

113  
Zy



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**F.E.S. CUAUTITLAN**

**MANUAL DE LABORATORIO CLINICO  
VETERINARIO**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**  
**P R E S E N T A :**  
**JOSE GUILLERMO TELLO VASCONCELOS**

**ASESOR: RAMON CENDEJAS RAMIREZ**

**CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO**

**1987**



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## I N D I C E   G E N E R A L

	Pag.
INDICE DE FIGURAS.....	I
INDICE DE ANEXOS.....	II
INDICE DE CUADROS.....	V
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVO.....	3
CAPITULO 1	
MANEJO Y CUIDADO DE APARATOS DE LABORATORIO.	
Centrífugas.....	4
Fotocolorímetro.....	6
Microscopio.....	10
CAPITULO 2	
AGUA, ELECTROLITOS Y EQUILIBRIO ACIDO/BASICO.	
Antecedentes.....	12
Determinación de cloro.....	16
Determinación de sodio y potasio.....	17
Determinación de calcio.....	20
Examen General de orina (urianálisis).....	23
Colección de muestras de orina.....	24
Examen físico.....	26
Examen químico.....	27
Examen microscópico del sedimento urinario.....	36
Preparación de reactivos.....	41
CAPITULO 3	
HEMATOLOGIA.	
Antecedentes.....	43
Hemoglobina.....	50
Hematocrito.....	53
Conteo de glóbulos blancos y glóbulos rojos....	55
Frotis sanguíneo.....	59
Velocidad de sedimentación globular.....	62
Valores corpusculares de los hematíes.....	64

	Pag.
Pruebas de coagulación.....	66
Tiempo de sangrado.....	69
Tiempo de coagulación de sangre completa.....	70
Retracción del coágulo.....	72
Conteo de plaquetas.....	73
Tiempo de protrombina.....	75
Tiempo parcial de tromboplastina.....	76
Tiempo de trombina.....	78
Preparación de reactivos.....	79
CAPITULO 4	
QUIMICA SANGUINEA.	
Antecedentes.....	81
Filtrado de Folin-WU.....	83
Glucosa.....	84
Nitrógeno ureico sanguíneo.....	87
Creatinina.....	89
Acido úrico.....	91
Proteínas totales y relación albúmina y globulina.....	93
Colesterol.....	95
Creatininfosfocinasa.....	97
Preparación de reactivos.....	99
CAPITULO 5	
PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPATICO.	
Antecedentes.....	103
Bilirrubina total, directa e indirecta.....	105
Transaminasa glutámico oxalacética.....	108
Transaminasa glutámico pirúvica.....	110
Prueba de enturbiamiento por timol.....	112
Deshidrogenasa láctica.....	114
Fosfatasa alcalina sérica.....	116
Cefalín colesterol.....	118

	Pag.
Prueba de Gros.....	119
Preparación de reactivos.....	120
CAPITULO 6	
PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO PANCREATICO.	
Antecedentes.....	123
Determinación de amilasa sérica.....	124
Determinación de lipasa sérica.....	126
Prueba de tolerancia a la glucosa.....	128
Examen de heces.....	129
CAPITULO 7	
PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO RENAL.	
Antecedentes.....	132
Excreción de fenolsulfonftaleína.....	133
Denuración renal.....	135
CAPITULO 8	
LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO.	
Antecedentes.....	136
Obtención de muestras.....	136
Examen físico.....	138
Examen citológico.....	139
Examen químico.....	140
CAPITULO 9	
EXUDADOS Y TRASUDADOS.	
Antecedentes.....	143
Obtención de muestras.....	143
Examen físico.....	144
Examen químico.....	145
Examen citológico.....	146
CAPITULO 10	
CITOLOGIA VAGINAL.	
Antecedentes.....	147
Toma de muestras.....	147
Examen citológico.....	147
Características de la perra observadas en cada etapa del ciclo estral.....	148

CAPITULO 11	Pag.
PREPARACION DE SOLUCIONES PARA TINCIONES CELULARES	
Tinción de Wright.....	150
Tinción de Leishman.....	150
Tinción Wright-Giemsa.....	151
Tinción de Wright para aves.....	151
Tinción de Wright-Leishman.....	152
Tinción nuevo azul de metileno.....	153
Tinción para reticulocitos.....	153
Agua destilada amortiguada.....	154
ANEXO: FARMACOS QUE ALTERAN LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO.....	155
VALORES DE REFERENCIA.....	165
BIBLIOGRAFIA.....	171

INDICE DE FIGURAS.

