



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Visión general del diagnóstico en un  
laboratorio de pediatría de  
tercer nivel: fases preanalítica, analítica y  
postanalítica”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Química Farmacéutica Bióloga**

PRESENTA:

Ana Laura Miranda Alvarado

ASESOR: M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez

COASESORES: Dr. Roberto Joaquín Robles Ramírez

M. en C. Ma. Esther Muriel Argüelles Sánchez

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica.

Que presenta la pasante: Ana Laura Miranda Alvarado  
Con número de cuenta: 305179225 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 27 de Abril de 2017.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado	
<b>SECRETARIO</b>	Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga\*

## DEDICATORIA

A mis abuelitos Sofía y Rubén que han sido una parte muy importante de mi vida, que me ayudaron y apoyaron durante toda mi educación, que siempre velaron por mi bienestar, que me enseñaron a ser una mejor persona, que siempre tuvieron tiempo para jugar conmigo cuando era pequeña y que me encaminaron por el buen sendero; le doy gracias a Dios por darme a los mejores abuelos del mundo. Gracias por ser una parte importante en mi vida, por brindarme todo su cariño y por apoyarme durante todo este tiempo, los quiero mucho.

A mi mamá por todo su apoyo y cariño durante este camino, por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas. Por querer siempre lo mejor para mí, por todo tu trabajo y esfuerzo para poder concluir mis estudios te quiero mucho.

A mi papá por su cariño y apoyo estos últimos años y por su apoyo para terminar este proyecto te quiero mucho.

A Jorge Eduardo mi compañero de vida y mi compañero de carrera, que me apoyo durante todo este tiempo, que me brindo paciencia y amor y me ayudo a crecer como persona. Yoyi gracias por estar siempre a mi lado, por apoyarme y ayudarme, por darme siempre las fuerzas para seguir adelante, le doy gracias a Dios por ponerte en mi camino, te amo Yoyi.

A la señora Lupita y el señor Jorge por abrirme las puertas de su casa y darme su apoyo incondicional cuando más lo necesitaba, por ser tan buenas personas conmigo, los quiero mucho.

A mi amiga Rennica que me apoyo y me brindo su amistad durante todo este camino que hemos recorrido.

A mis hermosas compañeras Chensi y Valquiria, que me brindan todo su amor, que pasaron muchas noches a mi lado desvelándose, por alegrarme siempre la vida, por hacerme una mejor persona y por darme ese amor incondicional, doy gracia a Dios por ponerlas en mi camino, gracias por todo hermosas, las amo.

A todos mis familiares y amigos que a su forma me apoyaron y por cuestión de espacio no están en esta pequeña lista, gracias por todo su apoyo.



## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que nada quiero agradecerle a Dios por ayudarme a terminar este proyecto, gracias por darme las fuerzas y la inteligencia necesaria para poder concluir mis estudios y mi proyecto; por darme salud y una familia en la cual apoyarme.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de estudiar en una de las mejores universidades del mundo, por darme una gran formación académica y profesional; por colocar en este camino a excelentes Maestros que me ayudaron a crecer.

A mi asesora M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez por compartir todos sus conocimientos y experiencia conmigo, por creer y confiar en mí, por brindarme todo su apoyo para poder realizar este proyecto. Maestra gracias por todo su apoyo y amistad durante todo este tiempo. Y gracias por bríndame la oportunidad de realizar este proyecto en el Hospital de Pediatría de CMN SXXI.

A mis coasesores el Dr. Roberto Joaquín Robles Ramírez y la M. en C. Ma. Esther Muriel Argüelles que me brindaron la oportunidad y la confianza de realizar este proyecto en todas las áreas del laboratorio del Hospital de Pediatría, gracias por su apoyo.

A todos los Químicos, laboratoristas y auxiliares de laboratorio que me apoyaron durante todo este proyecto, en especial a la Q.F.B. Luz Ma., a la Q.F.B. Claudia, a la Q.B.P. María Felisa, al Q.F.B. Luis Ariel, al M. en C. Juan Manuel, a la Q.B.P. Teresita, a la Q.F.B. Tania, a la TLC Nayelli por brindarme todo su apoyo y amistad. Por tenerme paciencia y compartirme todos sus conocimientos, por darme la oportunidad de trabajar y aprender a su lado.

A los profesores que Dios puso en mi camino y me inspiraron, me compartieron todos sus conocimientos y me ayudaron a crecer académicamente y personalmente, personas que admiro mucho, gracias: Ana Laura Vázquez, Betsabé Rodríguez, Rosalba Bonilla, Ángel Martínez, Beatriz González, Lidia Rangel, Martha Patricia Zuñiga, Andrea Becerril, Georgina Franco.

## Índice

Índice de figuras .....	vii
Índice de tablas .....	ix
1. Introducción .....	10
Objetivo general .....	12
Objetivos particulares .....	12
2. Fase preanalítica.....	13
2.1 Tipos de muestra sanguínea: venosa, arterial, capilar .....	13
2.2 Toma de muestra por venopunción .....	14
2.3 Factores que influyen en la calidad de una muestra sanguínea .....	16
2.4 Recolección de muestras diversas biológicas.....	16
3. Fase analítica .....	18
3.1 Control de Calidad (CC) .....	19
3.1.1 Control de Calidad interno.....	19
3.1.2 Control de Calidad externo .....	19
3.1.3 Gráfica de Levey-Jenning .....	20
3.1.4 Error aleatorio.....	21
3.1.5 Error sistemático .....	21
3.1.6 Reglas de Westgard.....	21
3.2 Calibración.....	22
3.3 Mezcla de sueros.....	22
4. ÁREAS ANALÍTICAS DEL LABORATORIO CENTRAL DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA.....	23
4.1 Banco de sangre .....	23
4.1.1 Recepción de muestras piloto y papelería .....	24
4.1.2 Determinación de grupo sanguíneo ABO y Rh .....	24
4.1.3 Anticuerpos irregulares o atípicos.....	26
4.1.4 Prueba directa de Coombs .....	27
4.1.5 Título de crioaglutininas .....	27
4.2 Inmunobioquímicas y hormonas.....	28
4.2.1 Módulo de ion selectivo .....	32

4.2.2 Módulo de inmunoturbidimetría .....	32
4.2.3 Módulo de Quimioluminiscencia.....	33
4.2.4 Módulo de Fotometría .....	33
4.2.5 Módulo de Cinética enzimática .....	34
4.3 Coagulación .....	35
4.3.1 Pruebas coagulométricas .....	37
4.3.2 Pruebas cromogénicas.....	37
4.3.3 Inmunológicas.....	38
4.4. Hematología .....	38
4.4.1 Tinción de Wright .....	42
4.5 Bacteriología.....	43
4.5.1 Urocultivos y coprocultivo.....	43
4.5.2 Líquidos corporales.....	44
4.5.3 Cultivos diversos.....	44
4.5.4 Hemocultivos .....	45
4.5.5 BAAR .....	45
4.5.6 Identificación de microorganismos .....	47
4.5.6.1 Tinción de Gram.....	47
4.5.6.2 Tinción de Ziehl Neelsen.....	49
4.5.6.3 Equipo BacT/ALERT®.....	49
4.5.6.4 Equipo Vitek®.....	49
4.6 Inmunología.....	52
4.6.1 Inmunofluorescencia (IFI).....	53
4.6.2 ELISA .....	55
4.6.3 Floculación .....	56
4.6.4 Aglutinación .....	57
4.6.5 Citometría de flujo.....	57
4.7 Pruebas especiales .....	59
4.7.1 Fragilidad osmótica.....	59
4.7.2 Tamiz metabólico en orina .....	60

4.7.3 Electrolitos en sudor .....	61
4.8 Urgencias .....	63
4.8.1 Gasometrías .....	63
4.8.2 Microscopia de líquidos .....	64
5. Fase post-analítica .....	65
6. Resultados .....	65
7. Discusión .....	66
8. Conclusiones .....	68
Bibliografía .....	69

## Índice de figuras

Figura 1. Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund.....	11
Figura 2Etapas de la fase preanalítica cruciales en el desarrollo del proceso del laboratorio	13
Figura 3. Localización de las diferentes venas para la recolección de muestra sanguínea .	15
Figura 4. Orden de toma para recolección de sangre venosa .....	15
Figura 5. Ejemplo del comportamiento del reactivo albúmina del equipo MODULAR EVO en una gráfica de Levey-Jenning .....	20
Figura 6. Fenotipos del sistema ABO .....	24
Figura 7. Ejemplo de la determinación de un grupo sanguíneo en tarjeta (Grupo: "O" Rh: negativo).....	25
Figura 8. Método de microaglutinación en gel. Identificación de Ac irregulares .....	27
Figura 9. Analitos que sirven para determinar la función de los distintos órganos. ....	29
Figura 10. Equipo MODULAR EVO® utilizando en el área de inmunobioquímicas y hormona .....	30
Figura 11. Esquema de la técnica de fotometría .....	34
Figura 12. Modelo celular de la hemostasia .....	36
Figura 13. Equipo ACLTOP500® utilizado en el área de coagulación .....	37
Figura 14. Histogramas de una BH (paciente con leucocitos y plaquetas bajas; con presencia de células inmaduras).....	40
Figura 15. Equipo Sysmex XE-2100® utilizado en el área de Hematología .....	40
Figura 16. Paciente diagnosticado con sepsis. ....	41
Figura 17. Paciente diagnosticado con síndrome hemolítico. ....	41
Figura 18. Paciente diagnosticado con Leucemia linfoblástica.,.....	42
Figura 19. Ejemplos de cultivos diversos; herida (izquierda) y exudado faringeo (derecha)	44



Figura 20. Medios de hemocultivo para equipo BacT/ALERT® (aerobio y anaerobio) .....	45
Figura 21. Tinción de Ziel Neelsen para BAAR (imagen izquierda), medio de cultivo Löwenstein-Jensen para BAAR (imagen derecha) .....	46
Figura 22. Campana de flujo laminar para la siembra de baciloscopias .....	46
Figura 23. Características de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. ....	48
Figura 24. Principales estructuras de las bacterias .....	48
Figura 25. Clasificación básica de los mecanismos del Sistema Inmune. (Palomo, 2009) ...	52
Figura 26. Prueba de anti-DNA positiva en paciente con diagnóstico de Lupus eritematoso sistémico (LES).....	54
Figura 27. Modelo de técnica ELISA indirecto.....	55
Figura 28. Técnica de ANA positiva en paciente con diagnóstico de LES, se observa un patrón moteado .....	56
Figura 29. Técnica de aglutinación. Prueba positiva para VDRL .....	57
Figura 30. Fundamento de la citometría de flujo para células CD4+ .....	58
Figura 31. Equipo Alere Prima® utilizado en el área de Inmunología para el conteo de células CD4+ .....	59
Figura 32. Curva de fragilidad osmótica.....	60
Figura 33. Ejemplo de la realización del tamiz en orina, se colocan tres tubos por prueba (de derecha a izquierda) muestra de paciente, control negativo, control positivo.....	61
Figura 34. Equipo CHLORDOMETER utilizado en el área de pruebas especiales para la determinación de electrolitos en sudor .....	62
Figura 35. Equipo GEM Premier 3000® utilizado en el área de urgencias para el proceso de gasometrías .....	64

## Índice de tablas

Tabla 1. Muestras diversas y como recolectarlas correctamente. ....	17
Tabla 2. Variables preanalíticas.....	18
Tabla 3. Esquema transfusional para glóbulos rojos empacados (NOM-253-SSA1-2012, 2012) .....	25
Tabla 4. Esquema transfusional de plasma (NOM-253-SSA1-2012, 2012) .....	25
Tabla 5. Pruebas que se realizan en el equipo MODULAR EVO® de acuerdo a sus módulos	31
Tabla 6. Fundamento de inmunoturbidimetría (Hernández, 2010) .....	33
Tabla 7. Pruebas que se realizan en el área de coagulación .....	36
Tabla 8. Medios para pruebas de bacteriología de rutina en el laboratorio de Pediatría ...	51
Tabla 9. Patrón de autoanticuerpos asociado a cada enfermedad autoinmunitaria .....	53

## 1. Introducción

Los laboratorios clínicos representan un apoyo primordial para el área médica, ya que a través de los análisis realizados en ellos se pueden diagnosticar diferentes patologías y establecer el tipo de tratamiento que se debe administrar al paciente.

Es imprescindible conocer el método analítico a utilizar entendiendo por tal el conjunto de instrucciones escritas que describen el procedimiento, los materiales y el equipamiento que necesita el analista para obtener resultados.

Concretamente, los detalles de interés del método analítico son:

1. Fundamento con referencias bibliográficas.
2. Características técnicas de los instrumentos y del material (con detalles para que el analista juzgue qué instrumentos o modelos de instrumentos se pueden utilizar).
3. Lista de reactivos con la composición, concentraciones y origen, así como el nombre comercial y la pureza. También se ha de indicar la concentración de los calibradores, el método utilizado para asignar valores y los límites de tolerancia de los valores.
4. Condiciones del espécimen (muestra): volumen, conservantes o anticoagulantes, condiciones de almacenamiento y horario de recolección recomendado.
5. Descripción de todos los pasos del procedimiento analítico, indicando los pasos críticos y tolerancias que se pueden permitir en las mediciones.
6. Procedimiento de calibración y método de cálculo de los resultados.
7. Intervalo analítico: intervalo de magnitud en la que se puede aplicar el método sin ninguna modificación. La imprecisión y la inexactitud aumenta en los extremos del intervalo analítico.
8. Precauciones especiales de seguridad en la manipulación de especímenes, preparación de reactivos, eliminación de residuos y en los métodos apropiados para descontaminar (si es necesario) (Prieto, 2003).

Las fases que comprende el proceso analítico son:

- Fase preanalítica: incluye todos los procesos desde la solicitud del análisis por parte del clínico, hasta el procesamiento de la muestra.
- Fase analítica: abarca todos los procedimientos relacionados directamente con el procesamiento de la muestra hasta la obtención de resultados.
- Fase postanalítica: se fundamenta en la validación de resultados, elaboración y emisión del informe por parte del laboratorio.

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

La Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund" ubicada en el Centro Médico Nacional Siglo XXI se fundó el 15 de marzo de 1963 con 12 especialidades.

Los sismos de septiembre de 1985 dañaron su estructura, pero acrecentaron el espíritu de grupo de sus integrantes, lo que motivó un cambio sustancial en los procesos de asistencia, docencia e investigación para la solución de los problemas prioritarios de salud de la población infantil.

El nuevo Hospital inaugurado el 27 de abril de 1992, con una etapa previa de transición de reinicio de labores en el Hospital Anexo del CMN de 1989 a 1991, a diferencia del anterior, se estructuró con la filosofía de la Alta Especialidad correspondiente al tercer nivel de atención.

Su misión es otorgar atención médica de alta especialidad en padecimientos complejos a menores de 17 años, con un liderazgo efectivo y un enfoque sistémico de atención, sustentado en la investigación y la educación, garantizando la calidad y seguridad de los pacientes.

Su visión ser en el país, la Unidad Médica de Alta Especialidad líder en atención pediátrica y mantenerse como órgano consultivo en Pediatría, en todo el Sector Salud.

El laboratorio general de Pediatría cuenta con áreas de: Toma de muestras, Urgencias, Banco de sangre, Bacteriología, Inmunología, Hematología, Hematología especial, Coagulación, Inmunobioquímicas y hormonas, Uroanálisis.



**Figura 1. Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund"**

## Objetivo general

IncurSIONAR en un laboratorio de análisis clínicos de tercer nivel que agrupa una serie de secciones y cada una de ellas involucra pruebas muy completas para abarcar áreas específicas. Aplicando conocimientos adquiridos durante la licenciatura y aprendiendo el manejo de equipos automatizados; así como la realización de pruebas manuales; para adquirir nuevas habilidades dentro de un laboratorio clínico.

## Objetivos particulares

1. Realizar estancia en todas las áreas del laboratorio para así tener una visión general de cómo se trabaja en cada una de ellas.
2. Aprender y realizar tomas de muestras pediátricas; así como las condiciones de manejo de las muestras.
3. Aplicar y aprender los fundamentos de cada prueba en las diferentes áreas del laboratorio.
4. Aplicar criterios y toma de decisiones en el desarrollo de una prueba y emisión del resultado.
5. Aprender y aplicar los procedimientos de control de calidad en las diferentes áreas del laboratorio.
6. Relacionar resultados obtenidos con diagnóstico del paciente para así poder validarlos y así proporcionar resultados confiables.

## 2. Fase preanalítica

Probablemente, la fase preanalítica es la más compleja del proceso por la cantidad de etapas que incluye, la variabilidad del personal que interviene, con diversa formación y, en muchas ocasiones, ajeno al laboratorio y por su impacto en las fases posteriores.

Esta fase abarca todos los procesos (Figura 2) desde el momento en que se solicitan las pruebas hasta que la muestra ya preparada, entra en la fase analítica (Hernández, 2010).

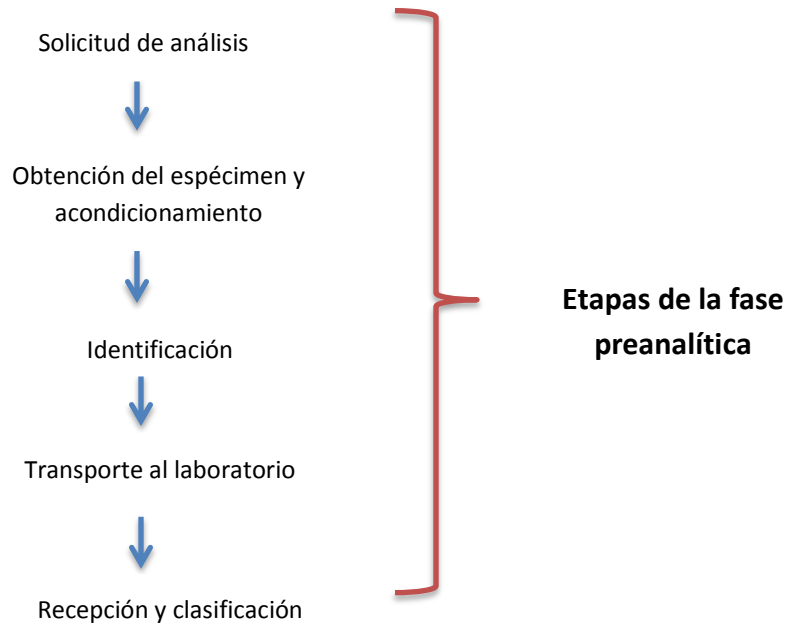


Figura 2. Etapas de la fase preanalítica cruciales en el desarrollo del proceso del laboratorio (Campal, 2005)

### 2.1 Tipos de muestra sanguínea: venosa, arterial, capilar

La recolección y el análisis correctos de una muestra de sangre son esenciales, pues de ellos depende la calidad de los resultados obtenidos y, en consecuencia, de los emitidos para la práctica clínica. Debido a que se trata de una muestra poco invasiva en su toma que refleja el estado general de salud en su composición.

El acceso a la circulación sanguínea se hace a través de los vasos sanguíneos y según el factor que se quiera determinar, se seleccionará la vía de acceso. Las vías de acceso más usuales son:

- **Vía venosa:** es la que más se utiliza, ya que tiene menos posibilidades de causar un traumatismo al paciente, mayor facilidad de acceso y permite la obtención de un volumen de sangre adecuado.

