moderno; 1998.
18. Turgeon ML. *Hematología clínica: teoría y procedimientos*. México: Manual Moderno, 2006.
19. De Matías L. *La sangre y sus enfermedades*. España: Edimat Libros; 2003.
20. Velez, OA. *Introducción a la Hematología*. 2ª ed. México: Sociedad Mexicana de Hematología; 1998.
21. Jaime PJC; Gómez AD. *Hematología la sangre y sus enfermedades*. México: McGraw-Hill/Interamericana, 2005.
22. Ulloa AC; Ulloa TJC. *Hematología Básica*. 2ª Ed. México: Ciencia y Cultura Latinoamericana, S.A. de C.V. 1995
23. Borbolla EJR; López HMA. *Hematología. Algoritmos diagnósticos*. México: McGraw-Hill/Interamericana; 2008.
24. McPhee SJ... [et al.]. *Fisiopatología médica: una introducción a la medicina clínica*. México: Manual Moderno; 2001.
25. Pfrundschuh M; Schölmerich J. *Fisiopatología y Bioquímica*. Madrid, España: Elsevier Science; 2002.

26. González de Buitrago AJM... [et al]. *Bioquímica clínica*. España: McGraw-Hill/Interamericana; 1998.
27. Guizar VJJ. *Genética clínica. Diagnostico y manejo de las enfermedades hereditarias*. 3ª Ed. México: Manual Moderno; 2001.
28. Balcells GA. *La clínica y el laboratorio. Interpretación de análisis y pruebas funcionales (Exploración de los Síndromes, cuadro biológico de las enfermedades)*. 18ª Ed. Barcelona, España: Masson; 2001.
29. Handin RI; Lux SE; Stossel TP. *Blood. Principles and practice of Hematology*. 2th Ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2003.
30. Tefferi A. *Primary Hematology*. USA: Humana Press; 2001.
31. Munker R; Hiller E; Paquette R. *Modern Hematology. Biology and Clinical Management*. USA: Humana Press; 2000.
32. Mazza JJ. *Manual de Hematología Clínica*. España: Salvat Editores; 1990.
33. Hoffbrand AV; Pettit JE. *Hematología básica*. México: Editorial Limusa; 1991.