	Página.
Figura 1.- Esquema general de partes de un fotocolorímetro _____	7
Figura 2.- Instrucciones de manejo para el espectrofotómetro Baush & Lomb _____	8
Figura 3.- Cuenta de leucocitos y eritro- citos _____	58
Figura 4.- Vía extrínseca e intrínseca de la coagulación sanguínea _____	68

INDICE DE ANEXOS.

	Página.
Anexo 1.- Fármacos que pueden alterar el color de la orina	156
Anexo 2.- Fármacos que pueden producir aumento en la densidad específica de la orina	156
Anexo 3.- Fármacos que pueden producir resultados falsospositivos en la prueba de proteínas en orina	156
Anexo 4.- Fármacos que pueden producir resultados falsospositivos en la prueba de glucosa en orina	156
Anexo 5.- Fármacos que pueden alterar los resultados en la prueba de sangre en orina	157
Anexo 6.- Fármacos que pueden producir resultados positivos en la prueba de bilirrubina en orina	157
Anexo 7.- Fármacos que pueden producir resultados aumentados o disminuidos en la prueba de urobilinógeno en orina	157
Anexo 8.- Fármacos que pueden producir resultados aumentados o disminuidos en la prueba de calcio en orina	157
Anexo 9.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de la velocidad de sedimentación globular	158
Anexo 10.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución en el tiempo de coagulación	158
Anexo 11.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución en el tiempo de protrombina	158
Anexo 12.- Fármacos que pueden inhibir la heparina	158

	Página.
Anexo 13.- Fármacos que pueden producir trom- bocitopenia _____	159
Anexo 14.- Fármacos que pueden producir va- riaciones en el color de las heces _____	159
Anexo 15.- Fármacos que pueden producir re- sultados falsosnegativos en la prue- ba de sangre oculta en heces _____	159
Anexo 16.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución del nitrógeno ureico sanguíneo _____	159
Anexo 17.- Fármacos que pueden producir aumento de bilirrubina en suero _____	160
Anexo 18.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de colesterol en suero _____	160
Anexo 19.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de sodio en suero _____	160
Anexo 20.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de cloro en suero _____	160
Anexo 21.- Fármacos que pueden producir aumento de amilasa en suero _____	161
Anexo 22.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución del hematocrito, hemo- globina y eritrocitos _____	161
Anexo 23.- Fármacos que producen aumento o dis- minución de leucocitos en sangre _____	161
Anexo 24.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de el fibrinógeno _____	162
Anexo 25.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de reticulocitos en el frotis sanguíneo _____	162
Anexo 26.- Fármacos que pueden producir aumento en el conteo diferencial leucocitario _____	162

	Página
Anexo 27.- Fármacos que pueden producir disminución en el conteo diferencial leucocitario _____	163
Anexo 28.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de glucosa en suero _____	163
Anexo 29.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de albúminas _____	163
Anexo 30.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de globulinas _____	164

INDICE DE CUADROS.

	Página.
Cuadro 1.- Anticoagulantes _____	46
Cuadro 2.- Valores normales de electrolitos en sangre recopilados de diferen- tes autores _____	166
Cuadro 3.- Valores hematológicos normales recopilados de diferentes autores _____	167
Cuadro 4.- Valores normales de las pruebas de coagulación recopilados de diferentes autores _____	168
Cuadro 5.- Valores normales de química sanguínea recopilados de diferentes autores _____	169
Cuadro 6.- Valores normales de enzimas séricas recopilados de diferentes autores _____	170

## INTRODUCCION:

Un laboratorio de diagnóstico clínico es el lugar donde se procesan las muestras orgánicas que se envían para su estudio. Todo análisis clínico debe cumplir con las características siguientes; sencillez, rapidez y precisión; deberá ser reproducible, sensible, fácil de hacerse en serie, automatizable, económico y que requiera de un mínimo de muestra. Por todo esto, se pretende en este trabajo reunir la información didáctica y experimental obtenida de libros de consulta y revistas especializadas; con bibliografía mínima de lecturas en donde el alumno podrá encontrar el material requerido para la asignatura de Laboratorio Clínico. Se efectuará una clasificación de métodos o técnicas, materiales necesarios, aparatos y confiabilidad de las técnicas a realizar en el curso del mismo Laboratorio Clínico y que también puedan tener utilidad en el diagnóstico clínico.