La zona idónea para la venopunción es la fosa antecubital, en la parte anterior del brazo bajo el codo; la distribución de las venas en esta zona, para un 70% de las personas, es en forma de “H”, representadas por las venas cefálica, cubital mediana y basílica. En el 30% restante se asemeja a una “M”, representada por las venas cefálica, cubital mediana, basílica mediana y basílica. Las que más se utilizan son las venas cefálica y cubital mediana. Cuando estas venas no están disponibles o no son accesibles, se opta por utilizar las venas del dorso de la mano.

- **Vía arterial:** es una vía que se utiliza menos, ya que es dolorosa, de difícil acceso y el paciente puede tener riesgo de hemorragia y trombosis; en la práctica se emplea para la determinación de gases y pH.

El lugar que más se emplea para este tipo de punción es la arteria radial, en la zona interna de la muñeca, o en la arteria humeral en la flexura del antebrazo porque representa menor riesgo.

- **Vía capilar:** es una vía de fácil acceso y tiene pocas posibilidades de provocar un traumatismo al paciente. Normalmente se emplea en neonatología, por el difícil acceso a las vías venosas, pero el volumen de sangre que se obtiene es menor. (Hernández, 2010)

## 2.2 Toma de muestra por venopunción

- Observar la vena de mayor calibre y más adecuada
- Colocarse los guantes
- Situar el torniquete a 7.5-10cm de la zona elegida, para aumentar la presión intravascular, facilitar la palpación de las venas y mejorar la obtención de la sangre. Su aplicación no debe exceder más de un minuto, pues un uso inadecuado del torniquete puede dar lugar a valores falsamente altos, errores en el diagnóstico a causa de hemólisis, así como complicaciones de la extracción y hematomas.
- Limpiar la zona con algodón impregnados en alcohol isopropílico o etílico al 70% y efectuar un ligero masaje circular sobre la piel, desde dentro hacia afuera; esperar 30 segundos antes de aplicar la técnica (Fig. 3).
- Extracción de la muestra: se recomienda utilizar el sistema de vacío, porque es un mecanismo de seguridad que evita las exposiciones accidentales a la inoculación y la hemólisis; así como el incorrecto llenado de los tubos. Hacer una punción lo menos traumática posible para asegurar la calidad de la muestra; llenar los tubos

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

en el orden adecuado, homogenizando al retirar cada uno de ellos el número de veces indicado en la Fig. 4 (Hernández, 2010).

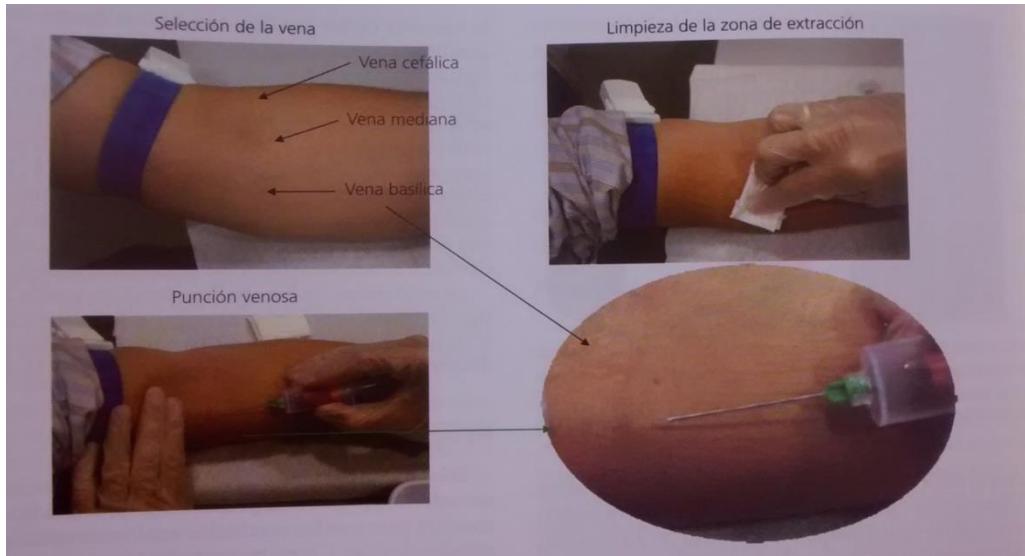


Figura 3. Localización de las diferentes venas para la recolección de muestra sanguínea. (Hernández, 2010)

#### Orden de toma para recolección de sangre venosa











Tapón	Contenido de tubo	Área de uso	Inversiones
	Hemocultivo	Microbiología	5 veces
	Citrato de sodio	Coagulación (Tiempos de coagulación fibrinógeno, y agregación plaquetaria)	3 a 4 veces
	Gel separador	Química clínica	5 veces
	Sin anticoagulante, con activador de coagulación, con silicón	Química clínica, banco de sangre serología	8 a 10 veces
	Gel separador y trombina	Obtención de suero rápido	5 a 6 veces
	Gel separador y heparina de litio	Química clínica en plasma	5 veces
	Heparina de sodio/litio	Química clínica (urgencias) hematología (fragilidad osmótica)	8 a 10 veces
	EDTA <sub>K2</sub>	Hematología, banco de sangre	8 a 10 veces
	Gel separador y EDTA <sub>K2</sub>	Determinaciones de carga viral	8 a 10 veces
	Oxalato de Potasio/NaF	Química clínica, pruebas de lactato y glucosa	8 veces

Figura 4. Orden de toma para recolección de sangre venosa



### 2.3 Factores que influyen en la calidad de una muestra sanguínea

- **Hemólisis:** se define como la salida de los componentes intracelulares de los hematíes al plasma o suero, lo que le confiere un color rojizo a la muestra. La causa más frecuente es una extracción dificultosa y se genera por la liberación de cantidades muy elevadas de enzimas como LDH TGO y electrolitos como  $K^+$ . La presencia de esta en una muestra, según el grado en el que se haya producido, puede invalidar la prueba y hay que informar de su existencia para sopesar la validez de los resultados.
- **Lipidemia:** puede deberse a no haber guardado el ayuno recomendado o a problemas metabólicos.
- **Almacenamiento:** las muestras deben colocarse siempre en contenedores cerrados para evitar su evaporación, ya que esta merma también puede producirse cuando se almacenan en los refrigeradores. Se deben colocar siempre en posición vertical.
- **Evaporación:** el contacto con el aire incrementa la evaporación o sublimación de la muestra, lo cual resulta en el aumento en la concentración de algunos componentes.
- **Efecto de la luz:** proteger de la luz para determinar ciertos parámetros como: porfirinas, vitamina D, entre otras.
- **Congelación y descongelación:** la homogenización inadecuada de las muestras después de la congelación es una causa de error habitual. La muestra, tras la descongelación, se debe homogenizar; así como evitar congelar y descongelar en repetidas ocasiones.
- **Tiempo de procesamiento:** existen analitos que tienen que ser analizados rápidamente porque se degradan o bien conservarlos a ciertas temperaturas para preservar su vida media (cortisol, ACTH, crioglobulinas) (Hernández, 2010).

### 2.4 Recolección de muestras diversas biológicas

Además de la sangre existen otras muestras que se analizan para determinar alguna infección o los metabolitos que poseen ese tipo de muestras como: orina, heces, heridas, exudados, expectoraciones, entre otras.

Debido a que la mayoría de estas muestras no se recolectan en el laboratorio se deben seguir las instrucciones proporcionadas por éste para obtener una muestra de calidad y que proporcione resultados confiables. Es importante la correcta identificación de espécimen con los datos del paciente, en caso de hemocultivos especificar el lugar de toma de la muestra, en los coproparasitoscópicos de tres muestras indicar el número de muestra (1-3).

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

**Tabla 1. Muestras diversas y como recolectarlas correctamente.**

Muestra	Condiciones previas	Procedimiento
<b>Orina para EGO</b>	Aseo previo de la zona genital	Recolectar la primera orina de la mañana, desechar el primer chorro y recolectar de chorro medio en un envase limpio. En el caso de los bebés se les proporciona a los padres una bolsa recolectora.
<b>Orina para Urocultivo</b>	Aseo previo de la zona genital con jabón neutro con benzal tópico. Sin estar tomando antibióticos	Recolectar la orina de chorro medio en un envase estéril. En el caso de bebés colocar la bolsa de recolección y tener cuidado de que no se salga la orina.
<b>Orina de 24 hrs</b>	Aseo previo de la zona genital	Recolectar toda la orina del día, tarde y noche durante 24 hrs; anotando la hora de inicio y la hora de término. Es importante recolectarla en un envase limpio; de preferencia de agua si el laboratorio no proporciona envase especial
<b>Heces para coprocultivo</b>	Sin estar tomando antibióticos	Recolectar las heces en un envase estéril
<b>Heces para coproparasitoscópicos</b>		Recolectar las heces de 1,2 o 3 días dependiendo de lo solicitado por el médico. Mantener las muestras en refrigeración
<b>Heces para coprológico y para detección de grasa</b>	No utilizar talco, crema o pomadas	Recolectar las heces en un frasco limpio y en el caso de los bebés no recolectar de pañal
<b>Exudado faríngeo</b>	No realizar aseo bucal, sin haber ingerido alimentos o bebidas 8 horas previas a la toma.	Con un hisopo tomar la muestra de la zona que presente inflamación o enrojecimiento; teniendo cuidado de no tocar mucosa oral, lengua o dientes
<b>Exudado nasal</b>	Sin previo aseo nasal	Con un hisopo estéril tomar muestra profunda de ambas fosas nasales
<b>Expectoración</b>	Enjuagar la boca con solución salina estéril	Obtener esputo luego de un esfuerzo de tosa, preferentemente de la mañana. Es importante que la muestra no sea de saliva, sino de tos profunda.
<b>Hemocultivo</b>	Realizar previa asepsia con yodo y alcohol etílico al 70% en la zona de punción; creando un campo estéril. Recolectar las muestra previa al tratamiento de antibióticos	Con una jeringa recolectar de 1-2 mL de sangre y en condiciones estériles depositar la sangre en el medio. Se recomienda tomar dos muestras de diferente sitio de punción. Preferentemente cuando el paciente presenta fiebre.
<b>Líquidos diversos</b>	Realizar previa asepsia	Este tipo de muestras son tomadas por los médicos, ya sea por punción lumbar en caso de LCR o por paracentesis cuando se trata de líquidos en procesos inflamatorios o infecciosos.

Existen factores que afectan de forma importante los resultados (Tabla 2). El efecto incluso puede invalidar la interpretación del resultado analítico. Las causas de la variabilidad biológica pueden ser endógenas, como los ritmos circadianos hormonales, o exógenas, como el estrés o la actividad física antes de la extracción y son modificables.

**Tabla 2. Variables preanalíticas**

Variabilidad biológica no modificable	Edad Sexo Raza
Variabilidad biológica modificable	Variaciones cíclicas Dieta Actividad: ejercicio o estrés Entorno Ingesta de fármacos
Variabilidad debida al momento de extracción	Postura Tiempo de aplicación del torniquete
Variabilidad debida al espécimen	Características físicas Estabilidad de los constituyentes Recipiente de la muestra

### 3. Fase analítica

En la fase analítica, se incluye como faceta principal el desarrollo de los métodos analíticos específicos, necesarios para conocer los valores de las distintas pruebas solicitadas para cada paciente. Hoy en día, todo está protocolizado según los criterios que indican los fabricantes de reactivos y según las características técnicas de los autoanalizadores que se utilizan para cada técnica. Las distintas casas comerciales responsables de las técnicas y autoanalizadores, entregan como mínimo con cada reactivo, la siguiente información: el principio activo del reactivo, (si es un kit, los componentes del mismo), la ficha técnica del reactivo con los criterios y datos necesarios para protocolizar la técnica, las prestaciones, las características de funcionamiento, la conservación y la estabilidad, así como el control de calidad. Una vez que se han protocolizado todas las técnicas y se han cargado; se realiza la calibración de cada técnica introducida. Por último, se procede a realizar un control interno para cada una de ellas (Quesada, 2010).

En el proceso analítico se pueden distinguir cuatro etapas fundamentales:

- Validación de la técnica
- Introducción de controles de calidad
- Calibración de equipos o instrumentos en caso de que se requiera
- Procesado de muestras

### **3.1 Control de Calidad (CC)**

El Control de Calidad en el laboratorio clínico es un sistema diseñado para incrementar la probabilidad de que cada resultado reportado por el laboratorio sea válido y pueda ser utilizado con confianza por el médico para tomar una decisión diagnóstica o terapéutica. Los procedimientos de Control de Calidad funcionan detectando los errores analíticos, idealmente cualquier error suficientemente grande para invalidar la utilidad médica de los resultados de laboratorio debe ser detectado. En la práctica, muchos procedimientos de Control de Calidad operan introduciendo controles (materiales de muestras bien caracterizadas por ensayos previos) al proceso de ensayo del laboratorio y comparando los resultados de la prueba con el rango de valores esperado derivado del ensayo previo (Cooper, 2007).

#### **3.1.1 Control de Calidad interno**

Es el análisis de una o más muestras control, de valores conocidos, utilizadas al mismo tiempo y en paralelo con las muestras de los pacientes. Permite evaluar la precisión del sistema analítico.

El control debe realizarse con el mismo método, equipo y personal que las muestras de los pacientes; así cuando no se observan anomalías en los controles se concluye que las determinaciones de las muestras de pacientes son fiables y se puede proceder al informe de resultados (Vargas, 2006).

#### **3.1.2 Control de Calidad externo**

El control de calidad externo compara el desempeño analítico entre diferentes laboratorios. Es llevado a cabo por instituciones públicas o privadas, que envían muestras liofilizadas de un mismo lote de suero a distintos laboratorios para el análisis de varios componentes séricos.

Cada laboratorio efectúa los análisis y envía los resultados a la institución encargada de procesar los datos. Luego ésta envía un informe a cada laboratorio indicando su posición con respecto a los demás participantes. A través del control de calidad externo, cada laboratorio mantiene en forma continua una comparación de sus resultados con otros laboratorios. Esto permite detectar errores sistemáticos que no se manifiestan en el control de calidad interno, como por ejemplo, errores en la determinación del valor promedio del suero control. Además, el seguimiento del control de calidad externo permite detectar errores sistemáticos que aumentan lentamente y no son percibidos por el control de calidad interno (Vargas, 2006).

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

### 3.1.3 Gráfica de Levey-Jenning

Generalmente, una gráfica sirve para anotar los valores obtenidos durante un mes (31 días).

Al trazar las líneas en la gráfica, se establecen los siguientes límites:

- *Límite de aviso:* Corresponde a las líneas que tienen asignado el valor de la media  $\pm 1$  DE. Este límite establece un nivel de confianza del 68%, es decir, de cada 100 veces que se realiza una determinación, 68 resultados deben estar dentro de este límite.
- *Límite de alarma:* Corresponde a las líneas que tienen asignado el valor de la media  $\pm 2$  DE. Este límite establece un nivel de confianza del 95%.
- *Límite de acción:* Corresponde a las líneas que tienen asignado el valor de la media  $\pm 3$  DE. Este límite establece un nivel de confianza del 99,73% (Fig. 5).

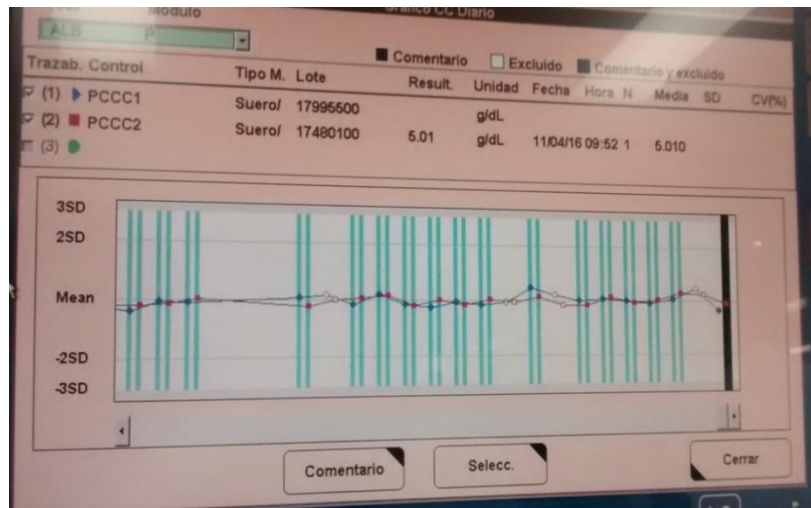


Figura 5. Ejemplo del comportamiento del reactivo de albúmina del equipo MODULAR EVO® en una gráfica de Levey-Jenning

La inspección visual de los resultados anotados en la gráfica de Levey-Jenning permite el descubrimiento de alteraciones en la determinación, entre las que destacan las siguientes:

- **Desplazamiento:** es la desviación de todos los valores hacia arriba o hacia abajo de la línea media. Si es progresivo se llama tendencia al alza o a la baja. Indica la existencia de una inexactitud ocasionada por un error sistemático.
- **Oscilación:** es la presencia de numerosos valores tanto en niveles bastante superiores como en niveles bastante inferiores al de la media. Si sólo se aleja un valor de la línea media, la alteración recibe el nombre de salto.

Tanto la oscilación como el salto se deben a errores aleatorios (Control de calidad en el laboratorio, 2013).

### 3.1.4 Error aleatorio

Involucra la precisión del procedimiento de medición, lo cual afecta la reproducibilidad. Son impredecibles inherentes a toda medición, pueden ser ocasionados por factores como: fluctuaciones en la temperatura y energía eléctrica, variación entre técnicos en las mediciones, material mal lavado, agitación incorrecta entre otras. Afectan la precisión de la prueba y son detectados a través de un control interno de calidad (Salazar, 2015).

### 3.1.5 Error sistemático

Implica la veracidad del procedimiento. Se presentan de manera continua y definida; estos errores incluyen instrumentales, personales, errores de aplicación y se puede corregir con calibración. Afectan la veracidad y son detectados a través de un control de calidad interno y externo (Salazar, 2015).

### 3.1.6 Reglas de Westgard

Son una serie de reglas usadas en el procedimiento de control de calidad para analizar la medición del control. Si cualquiera de las reglas es violada, entonces la corrida analítica debe invalidarse y los resultados de las pruebas no son aceptados. Algunas son diseñadas para detectar un error aleatorio; otras detectan un error sistemático que puede indicar un sesgo en el sistema.

Los laboratorios usan comúnmente seis reglas en varias combinaciones. Las combinaciones de reglas son seleccionadas por los laboratorios y se basan en el número de niveles de control corridos con cada corrida analítica. El objetivo general es obtener una alta probabilidad de detectar el error y una baja frecuencia de falso rechazo de las corridas. Las seis reglas comúnmente usadas son:

**1<sub>3s</sub>**: Esta regla detecta un inaceptable error aleatorio y el inicio de un posible error sistemático. La corrida debe considerarse fuera de control por exceder 3DS; en este caso se rechaza la corrida.

**1<sub>2s</sub>**: Esta regla es de aviso. Indica si un control evaluado excede el límite de 2DS.

**2<sub>2s</sub>**: Esta regla detecta el error sistemático. Debe aplicarse dentro de las corridas inter ensayo. Esta regla es violada dentro de la corrida cuando dos valores consecutivos del control (o 2 de 3 valores control cuando se corren 3 niveles) exceden el “mismo” límite (media +2s) o (media -2s). La regla es violada entre las corridas cuando un valor previo para un nivel particular del control excede el “mismo” límite (media +2s) o (media -2s).

**R<sub>4s</sub>**: Esta regla detecta un error aleatorio intracorrída. Se presenta cuando valores consecutivos de dos diferentes controles exceden 4DS. En este caso la corrida se rechaza.

**4<sub>15</sub>**: Cuatro resultados de control superan 1DS del mismo lado, no requiere rechazo de la corrida. Identifica pequeños errores sistemáticos (2 controles) o diferencias analíticas (1 control) que no tienen significado clínico, y se resuelven con una calibración o mantenimiento del sistema.

**10**: Esta regla detecta el error sistemático. Se identifica cuando 10 puntos consecutivos exceden del mismo lado 1DS.

Para un control indica una diferencia sistemática (error) en un área de la curva de calibración. Para dos controles indica una diferencia sistemática (error) en toda la curva de calibración.

### 3.2 Calibración

Tiene como principal objetivo conocer si el método que está en estudio tiene una respuesta lineal y, de ser así, verificar que el intervalo de valores de interés clínico (intervalo de referencia: IR) pertenece al segmento lineal. De esta forma todos los resultados cuyos valores se encuentren en el intervalo lineal, se pueden calcular con un valor del calibrador, que debe tener una concentración próxima al límite superior del intervalo de referencia.

Un calibrador es un espécimen del que se conoce la concentración exacta del analito. El término calibrador se utiliza más al hablar de la solución estandarizadora de autoanalizadores. Los calibradores pueden ser para uno o múltiples analitos. El proceso de calibración consiste en que el autoanalizador realice la técnica tantas veces como calibradores sean adjuntados por el fabricante, para que el valor de la lectura obtenida para cada calibrador cuya concentración se conoce, sirva de referencia al sistema para que se puedan calcular los valores de las distintas muestras que procese con esa técnica. La validez de la calibración está determinada por la linealidad de la curva de calibración cuyos resultados estarán en concordancia con la concentración del calibrador usado. La calibración se realizará solo al implantar por primera vez un método analítico, o cuando los controles realizados muestren una alteración evidente que comprometa la calidad de los resultados analíticos (Quesada, 2010).

### 3.3 Mezcla de sueros

Consiste en una mezcla de varios sueros o de varios plasmas, realizada en el propio laboratorio analítico.

Los valores de concentración de cada uno de los analitos que contiene son desconocidos, pero se aproximan mucho a los que se consideran normales (valores comprendidos dentro del intervalo de referencia). Es el tipo de líquido de referencia más parecido a las muestras.

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

Se usa en ocasiones como sustitutivo de un control comercial, pero realmente solo es útil para practicar una evaluación de la precisión de los resultados (grado de dispersión encontrado entre los valores obtenidos al repetir una misma determinación sobre la misma muestra). En estos líquidos se debe conocer la presencia de VIH y VHB (Quesada, 2010).

## **4. ÁREAS ANALÍTICAS DEL LABORATORIO CENTRAL DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA**

### **4.1 Banco de sangre**

Esta área se basa en inmunohematología; que es la parte de la hematología que estudia los procesos inmunitarios que tienen lugar en el organismo en relación con los elementos sanguíneos.

Uno de los aspectos más importantes de la inmunohematología es el estudio y cuantificación de los grupos sanguíneos eritrocitarios que son componentes antigénicos presentes en la superficie de los hematíes, ya que se relaciona directamente con la terapéutica transfusional y la prevención de accidentes hemolíticos graves.

Los genes determinantes de los grupos sanguíneos transmiten, generalmente, caracteres codominantes (se expresan en homocigotos y heterocigotos). Todos los antígenos de los grupos sanguíneos han sido definidos serológicamente por la presencia de sus anticuerpos correspondientes (Dueñas, 2005).

Se divide en tres secciones: a) Recepción de pruebas piloto y papeletas solicitando concentrados eritrocitarios, plaquetas, plasmas y crioprecipitados; b) Semipaneles; c) Verificación de grupo sanguíneo en paquetes eritrocitarios y plaquetas, identificación de grupos sanguíneos, Coombs y título de crioaglutininas.



#### 4.1.1 Recepción de muestras piloto y papelería

Dentro de esta área se reciben las muestras piloto. Para realizar el semipanel, los médicos llenan una papeleta en la cual colocan los datos completos del paciente, fecha y hora de la toma de muestra; esto para pacientes que necesiten una transfusión sanguínea.

También se reciben papeletas solicitando concentrados eritrocitarios, plaquetas, plasma y/o crioprecipitados. Cabe destacar que no se proporcionan paquetes eritrocitarios si la prueba piloto tiene más de 72 horas de haberse realizado. Esto con el fin de evitar reacciones transfusionales.

#### 4.1.2 Determinación de grupo sanguíneo ABO y Rh

La prueba para la clasificación sanguínea de rutina se basa en una técnica de hemaglutinación. Se utilizan reactivos comerciales que contienen anticuerpos específicos para cada antígeno, que se mezclan con la sangre a clasificar. Después de mezclar una gota reactivo con una gota de sangre se observa la hemaglutinación. Se pueden realizar en placa de vidrio, en tubo y en tarjeta.

Idealmente las pruebas de rutina para determinar el grupo sanguíneo ABO deben hacerse en dos partes: primero buscando en los eritrocitos la presencia de antígenos A y/o B en la membrana (prueba directa), y segundo, buscando en el suero o plasma los anticuerpos anti-A y/o anti-B que correspondería tener esa persona (prueba inversa), en la figura 6 se pueden observar los diferentes carbohidratos dependiendo del grupo sanguíneo (García, 2009).

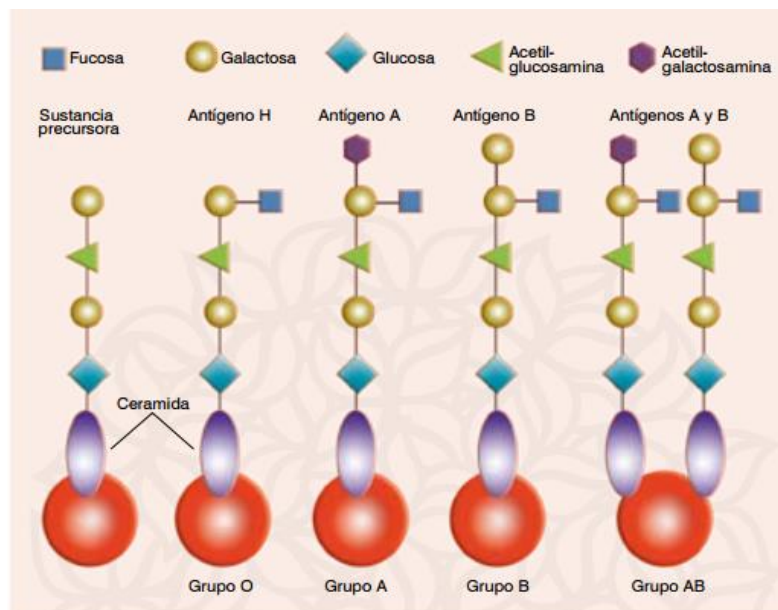


Figura 6. Fenotipos del sistema ABO (García, 2009)

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”



Figura 7. Ejemplo de la determinación de un grupo sanguíneo en tarjeta (Grupo: “O” Rh: negativo)

Tabla 3. Esquema transfusional para glóbulos rojos empacados (NOM-253-SSA1-2012, 2012)

Grupo del paciente/receptor	Opción 1	Opción 2	Opción 3	Opción 4
<b>O positivo</b>	O positivo	O negativo	-----	-----
<b>O negativo</b>	O negativo	-----	-----	-----
<b>A positivo</b>	A positivo	A negativo	O positivo	O negativo
<b>A negativo</b>	A negativo	O negativo	-----	-----
<b>B positivo</b>	B positivo	B negativo	O positivo	O negativo
<b>B negativo</b>	B negativo	O negativo	-----	-----
<b>AB positivo</b>	AB positivo o negativo	A positivo o negativo	B positivo o negativo	O positivo o negativo
<b>AB negativo</b>	AB negativo	A negativo	B negativo	O negativo

Tabla 4. Esquema transfusional de plasma (NOM-253-SSA1-2012, 2012)

Grupo del paciente/receptor	Opción 1	Opción 2	Opción 3	Opción 4
<b>O positivo</b>	O positivo o negativo	A positivo o negativo	B positivo o negativo	AB positivo o negativo
<b>O negativo</b>	O negativo o positivo	-----	-----	-----
<b>A positivo</b>	A positivo	A negativo	O positivo	O negativo
<b>A negativo</b>	A negativo	O negativo	-----	-----
<b>B positivo</b>	B positivo	B negativo	O positivo	O negativo
<b>B negativo</b>	B negativo	O negativo	-----	-----
<b>AB positivo</b>	AB positivo o negativo	A positivo o negativo	B positivo o negativo	O positivo o negativo
<b>AB negativo</b>	AB negativo	A negativo	B negativo	O negativo

### 4.1.3 Anticuerpos irregulares o atípicos

Esta prueba se realiza antes de realizar una transfusión en especial a los niños politransfundidos; ya que pueden tener una reacción transfusional ocasionada por adquirir un anticuerpo irregular debido a las constantes transfusiones.

Se utilizan paneles compuestos por juegos de 11 o más tipos diferentes de células del grupo O. En el Hospital de Pediatría utilizan los siguientes fenotipos: C, D, E, c, e, M, N, S, s, P, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, K, k, JK<sup>a</sup>, JK<sup>b</sup>, Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Di<sup>a</sup>.

Otros antígenos de fenotipo poco frecuente, pueden ser incluidos dentro del panel e incluso pueden estar incluidos dependiendo de la zona geográfica, donde se encuentre la investigación. Lo anterior de acuerdo a la disponibilidad de células por parte del fabricante. Para el estudio de anticuerpos es importante tener presente sus características como: rango térmico, respuesta a la reacción de la enzima, fuerza de reacción, (tanto aglutinación como hemólisis), resultado del autocontrol para la detección de autoanticuerpos.

Cuando el patrón de aglutinación del panel muestra diferencias, se sospecha de mezcla de anticuerpos. La aplicación de técnicas enzimáticas o de reactivos especiales, permite separar los anticuerpos, en base a las características de los antígenos respectivos.

Para determinar los Ac irregulares en tubo existen 3 fases de reacción:

- *Fase de Centrifugación Inmediata a 22°C:* reaccionan mejor los anticuerpos del tipo IgM como el M, N, Lewis, y el P.  
El anti I tiene un rango térmico desde 4°C hasta fase de antiglobulina, sin embargo, su temperatura óptima es de 4°C.
- *Incubación a 37°C:* En este grupo se incluyen los anticuerpos del tipo IgG que tiene la capacidad de aglutinar sin llegar a la fase de antiglobulina humana. Se pueden mencionar los anti D, C, c, E, e, que reaccionan óptimamente al ser incubados por 15 min
- *Fase de antiglobulina humana:* En esta fase se incluyen todos los anticuerpos tipo IgG no aglutinantes como el anti Duffy, Kidd, Lutheran, S, s, Kell y Cellano (García, 2009).

Dentro de estas técnicas se deben considerar para separar las mezclas de anticuerpos los siguientes métodos: absorción/elución, variación de temperaturas de reacción, uso de medios como el polietileno glicol y enzimas los medios reductores.

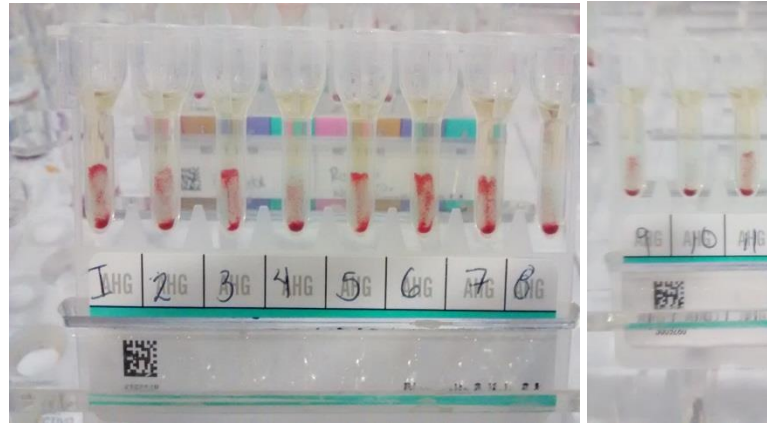


Figura 8. Método de microaglutinación en gel. Identificación de Ac irregulares

#### 4.1.4 Prueba directa de Coombs

Se utiliza primordialmente para determinar si los eritrocitos del paciente en análisis están recubiertos por inmunoglobulinas o fracciones de complemento, conocidos como “sensibilizados”. Esto puede llegar a presentarse en diferentes condiciones, como por ejemplo, la presencia de aloanticuerpos, producto de una reacción hemolítica tardía o por enfermedad hemolítica del recién nacido o autoanticuerpos en anemias hemolíticas autoinmunes dirigidos contra antígenos de propios de la superficie eritrocitaria, de anticuerpos dirigidos contra drogas que se adsorben a la membrana del glóbulo rojo o por la activación de complemento en esta superficie.

Dado que es posible que exista fijación de complemento *in vitro* en muestras no anticoaguladas, se prefiere realizar esta prueba en muestras con EDTA. De lo contrario, se puede obtener un resultado positivo debido a la activación del complemento, durante la coagulación (Hernández, 2010).

#### 4.1.5 Título de crioaglutininas

Las crioaglutininas tienen la capacidad para producir hemaglutinación a 4°C, pero no a 37°C. La presencia de anticuerpos fríos en la sangre y su capacidad de aglutinar fue descrita por primera vez por Landsteiner, en 1903.

En el mecanismo de lisis de los glóbulos rojos están involucrados el complemento como así como el sistema retículo endotelial. El anticuerpo IgM se une a los glóbulos rojos y a temperaturas por debajo de 37°C, actúa como gatillo para la activación del complemento (C3b y/o C4b), produciéndose lisis intravascular (Quintanilla, 2004).

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

Las crioaglutininas pueden causar dolores en las extremidades, trombosis, aglutinación y hemólisis. Su presencia puede seguir a una infección, tal como *Mycoplasma pneumoniae*. La autoaglutinación también puede ocurrir durante una cirugía cardíaca cuando la temperatura de perfusión está entre 15°C y 32°C.

A veces es posible establecer las especificidades de las crioaglutininas. Las más frecuentes son: anti-H (no son inmunoglobulinas), anti-I (asociadas a *Mycoplasma*), anti-i (asociadas a mononucleosis infecciosa), anti-P (presentes en la hemoglobinuria paroxística a *frigore*) (Hernández, 2010).

Se sigue el siguiente procedimiento:

- Se colocan las muestras en baño de María a 37°C por media hora.
- Centrifugar la muestra sin anticoagulante del paciente 10 min a 3 000 rpm para obtener el suero.
- Se prepara una suspensión 2-5 % de los hematíes del paciente.
- Se rotulan 10 tubos del #1 al #10 y se le agregan 100uL de solución salina 0.9 % y una gota de la suspensión de hematíes del paciente hasta el tubo # 10.
- Al primer tubo se añaden 100 µL de suero del paciente y se mezcla bien con la pipeta se toman 100 µL y se añaden al tubo #2. Se repite esta operación hasta el tubo #10.
- Colocar los tubos en refrigeración a 4°C por 2 horas.
- Centrifugar 1 min a 1 000 rpm y observar si hay aglutinación.

Se reporta el resultado del último tubo donde aparece aglutinación visible. Se considera un resultado negativo se es menor que 32 (tubo #5)

## 4.2 Inmunobioquímicas y hormonas

La química sanguínea es un conjunto de pruebas que reflejan el estado integral de un individuo; es realizada con fines diferentes, desde un chequeo habitual recomendado cada año como mínimo, lo cual ayuda al clínico a tener diagnóstico precoz en caso de ser necesario, la confirmación de un diagnóstico y en el monitoreo de las diferentes enfermedades.

Este estudio refleja el estado renal, cardíaco, hepático, pancreático, inmunológico y hormonal.

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

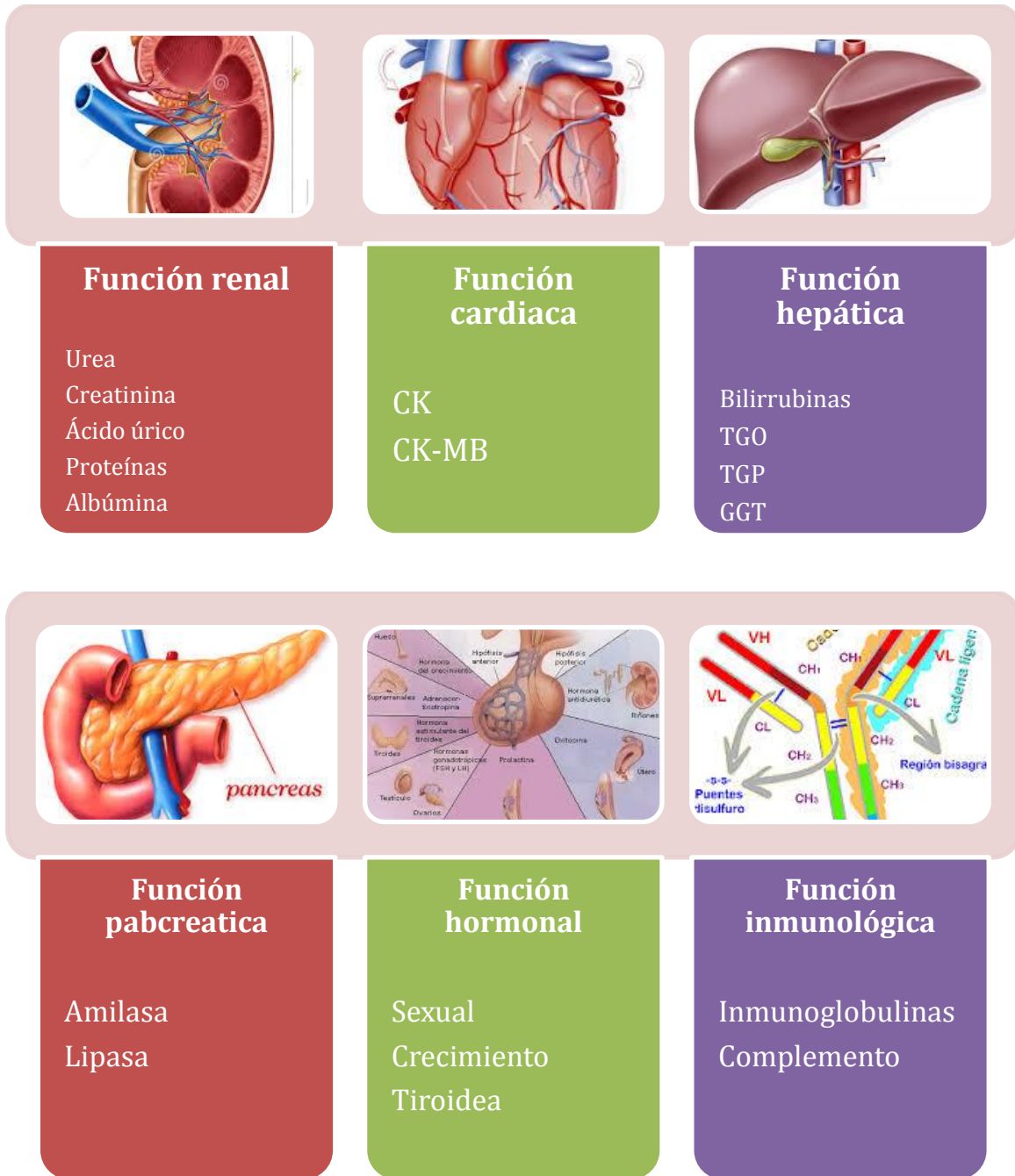


Figura 9. Analitos que sirven para determinar la función de los distintos órganos.

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

El equipo utilizado en esta área es el MODULAR EVO® (Fig. 10) que está dividido en tres módulos: ISE900, P800 y E170. Cada módulo tiene técnicas diferentes para poder analizar las muestras de suero o plasma y determinar los diferentes analitos.



**Figura 10. Equipo MODULAR EVO® utilizando en el área de inmunobioquímicas y hormonas**

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

**Tabla 5. Pruebas que se realizan en el equipo MODULAR EVO® de acuerdo a sus módulos**

<b>MÓDULO</b>	<b>TÉCNICA</b>	<b>ANALITOS</b>
<b>ISE 900</b>	<b>Ion selectivo</b>	Na, Cl, K
<b>P 800</b>	<b>Cinético enzimático</b>	Alanina aminotransferasa, Aspartato aminotransferasa, Amilasa, Creatinincinasa Creatinincinasa MB, Creatinina, Colesterol, Gamma glutamil transferasa, Glucosa, Colesterol HDL, Deshidrogenasa láctica, Lipasa, Amonio, Triacilgliceridos, Ácido úrico, Urea
	<b>Inmunoturbidimétrico</b>	Antiestreptolisina O, Proteína C reactiva, Complemento C3c, Complemento C4, Hemoglobina glicada, Inmunoglobulina A, Inmunoglobulina G, Inmunoglobulina M, Factor reumatoide, Microproteínas totales en LCR y orina, Haptoglobinas
	<b>Fotométrico</b>	Albúmina, Fosfatasa alcalina, Bilirrubina total, Calcio, Bilirrubina directa, Hierro, Magnesio, Proteínas totales, Capacidad de fijación de hierro sin saturar
<b>E 170</b>	<b>Quimioluminiscencia</b>	Inmunoglobulina E, Alfa fetoproteína, Antígeno carcinoembrionario, Cortisol, Ferritina, Hormona estimulante de los folículos, Tiroxina libre, Triyodotironina libre, Estradiol, Hormona luteinizante, Prolactina, Progesterona, Hormona paratiroidea, Testosterona, Hormona estimulante de la tiroides, Triyodotironina, Tiroxina, Hormona del crecimiento, Peptido C, Sulfato de dehidroepiandrosterona, Fracción $\beta$ de la gonadotropina coriónica humana, Hormona adrenocorticotropina, Insulina, Anticuerpo contra la tircoglobulina, Anticuerpo contra la peroxidasa tiroidea, Tiroglobulina



#### 4.2.1 Módulo de ion selectivo

En la potenciometría se determina la diferencia de potencial entre dos electrodos que se encuentran en una solución. Así, el potencial de una célula electroquímica está determinado por:

$$E = E_{\text{cátodo}} - E_{\text{ánodo}}$$

Siendo  $E_{\text{cátodo}}$  el potencial del cátodo y  $E_{\text{ánodo}}$ , el potencial del ánodo.

En soluciones diluidas, como las fisiológicas, las actividades son equivalentes a las concentraciones molares. La determinación de la actividad tiene unas diferencias respecto a otras técnicas, como la de absorción atómica, en que se miden concentraciones:

1. La potenciometría directa no está afectada por la variación en la concentración de lípidos o proteínas, que pueden afectar a otras técnicas que miden la concentración. En éstos, la fase acuosa se diluye y producen resultados más bajos.
2. La determinación que se realiza sólo corresponde a los iones libres, no a aquellos que están formando complejos o están “ocultos” electroquímicamente.

Los electrodos de trabajo suelen ser electrodos selectivos de iones. Éstos contienen una membrana que reacciona de forma selectiva con un solo ion, y cuya parte externa está en contacto con la disolución que contiene el ion que debe medirse mientras que la parte interna contiene una solución del mismo ion a una actividad fija. Las muestras biológicas son mezclas complejas y es muy importante que la membrana sea restrictiva solamente con el ion que se quiera medir (Hernández, 2010).

El tipo de electrodo que utiliza es un electrodo de membrana de polímeros que consiste en una membrana de polivinilcloruro (PVC) impregnada con una solución que contiene un intercambiador o transportador de iones. Se emplea para medir  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ . Un ejemplo es el electrodo empleado en la cuantificación de potasio. En este caso, la membrana contiene valinomicina, un antibiótico con gran capacidad de transportar este ion (Hernández, 2010).

#### 4.2.2 Módulo de inmunoturbidimetría

Es un método basado en las reacciones inmunológicas (antígeno-anticuerpo), que cuando la luz incide en una solución, parte de la luz se dispersa por las partículas en suspensión, otra parte se absorbe y otra se transmite. La luz dispersada dependerá de distintos factores, como el tamaño y peso molecular de la partícula, la longitud de onda de la energía incidente, la distancia entre el detector y la cubeta, y la concentración de la

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

muestra. El equipo emplea longitudes de onda que evitan aquellas a las cuales se absorben los compuestos presentes en la muestra.

El equipo mide la disminución de la luz que atraviesa la solución debido a la turbidez, por lo que el detector se sitúa en línea con la luz incidente (Hernández, 2010).

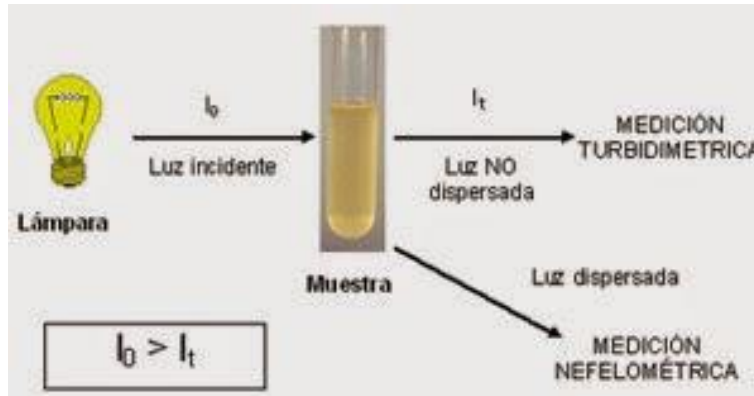


Tabla 6. Fundamento de inmunoturbidimetría (Hernández, 2010)

#### 4.2.3 Módulo de Quimioluminiscencia

Se define como la emisión de radiación electromagnética (normalmente en la región del visible o del infrarrojo cercano) producida por una reacción química. Como la intensidad de emisión es en función de la concentración de las especies químicas implicadas en este tipo de reacciones, las medidas de la intensidad de emisión pueden emplearse con fines analíticos. Una ventaja de esta técnica es que permite emplear una instrumentación básica bastante sencilla, ya que el sistema óptico no requiere una fuente externa de excitación (Hernández, 2010).

#### 4.2.4 Módulo de Fotometría

La base del análisis fotométrico consiste en la absorción selectiva de la luz por parte de las especies químicas (moléculas o iones) contenidas en la muestra.

A ciertas longitudes de onda la absorción de luz por parte de estas especies puede ser intensa mientras que en otros casos la absorción puede ser nula. Esto puede explicarse por el hecho de que cada molécula posee cierto conjunto de estados excitados diferentes a la energía  $h\nu$ . Al absorber luz varía la energía interna de la molécula y esta pasa a un nivel energético superior, captándose intensamente aquellos cuantos de luz  $h\nu$  cuya energía es igual a la energía de excitación de la molécula. El carácter de la absorción depende de la naturaleza de la sustancia; en esto se basa el análisis cualitativo. Como consecuencia de la absorción de la radiación que atraviesa la capa de sustancia, la intensidad de la radiación disminuye. La intensidad de la radiación disminuye, también, a medida que la concentración de la sustancia sea mayor (Fig. 11) (Quiñones, 2005).

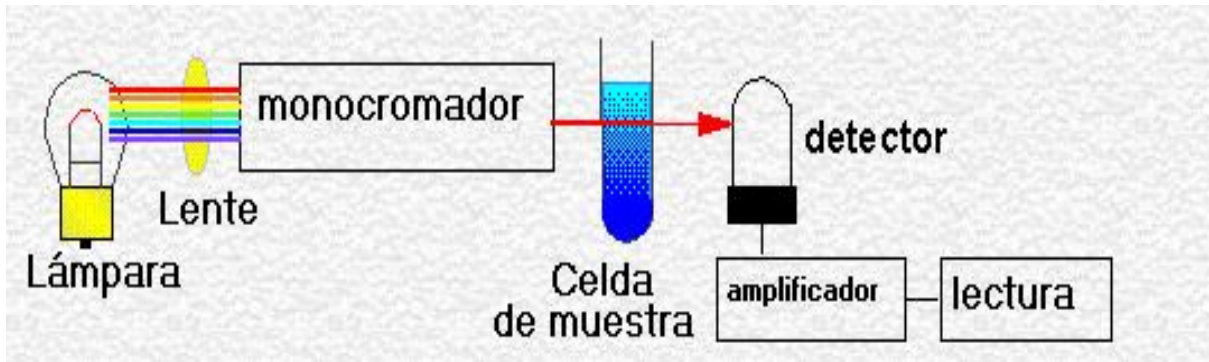


Figura 11. Esquema de la técnica de fotometría

#### 4.2.5 Módulo de Cinética enzimática

Las reacciones enzimáticas están basadas en la Ley de Acción de Masas o Equilibrio de las Reacciones, que sigue el siguiente esquema:

Las enzimas (E) reaccionan ofreciendo su sitio activo al sustrato (S) con el cual se acoplan y forman un complejo (ES), donde la enzima actúa con gran rapidez hasta liberar el producto transformado (P). La enzima no se altera, quedando libre para volver a fijar otra molécula de sustrato. Si mantenemos constantes las condiciones de la reacción (pH; temperatura; cofactores y la concentración de la enzima) la velocidad aumentará a medida que aumente la concentración del sustrato, hasta que lleguemos a un punto en el cual se alcanza la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) y a partir del cual la velocidad es constante. Aunque sigamos aumentando la concentración del sustrato, como la enzima está saturada, la velocidad deja de aumentar.

Ecuación de Michaelis-Menten:  $V = K \cdot [S]$

V: velocidad de la reacción

K o  $K_m$ : constante de Michaelis-Menten. Es la concentración de un sustrato en moles/L con la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la velocidad máxima. Es característica de cada enzima con su sustrato y nos da información de la afinidad que tiene el enzima por su sustrato.

Cinética de primer orden: cuando las concentraciones de sustrato son bajas y, por lo tanto, la velocidad es una función lineal de la cantidad de sustrato.

Cinética de orden cero: cuando la concentración de sustrato es muy alta y, por lo tanto, la velocidad es independiente de la concentración de sustrato.

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

Para una  $K_m$  alta, la mitad de la  $V_{max}$  se alcanzará con una concentración de sustrato alta, y la velocidad de la reacción es lenta.

Para una  $K_M$  baja, la velocidad de la reacción es rápida porque con una concentración baja se llega rápido a la velocidad máxima.

Por lo tanto, las determinaciones cinéticas de las concentraciones de sustancias requieren enzimas con constantes de Michaelis altas para que la velocidad de la reacción sea lenta, se tarde más en llegar a la velocidad máxima y podamos medir mayor cantidad de sustrato (Hernández, 2010)

### 4.3 Coagulación

La hemostasia es un mecanismo fisiológico que protege al organismo de la pérdida sanguínea ante una lesión en la pared de los vasos sanguíneos; su objetivo es el cierre del vaso dañado a través de acciones procoagulantes y anticoagulantes que deben de estar en equilibrio una vez limitada la lesión. El sistema hemostático consiste en una compleja red de componentes cuya acción culmina con la formación de un coágulo sanguíneo.

El modelo denominado “cascada de la coagulación”, que comprende una serie de etapas secuenciales en las que la activación de un factor en la coagulación activa al que sigue, lo que favorece la generación de trombina que convierte el fibrinógeno en fibrina, constituyente principal del coágulo. Según el modelo clásico, existen dos vías de activación: 1) intrínseca; en la cual todos los componentes se encuentran en la sangre, y 2) extrínseca; que requiere de un factor externo; las cuales inician por el factor XII y el complejo factor tisular FT/FVIIa respectivamente, que convergen en una vía común a nivel del factor X. El complejo protrombinasa, compuesto por el factor  $X_a$ ,  $V_a$  y  $Ca^{+}$ , favorece la generación de trombina y fibrina. Actualmente se sabe que ambas vías no operan de forma independiente; el complejo FT/FVII no sólo activa el FX sino también el FIX; la hemostasia no es posible sin plaquetas y otras células que también expresan FT y otras sustancias procoagulantes y anticoagulantes, es decir, el componente celular es de suma importancia en el proceso de coagulación.

De acuerdo con el modelo celular de la coagulación, la vía intrínseca es un amplificador iniciada por la vía extrínseca a través de la expresión del factor tisular y la subsecuente cadena de eventos propiciados por la expresión de macropartículas en las superficies celulares que favorecen la unión, activación e inhibición de las proteasas procoagulantes y anticoagulantes. El modelo celular identifica a la membrana de células expresadoras de FT (fibroblastos, monocitos y neutrófilos), principalmente las plaquetas, como los sitios donde la activación de la coagulación tiene lugar, enfatizando en la interacción entre los



“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

El equipo utilizado en esta área es el ACLTOP500® (Fig. 13), el cual realiza las pruebas con tres principios: coagulométricas, cromogénicas e inmunológicas.



**Figura 13. Equipo ACLTOP500® utilizado en el área de coagulación**

#### **4.3.1 Pruebas coagulométricas**

Son aquellas que se manifiestan por la formación de un coágulo. El principio es por turbidimetría para la detección del coágulo; el cual se mide por la absorción de luz por parte de las hebras de fibrina durante el proceso de conversión del fibrinógeno en fibrina. La absorción de la luz aumenta a medida que va progresando la formación del coágulo de fibrina. La transmitancia de luz a través de la muestra decrece continuamente y es medida por el fotodetector.

#### **4.3.2 Pruebas cromogénicas**

Las pruebas cromogénicas son las que se manifiestan con cambio de color y pueden ser directos o indirectos.

Las pruebas directas son aquellos en los que el test de interés (Proteína C ó Plasminógeno) actúa directamente sobre un sustrato sintético específico.

Las pruebas indirectas son aquellos en los que el test de interés (Antitrombina, Inhibidor de la plasmina) reaccionan con una cantidad fija de la enzima que es medida utilizando un sustrato sintético específico.

### 4.3.3 Inmunológicas

Las pruebas inmunológicas utilizan el principio inmunoturbidimétrico evaluando la concentración física del parámetro a analizar por el cambio en la densidad óptica medida; basadas en la formación de un complejo antígeno-anticuerpo que afecta la transmisión de la luz (Mezza, 2012).

### 4.4. Hematología

La hematología es la rama de la ciencia médica que se encarga del estudio de los elementos formes de la sangre y sus precursores, así como de los trastornos estructurales y bioquímicos de estos elementos, que puedan conducir a una enfermedad. Es una ciencia que comprende el estudio de la etiología, diagnóstico, tratamiento, pronóstico y prevención de las enfermedades de la sangre y órganos hemolinfoprodutores.

La sangre es un fluido de color rojo y aspecto viscoso que es bombeado por el corazón recorriendo todo el organismo a través del sistema vascular para llegar a todos los tejidos y volver de nuevo al corazón. Este fluido corporal es fácilmente coagulable.

La sangre consta de un líquido de color amarillo denominado plasma y diferentes elementos formes, que se encuentran en suspensión.

El plasma forma el 50-55% de la sangre total y a su vez el agua forma el 90% del plasma, el 10% restante lo forman diferentes sustancias disueltas como proteínas, enzimas, electrolitos o sustancias de desecho. Si eliminamos el fibrinógeno del plasma sanguíneo lo denominamos suero (González, 2012).

El 45-50% restante de la sangre lo configuran las células siguientes:

- Hematíes.
- Leucocitos (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos).
- Plaquetas.

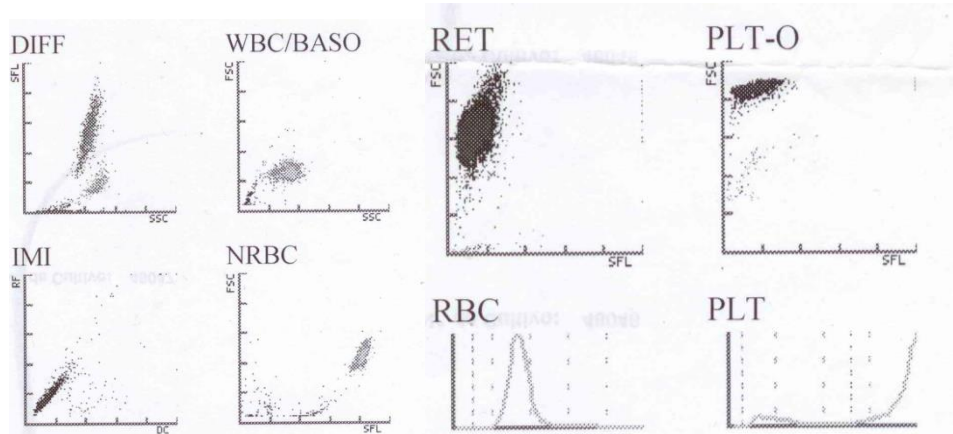
El equipo utilizado para realizar la BH es el Sysmex XE-2100® el cual utiliza el poder de citometría de flujo fluorescente y tecnologías de enfoque hidrodinámico. Utilizando una exclusiva mesa de diodo láser, la citometría de flujo fluorescente proporciona la sensibilidad necesaria para medir y diferenciar los tipos de células en sangre total y muestras de fluidos corporales.

Sysmex ha definido técnicas básicas de la citometría de flujo y utiliza colorantes de polimetina altamente específicos para adaptar esa tecnología sofisticada al alto volumen y requerimientos automatizados del laboratorio clínico.

- Eritrocitos y plaquetas: son contados en un canal exclusivo que utiliza como métodos de detección la impedancia o corriente directa con la tecnología de enfoque hidrodinámico para minimizar la coincidencia o recirculación. Discriminadores automáticos separan las dos poblaciones celulares basados en algoritmos complejos. La intensidad del pulso electrónico de cada eritrocito analizado es proporcional al volumen celular.
- Hematocrito (HCT): es determinado directamente, basado en el conteo de volumen en cada glóbulo rojo. Aún en muestras con concentraciones extremadamente bajas o inusualmente altas, los sistemas de Sysmex analizan los eritrocitos y las plaquetas con gran precisión y exactitud.
- Diferencial leucocitario: la medida fluorescente revela la proporción núcleo-plasma de cada célula teñida individual, permitiendo a los analizadores serie XE diferenciar 6 poblaciones leucocitarias reportables. La combinación de dispersión lateral (complejidad celular), dispersión frontal (volumen) y fluorescencia de material de ácido nucleico determina la clasificación de cada leucocito.
- Reticulocitos y plaquetas: La tecnología avanzada permite un conteo exacto de reticulocitos y plaquetas fluorescentes, aun en concentraciones muy bajas y en muestras con plaquetas gigantes o fragmentos de glóbulos rojos. Debido a alta intensidad fluorescente de células nucleadas, tales como leucocitos y glóbulos rojos nucleados o glóbulos rojos que contienen cuerpos Howell-Jolly, estas células son separadas de forma distinta de los reticulocitos. El contenido ADN/ ARN de reticulocitos disminuye a través del tiempo hasta que se convierten en eritrocitos que están sin residuos de ácido nucleico. Una población de reticulocitos muy inmaduros, la fracción de reticulocitos inmaduros (IRF, por sus siglas en inglés) es analizado y reportado, proporcionando información sobre la tasa de producción de reticulocitos. En adición, la medida de plaquetas fluorescentes (PLT-O) puede ayudar a resolver avisos de plaquetas de impedancia y reducir la revisión de diapositivas manual (Sysmex, 2016).



“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”



**Figura 14. Histogramas de una BH (paciente con leucocitos y plaquetas bajas; con presencia de células inmaduras)**

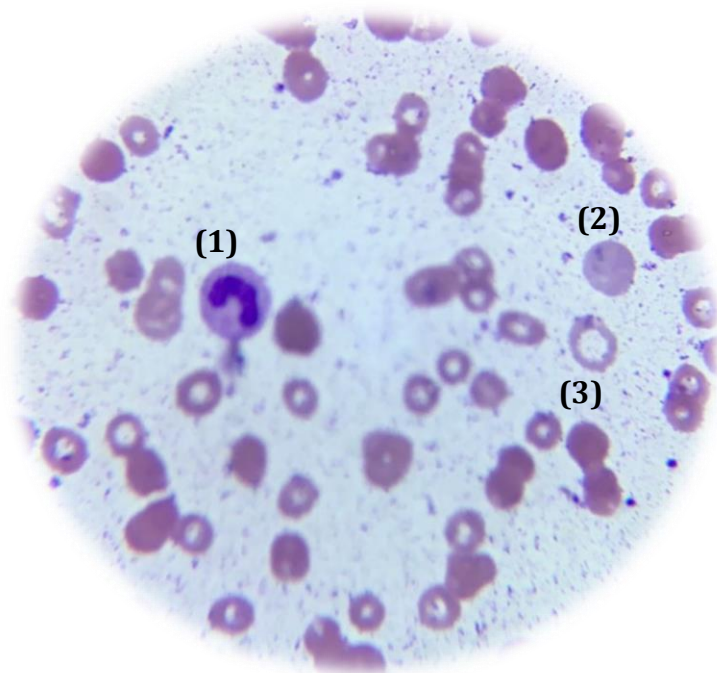


**Figura 15. Equipo Sysmex XE-2100® utilizado en el área de Hematología**

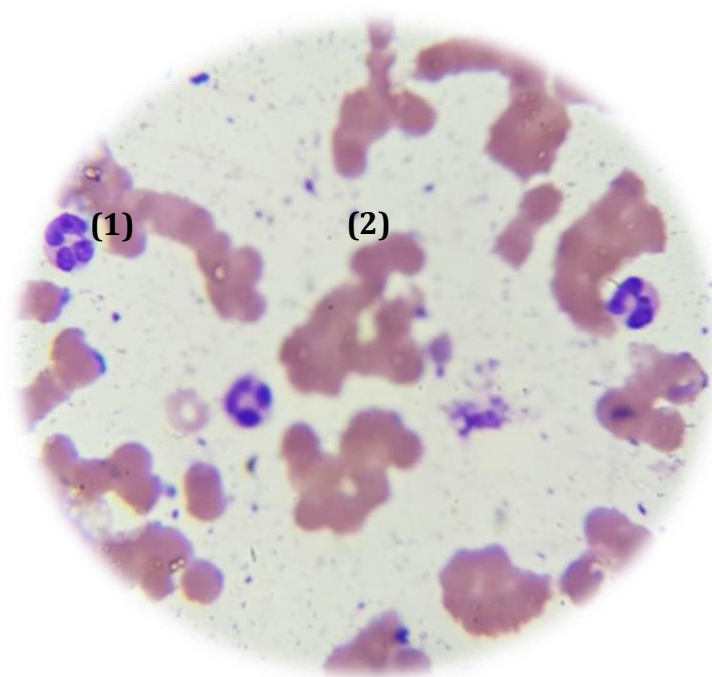
Los frotis se realizan en los siguientes casos:

- Todas las pruebas que provienen del servicio de Hematología
- En los diagnósticos de Linfoma no Hodgkin y Burkitt
- En las sepsis y meningitis
- Cuando el paciente presenta células leucocitarias mayores a 20,000 independientemente del diagnóstico.

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

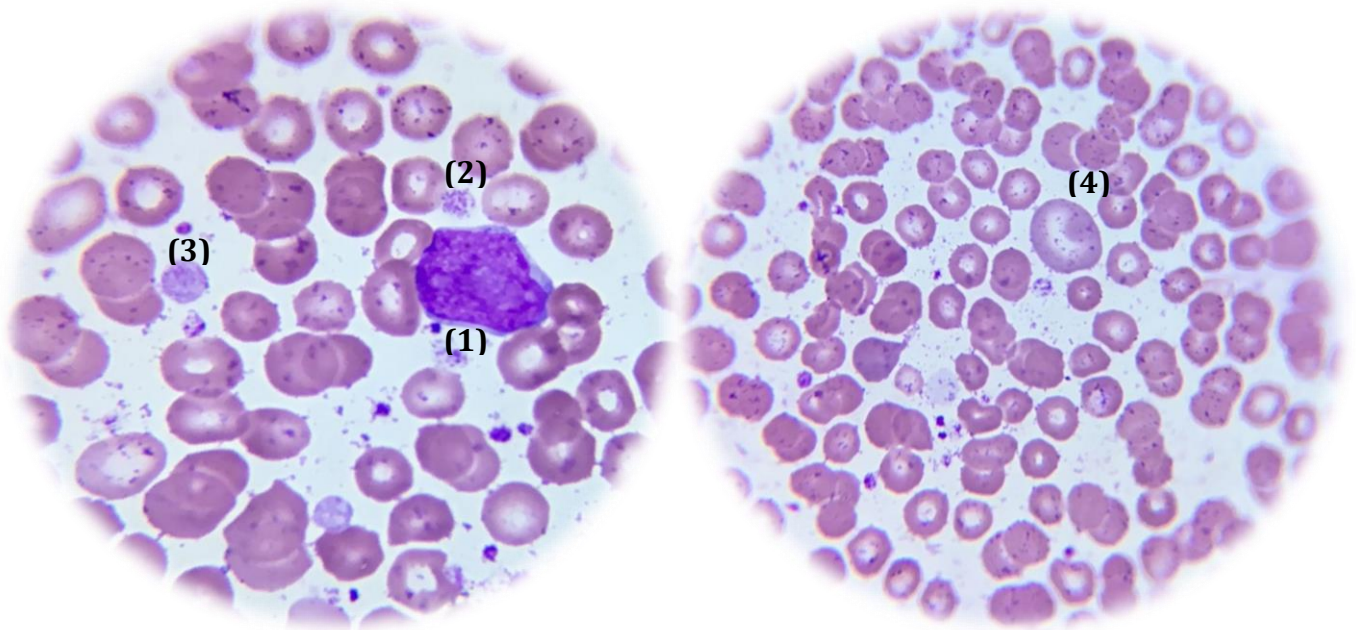


**Figura 16. Paciente diagnosticado con sepsis. Se observa en el frotis (1) neutrófilo segmentado, (2) basofilia difusa ++, (3) hipocromía ++, así como poiquilocitosis ++, microcitosis ++, anisocitosis ++**



**Figura 17. Paciente diagnosticado con síndrome hemolítico. Se observa en frotis (1) neutrófilo segmentado, (2) hemoaglutinación, así como hipocromía ++, anisocitosis ++, plaquetas en diferentes tamaños, poiquilocitosis ++**

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”



**Figura 18.** Paciente diagnosticado con Leucemia linfoblástica. Se observa en frotis (1) blastos 33%, (2) plaquetas elevadas, (3) plaquetas gigantes y degranuladas, macrocitosis ++, así como escasos esferocitos, anisocitosis +++

#### 4.4.1 Tinción de Wright

Es una técnica que se emplea generalmente para la diferenciación de elementos celulares de la sangre y es clasificada como una tinción policromática, dado que puede teñir compuestos ácidos o básicos presentes en una célula.

El reactivo de Wright está compuesto por eosina y azul de metileno, cuando éste se oxida se conoce como azul B a una concentración de 0.8 g/L, empleando como solvente alcohol metílico. La eosina es un colorante ácido que tiene afinidad por componentes alcalinos. Existen dos compuestos conocidos como eosina y que están intrínsecamente relacionados: eosina Y, conocida también como tetrabromo fluoresceína (o, comúnmente, eosina amarilla), y la eosina B, conocida como dibromodinitrofluoresceína o eritrosina B azulada. Es un compuesto ácido cuya propiedad está basada en su polaridad negativa, lo que le permite enlazarse con constituyentes celulares de carga positiva; por esta razón, colorea componentes citoplasmáticos y se les conoce como acidófilos.

La tonalidad resultante de la tinción con eosina es rosada-anaranjada para citoplasmas, y rojo intenso en el caso de los eritrocitos.

El típico color de los núcleos celulares, principalmente morado, se basa en la interacción molecular entre eosina y un complejo azul de metileno-DNA. La intensidad de la coloración depende del contenido de azul B y de la relación con la eosina amarilla. El

resultado de la tinción puede ser influido por diferentes factores, como el valor del pH de los colorantes y de la solución amortiguadora, esto debido a que la tinción se fundamenta en la relación de las características ácido-base, y la variación de estos factores podría cambiar las características tintoriales de la muestra a teñir al verse favorecida por características más ácidas o básicas (López-Jacomé, 2014).

## 4.5 Bacteriología

Este servicio se divide en 5 secciones: Urocultivos, Líquidos, Diversos, Hemocultivos y BAAR.

### 4.5.1 Urocultivos y coprocultivo

Las infecciones de tracto urinario (ITU) se definen como la presencia de microorganismos en las vías urinarias con invasión de los tejidos, y generalmente, cursa con un gran número de bacterias en la orina (bacteriuria). Los microorganismos que se aíslan de la orina varían según las circunstancias del paciente y sus enfermedades de base.

Para obtener un recuento semicuantitativo, la orina debe ser homogenizada previamente. Se emplean asas calibradas para contener 0.01 o 0.001mL de orina, la cual se va a sembrar en los medios empleados en esta área, como son: agar sangre, Mac Conkey, Salmonella-Shigella y agar Biggy. La bacteria más comúnmente aislada es *E. coli* y se reportan en UFC/mL (tienen que ser contadas más de 25 colonias para ser significativo). Más del 95% de las ITU son causadas por *E.coli*.

Las infecciones gastrointestinales figuran entre las enfermedades infecciosas más frecuentes después de las infecciones respiratorias.

Las manifestaciones clínicas más relevantes de las gastroenteritis son la fiebre, los vómitos, el dolor abdominal y una diarrea que puede ser acuosa o secretora a causa de bacterias que producen toxinas como *V. cholerae* o *E. coli* enterotoxigénica; y diarrea invasiva o disentería, que se caracteriza por heces de menor volumen que contiene sangre, moco o pus, como las que produce el género *Salmonella*.

El coprocultivo es el método de elección para este diagnóstico. Si las heces son de consistencia líquida o se han enviado en medio de transporte la muestra se siembra directamente con ayuda de una asa o pipeta Pasteur. Si las heces son formes, se selecciona una porción del tamaño de un guisante y se emulsiona con solución salina estéril (Torre, 2015).

#### 4.5.2 Líquidos corporales

El cultivo microbiológico de líquidos corporales, comprende: líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido de ascitis, líquido peritoneal y líquido sinovial; es de comprenderse que el estudio de tales líquidos tiene carácter de urgencia al llegar al laboratorio. En primer lugar se debe verificar que los datos de la solicitud coincidan con los datos de la muestra, la cual debe ser rotulada a pie de cama; se debe tomar en cuenta las características físicas de la muestra, tales como color, olor, viscosidad, etc. Se debe realizar un frotis de la muestra para buscar la presencia de bacterias, células y leucocitos.

Las bacterias comúnmente aisladas en estas muestras son *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.* Deben ser reportadas en UFC/mL y deben contarse más de 25 colonias para ser significativo el resultado.

#### 4.5.3 Cultivos diversos

Esta sección se enfoca sobre todo al cultivo de muestras como secreciones de heridas y abscesos, cultivos oculares, cultivos oticos, cultivos faríngeos, cultivo de puntas de catéter, entre otros.

Todas las muestras son acompañadas por una tinción de Gram, para así poder realizar un seguimiento más enfocado a cada muestra y si es necesario complementar el o los estudios requeridos por el médico al descubrir alguna etiología desde este punto.

En el caso de las biopsias, el examen histológico deben ser acompañado por tinciones especiales para bacterias, hongos y de hematoxilina-eosina para búsqueda de inclusiones virales, y por tanto los resultados deben ser comunicados de forma inmediata al laboratorio de microbiología (Torre, 2015).

Los crecimientos (aislamientos) obtenidos en estos medios selectivos y/o diferenciales luego se identifican mediante tinciones y pruebas bioquímicas en el equipo Vitek®.

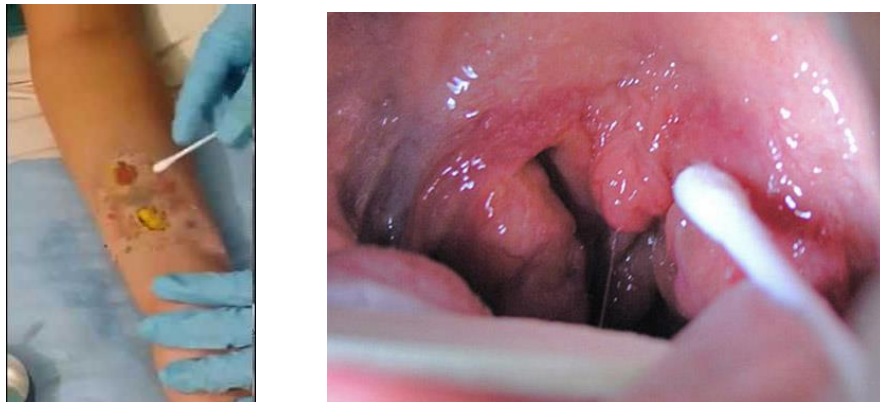


Figura 19. Ejemplos de cultivos diversos; herida (izquierda) y exudado faríngeo (derecha)

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

#### 4.5.4 Hemocultivos

La bacteremia es la presencia de infección con hemocultivos positivos.

La sepsis es una afección generalizada que se produce por la presencia de toxinas de microorganismos en sangre y se caracteriza por un proceso inflamatorio sistémico.

El hemocultivo o cultivo microbiológico de la sangre constituye en los casos de septicemia, el único examen que permite su confirmación. Se define como hemocultivo al cultivo microbiológico de una muestra de sangre obtenida por una punción independiente.

Ante la sospecha de una sepsis y antes de iniciar el tratamiento se debe realizar un hemocultivo, con dos muestras tomadas de diferente área en condiciones estériles (López, 2006).

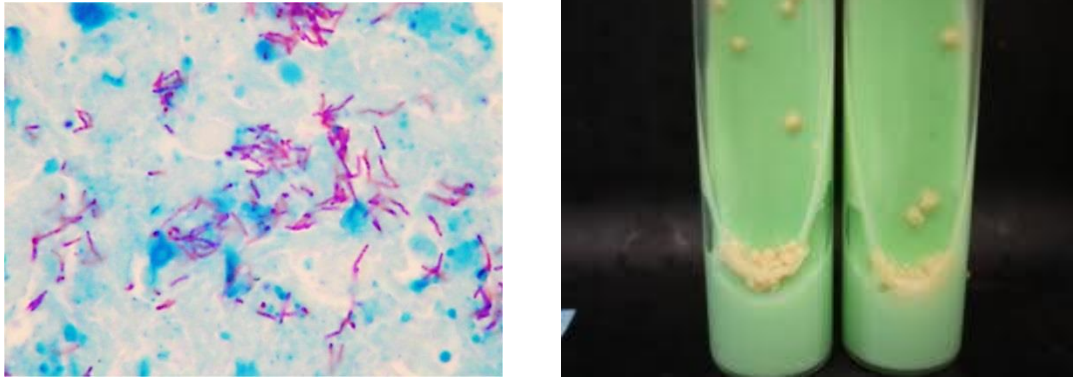


Figura 20. Medios de hemocultivo para equipo BacT/ALERT® (aerobio y anaerobio)

#### 4.5.5 BAAR

La presencia de bacilos acidorresistentes (BAAR) en un cultivo de esputo o de otra muestra a menudo indica que la persona está enferma de tuberculosis. El análisis microscópico de bacilos acidorresistentes es una técnica fácil y rápida, pero no confirma el diagnóstico de la tuberculosis porque algunos bacilos acidorresistentes no son *M. tuberculosis*. Por lo tanto, para confirmar el diagnóstico se hace un cultivo de todas las muestras iniciales. Un resultado positivo en el cultivo de *M. tuberculosis* confirma el diagnóstico de la enfermedad de la tuberculosis. Los análisis de todos los cultivos de las muestras se deben completar, independientemente de los resultados de los frotis de BAAR (CDC, 2012).

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”



**Figura 21. Tinción de Ziel Neelsen para BAAR (imagen izquierda), medio de cultivo Löwenstein-Jensen para BAAR (imagen derecha)**

Para este tipo de pruebas se necesita equipo especial como: un área aislada con una campana de flujo laminar (Fig. 22), una estufa sólo para cultivos de BAAR; el personal debe usar una bata desechable así como guantes y cubrebocas.



**Figura 22. Campana de flujo laminar para la siembra de baciloscopias**

## 4.5.6 Identificación de microorganismos

### 4.5.6.1 Tinción de Gram

El fundamento de la técnica se basa en la diferencia estructural de la pared celular entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Fig. 23).

La pared celular de las bacterias grampositivas posee una gruesa capa de peptidoglucanos, que consiste en una estructura entrecruzada en forma de malla que rodea a la célula, además de ácidos teicoicos y lipoteicoico.

Por el contrario, la capa de peptidoglucanos de las Gram negativas es muy delgada, además de presentar una segunda membrana externa (de composición distinta de la membrana citoplásmica), formada por lipoproteínas.

En la técnica de Gram, el cristal violeta penetra en todas las células bacterianas Gram positivas y Gram negativas a través de la pared celular. El lugol, formado de  $I_2$  (yodo) y de yoduro de potasio (para solubilizar el yodo), actúa como un mordiente haciendo que el cristal violeta se fije con mayor intensidad a la pared celular bacteriana, formando un complejo insoluble en solución acuosa. La mezcla de alcohol-acetona sirve para decolorar; así, las bacterias Gram positivas, al poseer una pared celular con mayor proporción de peptidoglucanos y numerosos ácidos teicoicos unidos a ella retienen al colorante, por lo que resisten la acción del alcohol-acetona; además esta actúa deshidratando esta capa y cerrando los poros, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta-yodo, tiñéndose de color azul púrpura. Por otro lado, las bacterias Gram negativas, al tener una membrana externa rica en lípidos, la cual es soluble en solventes orgánicos como el alcohol-acetona y una capa de peptidoglucanos demasiado delgada que es incapaz de retener el complejo cristal violeta-yodo, favorecen que se escape y se decolore, por lo que es necesario agregar un colorante de contraste como la safranina, tiñéndose de rojo.

Es necesario que la pared celular se encuentre intacta para una buena reacción y existe la posibilidad de que las bacterias Gram positivas no retengan el colorante si los organismos son viejos, están muertos o se han dañado por agentes antimicrobianos. No existen condiciones similares que ocasionen que un organismo gramnegativo parezca ser grampositivo (Elinos, 2015).



“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

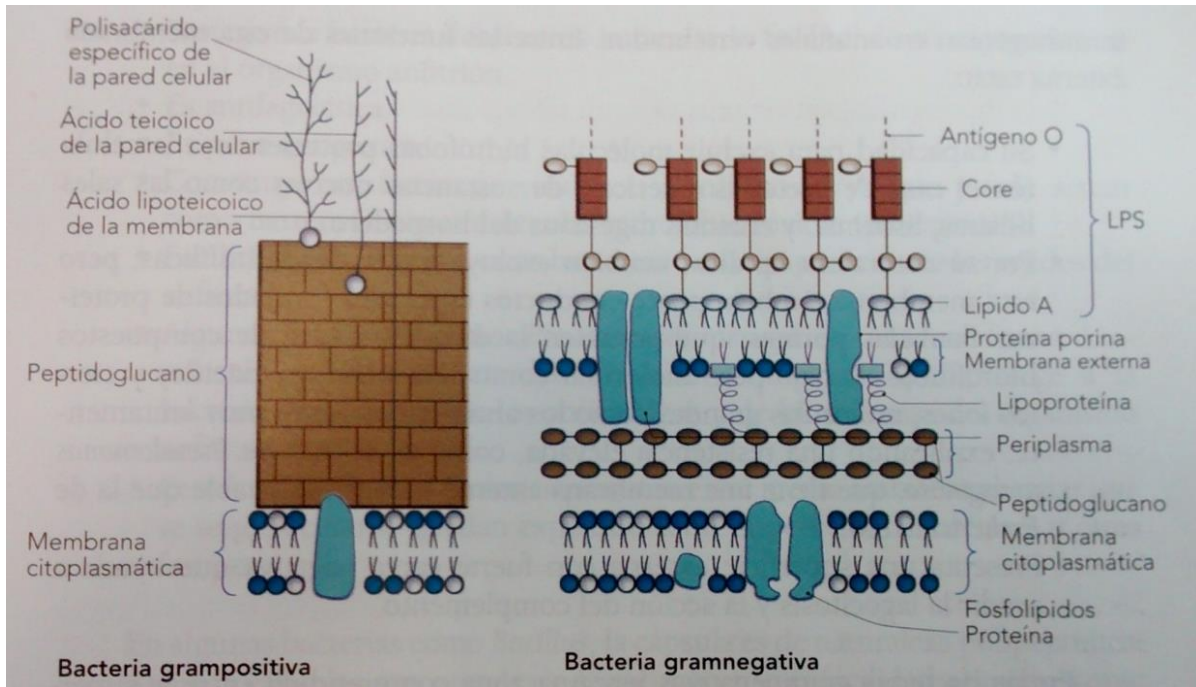


Figura 23. Características de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

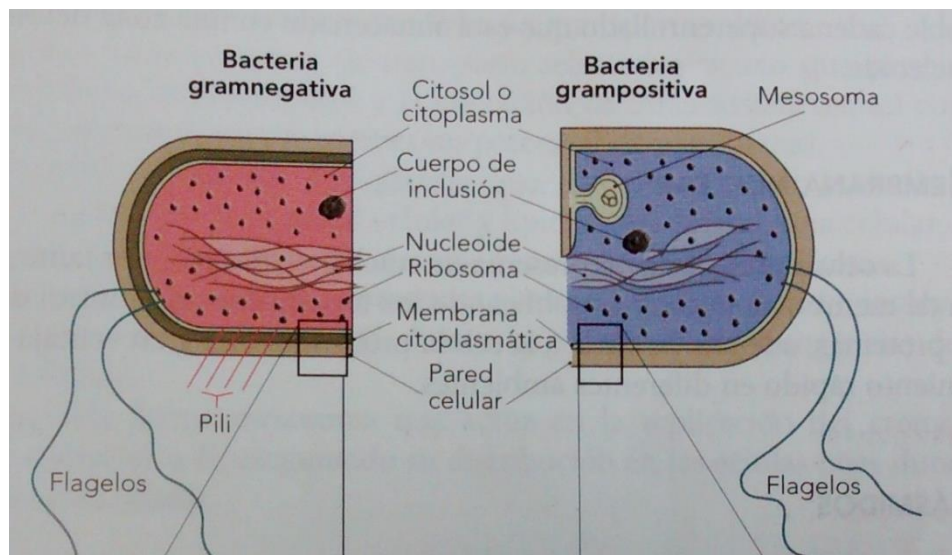


Figura 24. Principales estructuras de las bacterias

#### 4.5.6.2 Tinción de Ziehl Neelsen

La propiedad que presentan algunas bacterias de resistir la decoloración con ácidos fuertes después de ser coloreadas con solución de fucsina caliente, permite reunir las bajo la denominación general de bacterias “ácido-resistentes” o “ácido-alcohol resistentes”.

La ácido-alcohol resistencia es la capacidad de incorporar ciertos colorantes y retenerlos después de someterlos a la acción de ácidos y alcohol. Está determinada por la presencia en la pared celular de los ácidos micólicos que son ácidos grasos de cadenas ramificadas de alto peso molecular (60 a 70 átomos de carbono).

Las micobacterias son bacilos ácido-alcohol resistentes, cortos, ligeramente curvos. El género *Mycobacterium*, incluido en esta clasificación, comprende especies patógenas para el hombre, animales y especies saprófitas. El grado de “ácido-alcohol resistencia” es variable entre las especies de este género y está relacionado muchas veces con las condiciones culturales, no pudiendo utilizarse esta diferencia para distinguirlos entre sí. Los bacilos “ácido-alcohol resistentes” (BAAR) se observan de color rojo al ser coloreados con los colorantes para Ziehl Neelsen, mientras que otros gérmenes y células toman distintos tonos de azul debido al azul de metileno que se utiliza como colorante de contraste (Elinos, 2015).

#### 4.5.6.3 Equipo BacT/ALERT®

En el hospital de pediatría se utiliza este equipo para incubar hemocultivos y líquidos diversos, estos se incuban de 5-7 días; una vez transcurrido este tiempo si el equipo no da una alarma, se considera que no hubo crecimiento en la muestra y se reporta como sin crecimiento.

El fundamento de este equipo se basa en la detección de productos del metabolismo bacteriano ( $\text{CO}_2$ ) mediante técnicas radiométricas, espectrofotométricas, fluorométricas y/o colorimétricas. El computador asociado a los equipos relaciona las mediciones con índices y/o gráficas de crecimiento microbiano que dan un aviso cuando la detección sobrepasa un punto de corte. Las botellas se descargan, se realiza una tinción de Gram y se siembran en los medios de cultivo utilizados en el laboratorio y se procede a la identificación del microorganismo (Echevarne, 2012).

#### 4.5.6.4 Equipo Vitek®

El equipo Vitek® es un sistema que utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, las que son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática. Las tarjetas reactivas tienen 64 pozos que contienen, cada uno, un sustrato de prueba individual. Con estos sustratos se miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y

desarrollo en presencia de sustancias inhibitoras. Las tarjetas están selladas en ambos lados por una película clara que evita el contacto entre las diferentes mezclas sustrato-microorganismo y a la vez permite la transmisión del nivel de oxígeno apropiada. Cada tarjeta tiene un tubito de transferencia pre-insertado para la inoculación. Estas tarjetas tienen códigos de barras que contienen información sobre el tipo de producto, número de lote, fecha de caducidad y un identificador único que puede ser ligado a la muestra ya sea antes o después de cargar la tarjeta al sistema.

El hospital de Pediatría cuenta con las siguientes tarjetas:

1. GN- Bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores
2. GP- Cocos y bacilos no fermentadores de esporas Gram positivos
3. YST- Levaduras y organismos levaduriformes
4. Antibiogramas para Gram positivos y Gram negativos

Durante el tiempo que las tarjetas están en el carrusel, se incuban a una temperatura media de 35.5°C. Al girar el carrusel, cada tarjeta de test se traslada a la posición de lectura cada 15 minutos. El cabezal de lectura transporta la tarjeta test a través de las estaciones ópticas y luego de regreso al carrusel, donde continúa su incubación hasta su próximo ciclo de lectura. El sistema óptico de transmitancia utiliza luz visible para medir directamente el crecimiento del organismo. Este sistema óptico se basa en una lectura de luz inicial en un pocillo, antes de que se haya producido un crecimiento significativo. El muestreo de la transmitancia de luz en el mismo pocillo cada 15 minutos mide el crecimiento del organismo mediante la cantidad de luz a la que se impide pasar a través del pocillo. Después de completarse los ciclos de lectura, el instrumento expulsa las tarjetas en la estación de recogida de desechos (bioMérieux, 2016).

**Tabla 8. Medios para pruebas de bacteriología de rutina en el laboratorio de Pediatría**

Medio	Función	pH	Sustrato	Inhibidor	Indicador	Características del medio	Características de la colonia
<b>Agar sangre</b>	Medio enriquecido	7.3	Sangre de carnero al 5-10%			Favorece el desarrollo de todas las bacterias de importancia clínica, excepto las más exigentes.	Útil para determinar la presencia de enzimas hemolíticas
<b>Agar MacConkey</b>	Selectivo y diferencial	7.1	Lactosa	Sales biliares y cristal violeta	Rojo neutro	El color del medio cambia a ámbar cuando las bacterias no fermentan la lactosa	Lactosa positiva: son color rosa Lactosa negativas: colonias incoloras
<b>Agar Salmonella-Shigella</b>	Selectivo y diferencial	7.0	Lactosa Tiosulfato de sodio y citrato férrico	Sales biliares y verde brillante	Rojo neutro	Cuando no se fermenta la lactosa el color del medio cambia a ámbar	Selectivo para Salmonella-Shigella Lactosa positivo: colonias rosa Lactosa negativos: colonias incoloras H <sub>2</sub> S positivo: colonias con centro negro
<b>Agar Biggy</b>	Selectivo	6.8	Bismuto, glucosa, glicina, levadura	Sulfito de bismuto			Para el desarrollo del género Candida
<b>Agar chocolate</b>	Medio enriquecido		Sangre de carnero, Factor X y Factor V			Favorece el crecimiento de la mayoría de mo, incluidos los muy exigentes como <i>Neisseria</i> y <i>Haemophilus</i>	

## 4.6 Inmunología

La inmunología es la ciencia biomédica que estudia los mecanismos utilizados por los seres vivos para defenderse, y está en constante desarrollo.

El sistema inmune puede ser considerado como un sistema homeostático fisiológico, que contribuye a la integridad del organismo con la neutralización del peligro (Robledo, 2014).

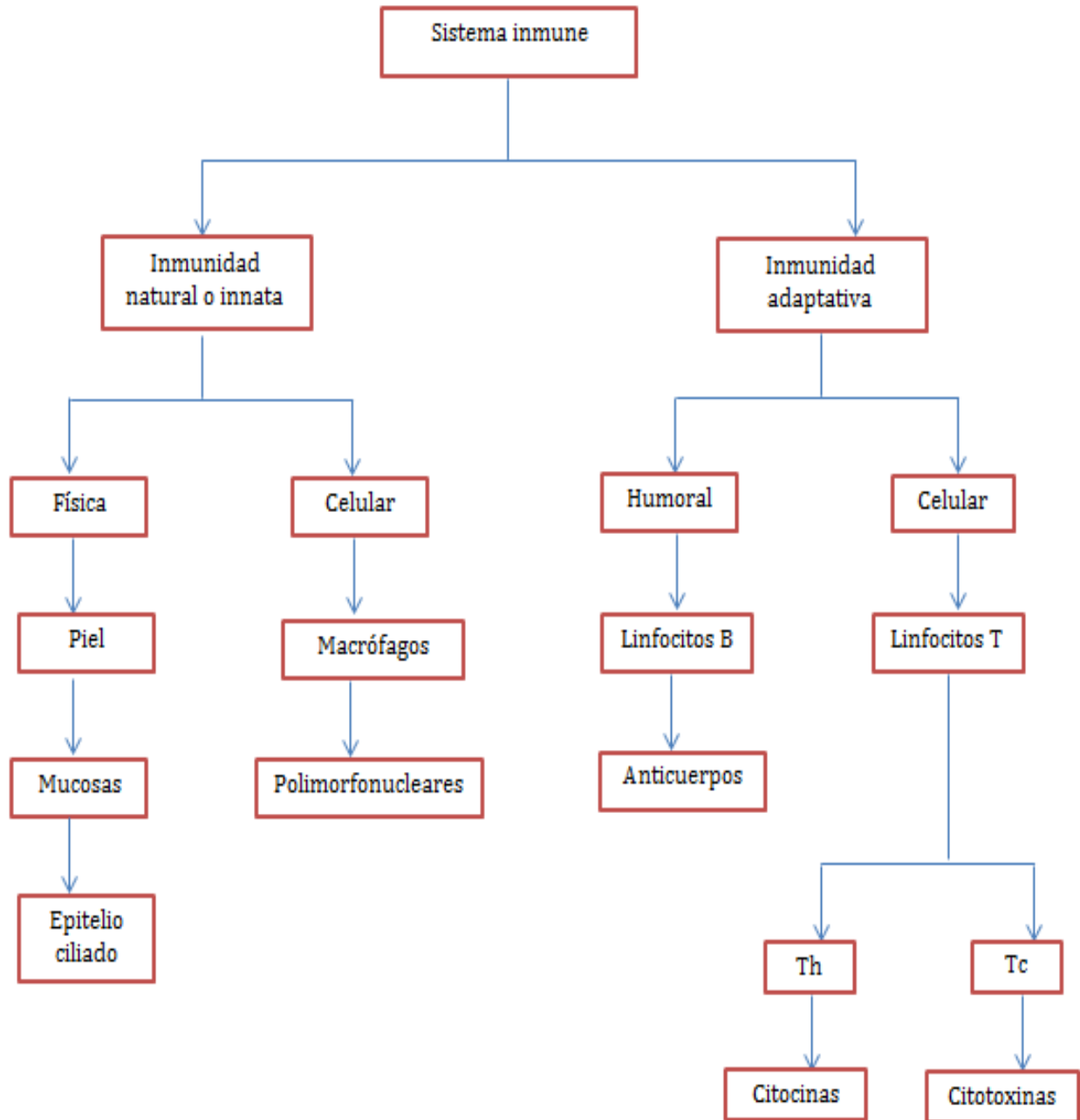


Figura 25. Clasificación básica de los mecanismos del Sistema Inmune. (Palomo, 2009)

En esta área se realizan las siguientes pruebas:

- Aca (anticardiolipinas)
- Anti-DNA (anti- DNA)
- ANA (anticuerpos anti-nucleares)
- ANCA (anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos)
- ENA (anticuerpos extraíbles del núcleo)
- VDRL (prueba para anticuerpos contra sífilis)
- Reacciones febriles
- Cuantificación de CD4

**Tabla 9. Patrón de autoanticuerpos asociado a cada enfermedad autoinmunitaria**

Enfermedad	Autoanticuerpos relacionados
Lupus eritematoso sistémico	Anti- ADNds Anticromatina Anti-ENA (Ro, La, RNP, Sm)
Síndrome de Sjögren	Anti-ENA (Ro, La)
Esclerosis sistémica	Anti-ENA (Scl-70) Anticentrómero
Dermatomiositis	Anti-ENA(Jo-1)
Síndrome antifosfolipídico	Anticoagulante lúpico Anticardiolipina
Vasculitis necrosante	ANCA

Las pruebas anteriores se basan en cuatro técnicas diferentes: Inmunofluorescencia (IFI), Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), aglutinación y citometría de flujo.

#### 4.6.1 Inmunofluorescencia (IFI)

La fluorescencia es una propiedad de ciertas moléculas que, al ser irradiadas con energía electromagnética de longitud de onda adecuada, emiten radiación de longitud de onda característica permitiendo su cuantificación.

Las moléculas de un colorante fluorescente absorben luz en una longitud de onda y convierten la luz absorbida de alta energía (longitud de onda más corta) que emiten en forma de fluorescencia en luz de menor energía (longitud de onda más larga). Cada fluorocromo tiene un espectro de excitación y emisión característicos; si se utilizan dos con el mismo espectro de excitación pero distinto espectro de emisión, se pueden medir dos características al mismo tiempo (fluorescencia de dos colores).

Una molécula que fluoresce puede ser fijada en el anticuerpo (Ac) para ser detectada usando luz UV. La inmunofluorescencia se utiliza esencialmente en la detección de autoanticuerpos y anticuerpos contra antígenos de superficie de células y tejidos (Stock, 2016).

- **Anticuerpos anti-DNA:** Esta prueba se realiza con la técnica de IFI; en la cual la laminilla tiene pocillos en los cuales está adherida la *Crithida luciliae* (hemoflagelado), que funciona como el antígeno (Ag) porque tiene una gran cantidad de DNA. Los Ac's de las muestras del análisis se unen a los Ag's del sustrato. El primer lavado elimina el suero y sobrenadante del sustrato. El antisuero conjugado con fluoresceína añadido al sustrato se acopla al autoanticuerpo unido. Tras un segundo lavado se elimina el conjugado sobrante. Se le coloca a la laminilla un cubreobjetos y se observa al microscopio. Si se observa el cinetoplasto (se encuentra una gran cantidad de DNA) fluorescente se considera una prueba positiva.

Las muestras de suero deben estar diluidas en PBS.

Los organismos *Crithida luciliae* poseen una mitocondria gigante en la que el DNA mitocondrial está compuesto enteramente de DNA circular o nativo concentrado en una sola red de gran tamaño: el cinetoplasto; orientado hacia el flagelo. El cinetoplasto con tinción positiva debe tener aspecto de disco fluorescente en forma de rosquilla con una tinción más intensa en los bordes que en el medio.

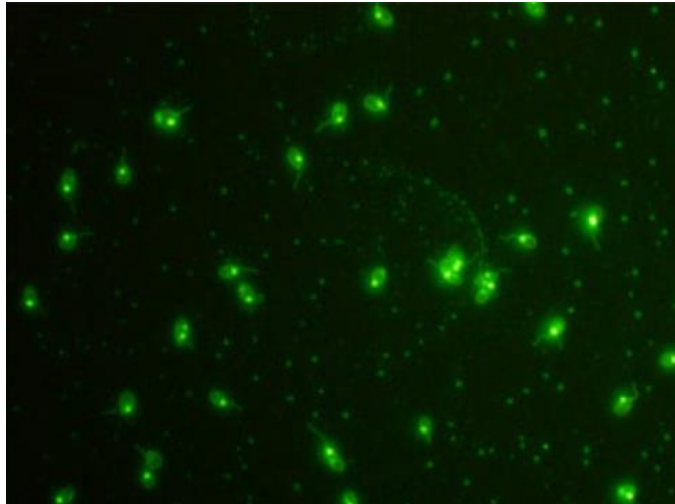


Figura 26. Prueba de anti-DNA positiva en paciente con diagnóstico de Lupus eritematoso sistémico (LES)

#### 4.6.2 ELISA

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

El ELISA indirecto consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición del suero problema, de tal forma que sus anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

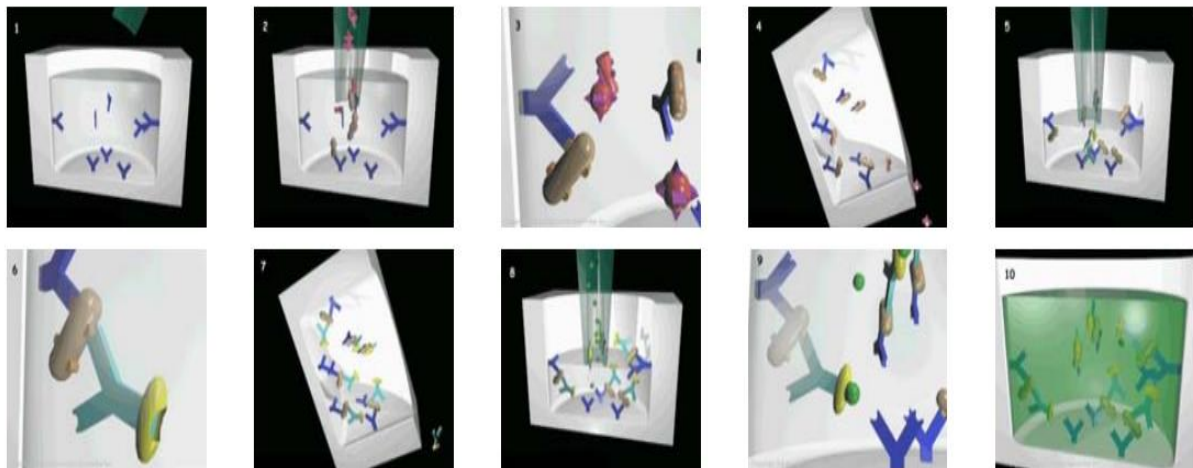


Figura 27. Modelo de técnica ELISA indirecto



“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

- **Anticuerpos anti-ENA:** Se trata de un EIA cualitativo indirecto. La superficie de los micropocillos ha sido recubierta con un preparado estabilizado de Ag nucleares purificados en función de su afinidad, que actúa como Ag en este sistema. Se disponen de muestras de suero diluidas de los pacientes, se colocan las muestras en los pocillos, se incuban para que reconozcan al antígeno, posteriormente se lavan los pozos y luego se adicionan Ac's marcados con peroxidasa de rábano (conjugado); este preparado es específico de las cadenas ligeras y pesadas de la IgG humana. Tras la incubación con los conjugados de peroxidasa de rábano y si los resultados son positivos, se forma un complejo estable en tres partes: Ac anti-humano conjugado con peroxidasa de rábano unido al Ac anti-ENA humano unido a su vez al Ag estabilizado en la superficie del pocillo. Se detecta el complejo añadiendo una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato y tetrametilbenzidina (TMB) como cromógeno. Los pocillos están recubiertos con Ag's purificados en función a su afinidad: Sm, Sm/RNP, SSA/Ro, SSB/Lo, Scl-70, Jo-1

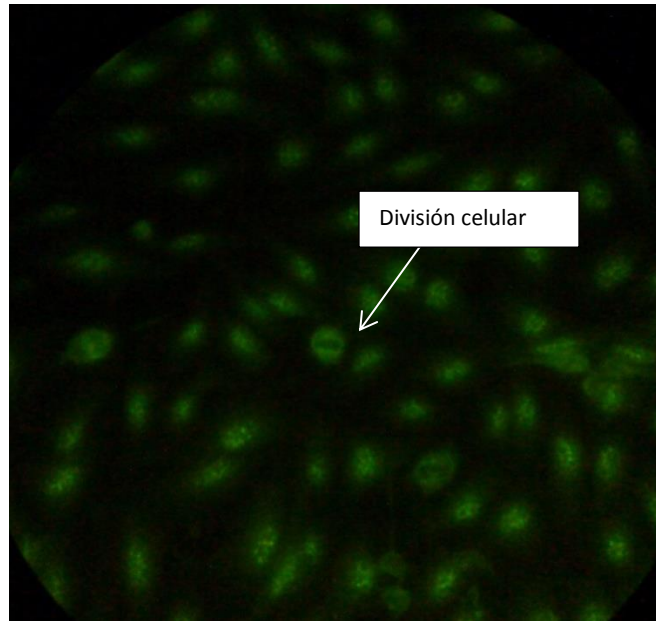


Figura 28. Técnica de ANA positiva en paciente con diagnóstico de LES, se observa un patrón moteado

### 4.6.3 Floculación

La floculación es otro mecanismo que sirve para evidenciar reacciones antígeno-anticuerpo *in vitro* y es considerada de interacción secundaria.

Este tipo de interacción se distinguen dos etapas: la reacción primaria, no visualizable y la reacción secundaria, que sigue a la anterior, caracterizada por la aparición de un fenómeno visible, como es la floculación.

La característica lipídica del antígeno es la condición que la hace ser una reacción de floculación. Los complejos antígeno-anticuerpo formados se agregan y sedimentan en un rango muy estrecho de su relación; en las zonas de exceso de Ag o Ac, sólo forman complejos solubles dando negativa la prueba.

- **Prueba de VDRL:** El reactivo para esta prueba es una suspensión estable de antígeno de cardiolipina para detectar “Reaginas” (anticuerpos generados por la interacción de *treponema pallidum*) en suero sin activar, en plasma y LCR. Esta técnica se basa en la capacidad de las “Reaginas” de unirse al antígeno produciendo una floculación al microscopio.

En el área de inmunología utilizan esta prueba para detectar Ac anticardiolipinas.

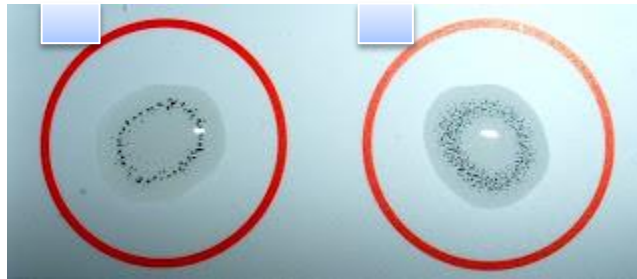


Figura 29. Técnica de aglutinación. Prueba positiva para VDRL

#### 4.6.4 Aglutinación

Los anticuerpos son dirigidos contra determinantes antigénicos de superficie que permiten un adecuado entrecruzamiento con el Ag particulado permitiendo la reacción de aglutinación.

La aglutinación directa se utiliza cuando el antígeno particulado posee suficientes determinantes antigénicos en su superficie permitiendo que el antisuero correspondiente produzca espontáneamente el fenómeno de aglutinación. Se usa regularmente en la serotipificación bacteriana (Palomo, 2009).

#### 4.6.5 Citometría de flujo

La citometría de flujo permite medir la cantidad de anticuerpo monoclonal fluorescente unido a cada célula en forma individual, facilitando la identificación y tipificación de diferentes subgrupos de poblaciones celulares con una extraordinaria sensibilidad, eficiencia y rapidez. En el citómetro de flujo las células atraviesan un rayo láser y son analizadas individualmente.

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

Las células deflecan o dispersan la luz de un láser de una forma estrechamente relacionada con su tamaño y granularidad que es registrada en un detector. La molécula de fluorocromo unida al anticuerpo monoclonal absorbe luz del rayo láser y emite luz en otra longitud de onda, en que su intensidad es captada por otro detector que está en ángulo recto al rayo. Ambos fenómenos facilitan la correcta identificación de las poblaciones celulares (Palomo, 2009).

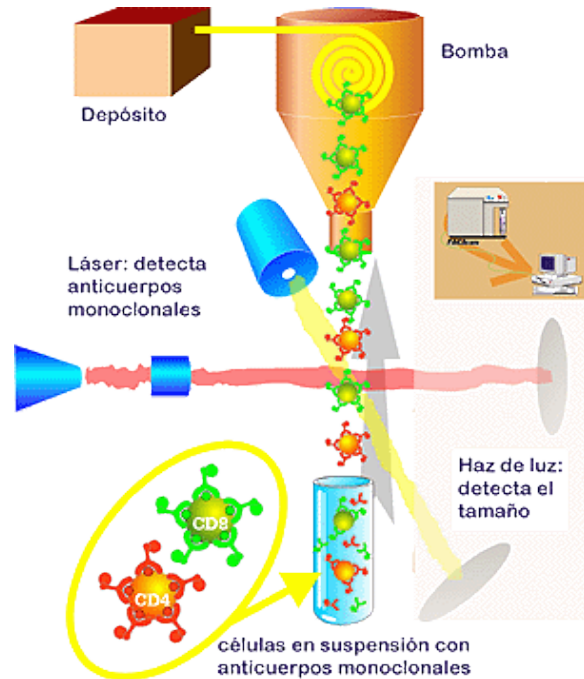


Figura 30. Fundamento de la citometría de flujo para células CD4+

- **Conteo de células CD4+:** Se utiliza el equipo “ALERE PIMA”® el cual realiza un conteo de linfocitos T cooperadores (Tc) por citometría de flujo. La concentración de células Tc es un indicador del estado inmunológico del paciente; en pacientes inmunodeprimidos el recuento absoluto de células T disminuye. Una bomba peristáltica transporta primero la muestra al compartimiento de incubación donde la muestra interactúa con Ac específicos marcados con dos colorantes fluorescentes diferentes. Uno de los Ac es un Ac monoclonal anti-CD3 humano conjugado al colorante uno, el segundo Ac es un Ac monoclonal anti-CD4 humano conjugado al colorante dos. Las señales de fluorescencia son detectadas por una cámara integrada. Las células Tc expresan dos diferentes antígenos de superficie: CD3 y CD4, por lo cual emitirán luz a longitudes de onda específicas para cada Ag; lo cual permite la

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

diferenciación específica de células Tc de otro tipo de células sanguíneas de un solo Ag de superficie.



**Figura 31. Equipo Alere Prima® utilizado en el área de Inmunología para el conteo de células CD4+**

## 4.7 Pruebas especiales

### 4.7.1 Fragilidad osmótica

La prueba de fragilidad osmótica incubada a 37°C durante 24 horas se considera la prueba estándar en todo paciente que presente anemia hemolítica con esferocitos y Coombs negativo.

El estudio de la fragilidad osmótica de los hematíes valora la resistencia de los eritrocitos a soluciones de presión osmótica (soluciones hipotónicas) decreciente, en condiciones constantes de pH y de temperatura. Para ello, se colocan los eritrocitos problema en soluciones tamponadas de cloruro de sodio cuya concentración es decreciente a partir de 9mg.

Cuando los eritrocitos están en contacto con soluciones hipotónicas, el agua penetra a través de su membrana y se hinchan. Al hincharse los hematíes, una parte de la hemoglobina que contienen puede salir a través de los poros de su membrana. Si la entrada de líquido es excesiva, los hematíes se rompen y dejan libre toda su hemoglobina (hemólisis).

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

En condiciones normales, un eritrocito puede aceptar sin hemolizarse una entrada de agua que incremente su volumen un 70% como máximo (Campal, 2005).

La prueba de fragilidad osmótica con cloruro de sodio tiene una sensibilidad y especificidad de 68% en sangre fresca y 81% en sangre incubada. Sin embargo, la sensibilidad puede disminuirse hasta 53% en la sangre no incubada y 64% en la incubada en aquellos casos leves o compensados. Esta prueba puede resultar falsa negativa en aquellos casos con déficit de hierro e ictericia obstructiva, así como en la fase de recuperación de una crisis aplásica (Berges, 2014).

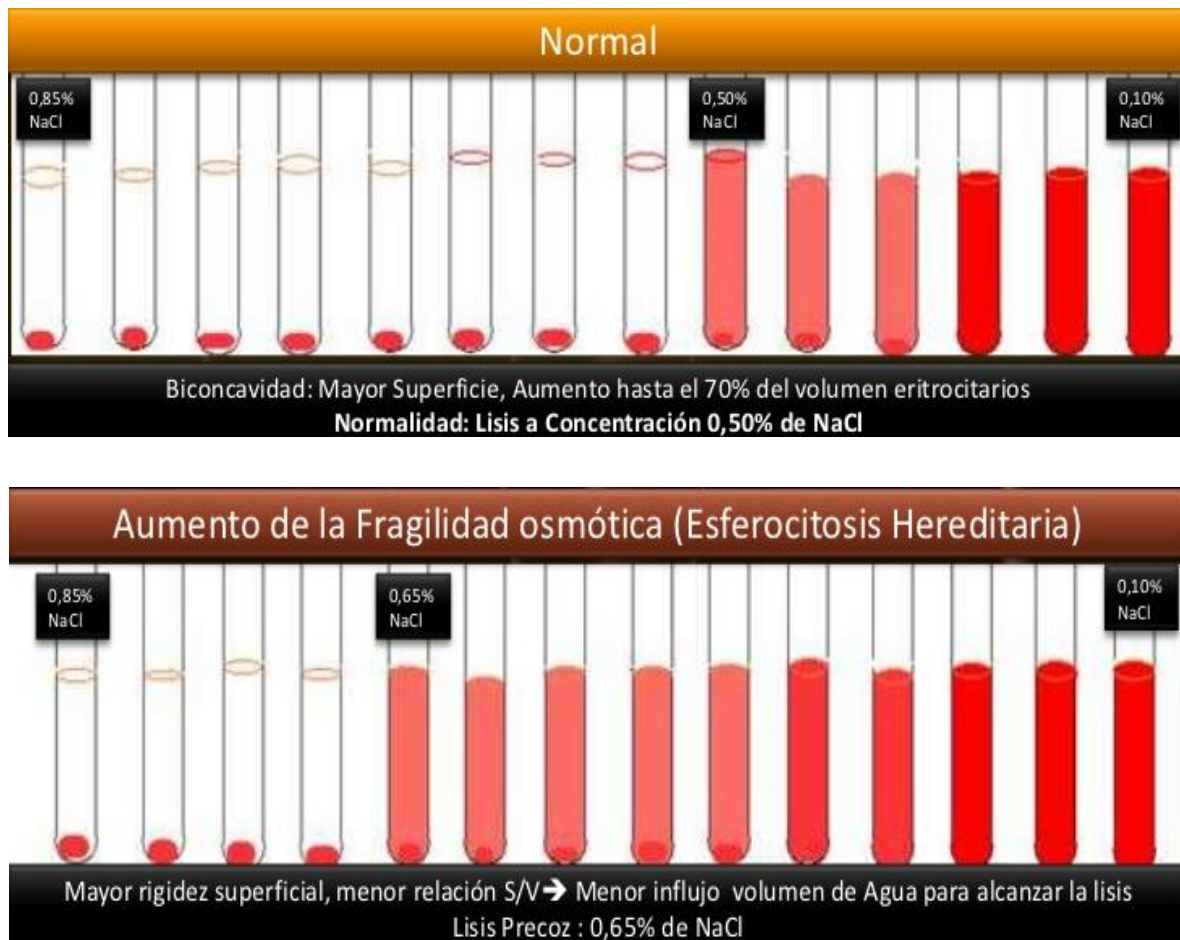


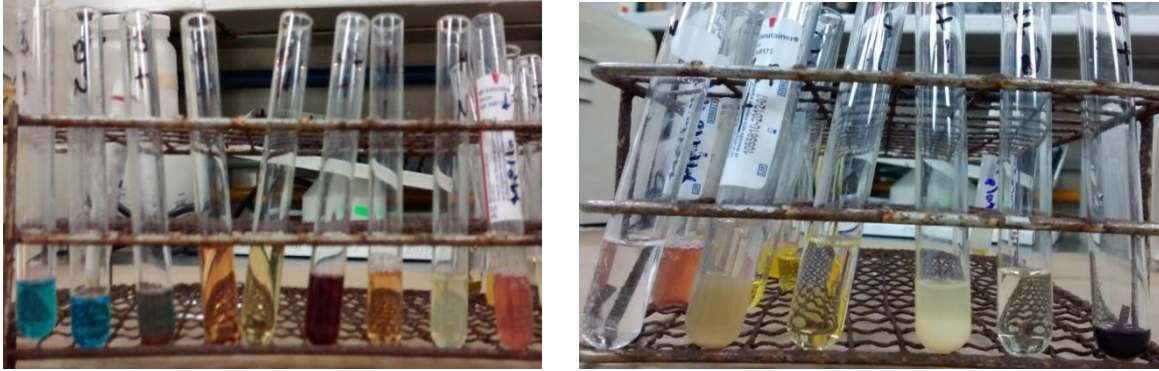
Figura 32. Curva de fragilidad osmótica

#### 4.7.2 Tamiz metabólico en orina

El tamiz neonatal se define como un procedimiento que se realiza para descubrir aquellos recién nacidos aparentemente sanos, pero nacidos portadores de alguna patología endocrina, infecciosa o errores del metabolismo que con el tiempo ocasionará daños graves, irreversibles, antes de que éstos se manifiesten, con la finalidad de poder tratarla, evitando o aminorando sus consecuencias (Evia, 2004).

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

Normalmente es un estudio en sangre que se lleva a cabo en los primeros días del recién nacido; sin embargo el Hospital de Pediatría recibe niños de la parte sur de México y hay algunas provincias en las que este estudio no se les realiza. Es por esto que cuando los médicos sospechan de algún error innato del metabolismo les mandan realizar este estudio, en el cual la muestra de estudio es la orina.



**Figura 33. Ejemplo de la realización del tamiz en orina, se colocan tres tubos por prueba (de derecha a izquierda) muestra de paciente, control negativo, control positivo**

#### 4.7.3 Electrolitos en sudor

La determinación cuantitativa de electrólitos en el sudor resulta ser la prueba más importante para confirmar la sospecha clínica de fibrosis quística. La prueba consiste en la estimulación de las glándulas sudoríparas mediante iontoforesis con pilocarpina, la recolección del sudor y la cuantificación de la concentración de cloruros en el sudor, colectados en papel de filtro mediante el método de Gibson y Cooke. (Avilés, 2013)

La metodología comprende las siguientes etapas:

- Estimulación de la secreción sudoral por iontoforesis con pilocarpina.
- Colección de la muestra en soporte de gasa o papel de filtro.
- Análisis cuantitativo de la concentración de cloruros
- Interpretación bioquímica de los resultados.

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”



**Figura 34. Equipo CHLORDOMETER utilizado en el área de pruebas especiales para la determinación de electrolitos en sudor**

El área de elección para provocar la sudoración es la cara interna del antebrazo, a la cual se le realiza una previa higiene con agua desionizada y una gasa.

Se coloca una almohadilla de gasa impregnada con solución de nitrato de pilocarpina; sobre ella aplicar un electrodo que se sujeta con presión firme y uniforme, con una banda de goma elástica y se conecta al polo positivo de la fuente de poder. Sobre el mismo miembro y a corta distancia, se coloca otra almohadilla de gasa impregnada con solución de ácido sulfúrico, sobre la que se fija el otro electrodo, que se conecta al polo negativo.

Se da comienzo a la iontoforesis aumentando muy lentamente la corriente desde 0 hasta un máximo de 4 mA; de notar molestias en el paciente se reduce la intensidad. Dejar circular la corriente durante unos 4-5 minutos, y se va disminuyendo la intensidad hasta llegar a cero. Se retiran los electrodos y las almohadillas de gasa; inmediatamente, se lava la zona estimulada por la pilocarpina con agua desionizada y se seca con mucho cuidado. Colocar con una pinza, sobre dicha área, papel de filtro libre de iones, previamente pesados con pesafiltros. Y cubrirlo perfectamente con y sujetar con cinta adhesiva; es importante evitar la evaporación que puede ser causa de concentraciones elevadas de electrolitos. Dejar transcurrir 30 minutos y proceder a retirar, con pinzas, el papel de filtro y colocar nuevamente en el pesafiltro original. Pesar nuevamente; la diferencia indicará si la muestra es adecuada para ser analizada. El peso aceptado mínimo es de 75 mg. Realizar una dilución adecuada para eluir el sudor durante 40 min (Claudio Castaños, 2008).

## 4.8 Urgencias

Para la recepción y procesamiento de exámenes de pacientes hospitalizados y de urgencia durante las 24 horas del día los 365 días del año para satisfacer en forma rápida la demanda de exámenes de los pacientes hospitalizados y de quienes consultan en el Servicio de Urgencia.

Aquí se analizan muestras de sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquidos serosos y líquido sinovial. Se realizan pruebas básicas de hematología, coagulación y bioquímicas; también se realizan gasometrías.

### 4.8.1 Gasometrías

Si no hay datos de trastorno respiratorio relevante, la gasometría debe ser venosa no arterial. Las gasometrías arteriales no aportan, muchas veces, ninguna información que produzca modificaciones sustanciales de la actitud diagnóstica o terapéutica.

Debe ser extraída en una jeringa heparinizada y se debe mantener a 37°C sin cámara de aire para evitar cambios en las presiones parciales de los gases o en el pH.

Es aconsejable mirar la gasometría en este orden: pH, pCO<sub>2</sub> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, con el fin de aprovechar al máximo la información que proporciona.

El equipo utilizado es el GEM Premier 3000® (imagen 14) el cual utiliza un sistema analizador de pH, gases en sangre (pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>), electrólitos (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>) hematocrito, sustratos (glucosa, lactato) y parámetros calculados en sangre total en sólo dos minutos para evaluar el estado general del paciente.

Analiza sangre completa (arterial, venosa y capilar) y sólo necesita un cartucho de reactivos el cual integra soluciones calibradoras, gases, biosensores, tuberías, aguja y bolsa de desecho (Premier, 2015).

Se utiliza en niños para evaluar enfermedades respiratorias, evaluaciones en enfermedades cardiopulmonares, respuesta a intervenciones terapéuticas, así como la acidosis o basicidad metabólica.



“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”



Figura 35. Equipo GEM Premier 3000® utilizado en el área de urgencias para el proceso de gasometrías

#### 4.8.2 Microscopia de líquidos

En esta área son recibidos líquidos como: cefalorraquídeo, ascítico y pleural.

El líquido cefalorraquídeo normal es claro y transparente como agua de roca. Como consecuencia de diversas enfermedades puede presentar otros aspectos: turbio (cuando el recuento de leucocitos es mayor a 400/ $\mu\text{L}$ ), hemorrágico (por una hemorragia subaracnoidea o una punción traumática), xantocrómico (lisis de eritrocitos). En un paciente sano deben observarse menos de 5 células / $\text{mm}^3$ , menos de 4 leucocitos/mL y sin presencia de cualquier microorganismo.

Se denomina ascitis a la acumulación patológica de líquido (>25mL) dentro de la cavidad peritoneal y la etiología más frecuente es la cirrosis hepática.

La pleura es una membrana serosa transparente que rodea a cada pulmón y consta de dos capas: pleura visceral y pleura parietal.

En el espacio situado entre ambas pleuras se encuentra el líquido pleural. En condiciones normales, el espacio pleural contiene de 1-10mL de fluido. Los trasudados son consecuencia de un aumento de la presión microvascular o de la disminución de la presión oncótica de la sangre o de la combinación de ambos (Torre, 2015).

## 5. Fase post-analítica

La preservación de la calidad post-analítica es el proceso para verificar la calidad en todos los procedimientos que se llevan a cabo cuando el reporte sale del laboratorio y queda en manos del médico o profesional al cuidado de la salud.

Además de utilizar intervalos de referencia correctos (en este caso son valores de referencia en niños de 0-17 años) esta fase comprende:

- Verificación de los cálculos en los reportes finales.
- Revisión de resultados de las pruebas para detectar posibles errores de transcripción.
- Que los reportes sean fáciles de leer e interpretar.
- Procedimientos para informar al médico de resultados que requieran de atención inmediata.
- Vigilar que se reporten en el momento preciso los resultados en el expediente del paciente.
- Verificar que el médico interprete en forma correcta las pruebas de laboratorio.

## 6. Resultados

La importancia de un laboratorio clínico tan completo como lo es este, es que ayuda en un 80% en las decisiones clínicas; se realizan estudios para establecer el tipo de tratamiento que debe administrarse al paciente, así como el seguimiento del mismo.

Se realiza un trabajo con precisión y confiabilidad. Esto es gracias a los controles de los analitos que se realizan a diario, y las calibraciones cuando son necesarias; así como seguir las reglas de Westgard en las gráficas de Levey-Jenning que proporcionan los equipos con los controles diarios.

Todos los químicos están capacitados y tienen los conocimientos necesarios para llevar a cabo su trabajo, lo que garantiza que los resultados sean confiables y de calidad.

## 7. Discusión

El papel del Q.F.B. es de suma importancia dentro del laboratorio clínico, a pesar de que la mayoría de las pruebas se realizan en equipo automatizado, el Químico debe tener la capacidad de analizar lo que está haciendo, de relacionar el diagnóstico del paciente y su historial previo con los resultados que está obteniendo.

Al realizar el servicio social y/o tesis en un hospital de tercer nivel como es el Hospital de Pediatría de CMNSXXI, nos ofrece un panorama más amplio de cómo se trabaja dentro de un laboratorio, la importancia de saber los fundamentos de los equipos y la carga de trabajo que uno como Químico puede tener; así como las habilidades que se adquieren para trabajar bajo presión, de manera rápida proporcionando resultados confiables como lo es en el área de urgencias.

La fase preanalítica es la más crítica ya que de ella depende en gran medida que los resultados sean confiables. Es por eso que la toma correcta de muestras a pacientes pediátricos a los cuales a veces no se les siente bien la vena, o debido a los tratamientos tan agresivos en el área de oncología las venas se endurecen es de mucha importancia; y dependiendo de las pruebas que se van a realizar determinar si es viable la toma de muestra por goteo cuando no son viables las venas de los brazos. Así como el correcto llenado de tubos cuando son varias pruebas.

En la fase analítica es importante ser muy observador en muestras donde se separa el suero y el plasma para su posterior análisis; ya que la muestra puede estar lipemica o hemolizada y esto puede interferir en la determinación de ciertos analitos en especial en el área de inmunobioquímicas y hormonas donde ciertas pruebas pueden verse alteradas.

Si la muestra esta hemolizada pueden verse alterados el potasio y el LDH debido a la ruptura del eritrocito. Si la muestra esta lipemica, podría necesitar diluciones manuales para poder determinar analitos que se cuantifica por técnicas de inmunturbidimetría o fotometría; por lo que cuando se obtenga el resultado este deberá multiplicarse por la dilución realizada. En ambos casos se debe colocar una leyenda en donde se coloquen cruces del 1+ al 4+ dependiendo del grado de hemólisis y lipemia que presenten.

En área de transfusiones el rastreo de anticuerpos irregulares se realizaba en tubo; sin embargo optaron por cambiar a la técnica de tarjeta. El fundamento es el mismo, la diferencia radica en que la lectura sólo se realiza en la fase Coombs y tiene la peculiaridad de que es más específica y ayudar a que la reacción se observe mejor; se tiene que tener cuidado con los autotestigos ya que al ser una prueba muy sensible se dan falsos positivos cuando el paciente está tomando ciertos medicamentos o está pasando por una infección.

En el caso de los autotestigos positivos se recomienda realizar la prueba en tubo para confirmar que no sea un falso positivo.

El área de microbiología se divide en 5 secciones: urocultivos, líquidos, diversos, hemocultivos y BAAR. En todas las secciones excepto en BAAR se realiza un frotis en fresco y un frotis con la tinción de Gram. Debido a la cantidad de muestras, dividen la caja de agar en dos, y realizan un sembrado que debe revisarse a las 24, 48 y 72 horas, si hay crecimiento se realizan las pruebas bioquímicas primarias (oxidasa y catalasa); se realiza una dilución al 0.5 de McFarland para realizar la identificación de la bacteria y su antibiograma en el equipo Vitek.

El equipo Bact Alert es de gran ayuda para detectar el crecimiento en líquidos diversos y hemocultivos; debido a la gran cantidad de muestras que se analizan. Este equipo cuenta con un sensor que va a detectar el crecimiento microbiano sin que se tenga que sacar del equipo para revisar si hay crecimiento.

Debido a que los reactivos utilizados en el área de inmunología son muy caros, las diferentes pruebas se hacen una vez a la semana, en el caso de las laminillas para el microscopio de inmunofluorescencia se deben juntar mínimo 8 pruebas para completar todos los pocillos de las laminillas. Los químicos del área les recomiendan a los médicos realizar las pruebas en cierto orden dependiendo del diagnóstico del que sospechen:

Para el área de pruebas especiales cabe resaltar que la metodología de la prueba de electrolitos en sudor fue implementada en el Hospital de Pediatría en los años 90's. Fue realizada en diferentes partes del cuerpo en donde se logra obtener un considerado volumen de sudor utilizando diferentes grados de voltaje hasta lograr estandarizar la prueba, con la metodología antes mencionada.

Para la prueba de tamizaje metabólico en orina son muy pocos los casos en las que se realiza, normalmente se utiliza en muestras de niños que vienen de alguna locación alejada, en donde no se le realizó el tamiz en sangre a los pocos días de que el niño haya nacido. Los médicos mandan realizar esta prueba cuando tienen sospecha de algún error innato del metabolismo y no hay un tamiz previo.

En el área de hematología hay que tener un ojo muy entrenado para poder observar e identificar las células al microscopio; ya que en la mayoría de frotis hay células inmaduras. En el caso de las leucemias o células con granulaciones tóxicas es de suma importancia saber distinguirlas; ya que el diagnóstico y el tratamiento dependen de los resultados obtenidos.

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

A pesar de ser un laboratorio de tercer nivel hay muestras que se envían a un laboratorio de referencia o especializado, esto debido a la falta de reactivo que algunas pruebas no cumplen el costo-beneficio, o no se cuenta con la tecnología necesaria para realizarlas.

Algunas de las pruebas que se envían son: 17HPG, DNA, tiroglobulina, IGFBP3, IGFI, péptido C, Insulina, Calcitonina, aldosterona, Transferrina, Ca125, Ca153, Ca199, Procalcitonina, HCPHB, HCCGB, Cistatina, Ceruloplasmina. Cabe destacar que se trata de pruebas especiales muy particulares que no cualquier laboratorio tiene y es de suma importancia contar con estos estudios para un mejor diagnóstico médico..

## **8. Conclusiones**

Se llevaron a cabo rotaciones en todas las áreas del laboratorio central de pediatría, aprendiendo a usar todos los equipos de laboratorio y las diferentes técnicas manuales para las diferentes pruebas.

Se aprendió a tomar muestras pediátricas a pacientes con diferentes padecimientos en los cuales influía la correcta toma de muestra; así como las condiciones especiales que tienen ciertos analitos.

Se aplicaron los conocimientos adquiridos en la facultad y se adquiriendo nuevos; completando así el aprendizaje necesario para poder laborar en cada área.

Con los conocimientos adquiridos se adquirió la capacidad de relacionar el fundamento de la prueba con los resultados y el diagnóstico; para así poder decidir si el resultado es correcto o hubo algún error, y en el caso de haber un error tener la capacidad de identificar ese error y corregirlo para poder emitir un resultado confiable.

Al incursionar en un laboratorio de tercer nivel como lo es el Hospital de Pediatría, se adquirió un panorama general de cómo es trabajar en un laboratorio, los conocimientos que se deben tener, y la toma de decisiones correctas para ayudar al diagnóstico médico.

## Bibliografía

- (1993). En S. Prieto, *Laboratorio clínico. Principios generales* (pág. 566). Interamericana McGraw-Hill.
- Avilés, J. A. (2013). Electrolitos en sudor. *Universidad ciencias médicas de Holguin*.
- Berges, D. A. (2014). Diagnóstico y tratamiento de la esferocitosis hereditaria. *CENETEC*.
- bioMérieux. (08 de 11 de 2016). *biomerieux*. Recuperado el 10 de 12 de 2016, de [http://www.biomerieux.es/servlet/srt/bio/spain/dynPage?doc=SPN\\_IND\\_FDA\\_PRD\\_G\\_PRD\\_NDY\\_7](http://www.biomerieux.es/servlet/srt/bio/spain/dynPage?doc=SPN_IND_FDA_PRD_G_PRD_NDY_7)
- Campal, F. R. (2005). Fundamentos y técnicas de análisis hematológicos y citológicos. España: Paraninfo.
- CDC. (24 de abril de 2012). *CDC*. Recuperado el 15 de enero de 2017, de [https://www.cdc.gov/tb/esp/publications/factsheets/testing/diagnosis\\_es.htm](https://www.cdc.gov/tb/esp/publications/factsheets/testing/diagnosis_es.htm)
- Claudio Castaños. (2008). Consenso Nacional de fibrosis quística. *Sociedad Argentina de pediatría*, 47-48.
- Control de calidad en el laboratorio*. (2013). Recuperado el 07 de mayo de 2016, de <https://docs.google.com/document/d/1dVxL-A51n07l5Zy1CCZc1tcnMyJwITJV17CedE7lMaQ/edit?pref=2&pli=1>
- Cooper, G. (2007). *BIO-RAD*. Obtenido de [http://www.qcnet.com/Portals/60/PDFs/BasicQCBklt\\_Sp\\_May11.pdf](http://www.qcnet.com/Portals/60/PDFs/BasicQCBklt_Sp_May11.pdf)
- Dueñas, V. H. (2005). *El banco de sangre*. Colombia: Universidad del Valle.
- Echevarne. (2012). *Laboratorio de análisis Echevarne*. Recuperado el 18 de enero de 2017, de <https://www.echevarne.com/industria/campos-de-actuacion/industria-farmacutica/test-esterilidad-bact-alert.html>
- Elinos, M. F. (2015). *Fundamentos de bacteriología*. México: Trillas.
- Esper, R. C. (2007). Modelo celular de la hemostasia y utilidad del factor VII recombinante activado en la práctica clínica. *Acta médica grupo Angeles*, 5(1), 27-32.
- Evia, J. R. (2004). Tamiz neonatal: una estrategia en la medicina preventiva. *Revista mexicana de patología clínica*, 51(3), 130-144.
- García, C. A. (2009). Sistema de grupo sanguíneo ABO. *Medicina & Laboratorio*, 309-344.

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

- González, M. C. (2012). Recuperado el 03 de Junio de 2016, de <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/10/pruebas-realizadas-en-ellaboratorio-de-hematologia.pdf>
- Hernández, D. Á. (2010). *Principios de bioquímica clínica y patología molecular*. España: Elsevier.
- López, D. S. (2006). Bacteriemia, sepsis y shock séptico. En D. S. López, *Tratado de Geriátrica* (págs. 409-415). Recuperado el 2017 de enero de 10
- López-Jacomé, L. E. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 10-18.
- Magé, L. S. (2014). Variables analíticas en el laboratorio clínico. *Latin America Preanalytical Scientific Committee*, 7.
- Mezza, A. (2012). *Representaciones Clínicas de Laboratorio*. Recuperado el 09 de Mayo de 2016, de [http://repreclinlab.com/pdfs/IL/acl\\_top\\_500.pdf](http://repreclinlab.com/pdfs/IL/acl_top_500.pdf)
- NOM-253-SSA1-2012. (2012). NOM-253-SSA1-2012 Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. *Diario Oficial de la Federación*.
- Palomo, I. (2009). Métodos inmunológicos y de biología molecular. En *Fundamentos de Inmunología básica y clínica* (págs. 635-652). Chile: Editorial Universidad de Talca.
- Premier, G. (2015). *GEM Premier*. Recuperado el 28 de Noviembre de 2016, de <http://www.medicalexpo.es/prod/instrumentation-laboratory/product-80678-566681.html>
- Quesada, F. J. (Junio de 2010). Diseño, implantación, procedimientos operativos y gestión de un laboratorio de análisis clínicos con capacidad para procesar 1000 muestras/día. Sevilla: Universidad de Sevilla.
- Quintanilla, J. (2004). Síndrome aglutininas frías. *Acta Medica Costarricense*, 204-207.
- Ravelo, M. A. (2007). Las variables preanalíticas y su influencia en los resultados de laboratorio clínico. *Rev Mex Patol Clin*, 159-167.
- Reyes, G. R. (2010). *Fundamentos de interpretación clínica de los exámenes de laboratorio*. México D.F.: Editorial medica Panamericana.
- Robledo, G. B. (2014). *Inmunología básica y su correlación clínica*. México: Medica Panamericana.

“Visión general del diagnóstico en un laboratorio de pediatría de tercer nivel: fases preanalítica, analítica y postanalítica”

Salazar, L. C. (2015). *Departamento de la Facultad de Química UNAM*. Obtenido de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Control\\_Calidad\\_22753.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Control_Calidad_22753.pdf)

Stock, R. (2016). *IBT, UNAM*. Recuperado el 09 de Abril de 2016, de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>

Sysmex. (2016). *Sysmex. Sistema automatizado de hematología*. Recuperado el 15 de junio de 2016, de <https://www.sysmex.com/la/es/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100-Hematology-Analyzer.aspx>

Torre, F. J. (2015). *Manual técnico superior de laboratorio clínico y biomédico*. México: Editorial Médica Panamericana.

Vargas, M. (2006). Aplicación del método gráfico de Levey-Jenning a los datos de un control de calidad externo en química clínica. *Revista de Costa Rica de ciencia médica*, 7(4), 315-321.