La utilidad de las pruebas de laboratorio en el diagnóstico, se puede confirmar con la secuencia que se lleva a cabo en relación a éste. Tenemos un diagnóstico presuntivo, en donde sospechamos de algún trastorno o enfermedad, donde en ocasiones tenemos que recurrir al diagnóstico diferencial en el que utilizamos al laboratorio, indicando las muestras a tomar y pruebas encaminadas a confirmar o desechar dicho diagnóstico, analizando y conjugando los resultados obtenidos para llegar a un diagnóstico definitivo.

En la medicina veterinaria el valor de las pruebas de laboratorio resulta tan importante al clínico como el examen físico del animal y su historia clínica para que la asociación inteligente de estos elementos nos den la evaluación del estado fisiológico del animal.

El laboratorio clínico es en ocasiones poco utilizado por el médico veterinario y al respecto Wells (1962), enunció "El médico que fía solo en el laboratorio para su diagnóstico, probablemente no tiene experiencia; el que dice que no necesita el laboratorio carece de conocimientos. En uno y otro

caso el paciente está en peligro" (11).

En algunas ocasiones al clínico le urge conocer los resultados de alguna muestra, para dar un diagnóstico certero y poder llevar a cabo un tratamiento, lo cual en ocasiones no es posible ya que el tomar la muestra, mandarla al laboratorio y esperar los resultados puede ser tardío, además frecuentemente se enfrenta a algunos problemas (no se tiene conservador, etc.). En este trabajo se mencionarán pruebas que puedan realizarse a nivel de campo por el clínico, y en tiempo muy corto que le pueda ayudar a confirmar su diagnóstico y a tiempo para poder dar un tratamiento, además, estos mismos datos podrán servir al estudiante que curse la materia de Laboratorio Clínico, para que en su vida profesional pueda realizar estas pruebas, ya que en la actualidad las prácticas de laboratorio de dicha asignatura tienen asignado en el curso un tiempo muy corto para poder realizar todas o la mayoría de las técnicas.

Para la interpretación de los datos de laboratorio, existen valores de referencia o rangos normales para las diferentes especies de animales domésticos. Hay una gran variación en los valores de referencia en la bibliografía existente, por lo que se unificarán los valores, obteniendo así valores medios de referencia. Se debe tener en cuenta que los valores en las diferentes citas bibliográficas, corresponden a literatura extranjera, por lo que son un poco fuera de la realidad de los valores que deben existir en nuestro país.

Este manual se realizará sobre las especies domésticas más importantes: equino, bovino, ovino, caprino, porcino, canino y felino.

**OBJETIVO:**

Este trabajo, pretende ser un apoyo didáctico para el alumno que curse Laboratorio Clínico en la FES Cuautitlán, y que pueda efectuar sus prácticas de laboratorio, teniendo al alcance una guía de procedimientos, con una breve explicación de la utilidad de las pruebas de laboratorio que faciliten la realización de las mismas. Además de tener a su alcance una amplia relación bibliográfica, que le pueda ser útil durante el curso.

## 1.- MANEJO Y CUIDADO DE APARATOS DE LABORATORIO.

### A) Centrífugas.

Las centrífugas son aparatos utilizados en el laboratorio para separar sustancias sólidas (material en suspensión y mezclas), de las sustancias líquidas. La centrifugación es un proceso importante, ya que al aumentar la velocidad de centrifugación aumenta la fuerza de gravedad, éste aumento ayuda a que los sólidos suspendidos se separen con mayor rapidez. Podemos presuponer que un mililitro de líquido al que se somete a centrifugación con una velocidad alrededor de 2500 a 3000 revoluciones por minuto (rpm), sería equivalente a la fuerza de atracción de la tierra sobre un material que tuviera un peso de 600 a 750 gramos (g) (30,47,90).

Siendo un aparato de gran utilidad para un laboratorio, por la ventaja de reducir considerablemente el tiempo de trabajo y separar con mayor eficacia (47).

Las centrífugas más comunes manejadas en el laboratorio clínico son:

1.- Manuales.

2.- Mecánica (eléctrica)

- Centrífuga clínica.  
de 1000 a 4000 rpm.
- Centrífuga para microhematocrito.  
de 10000 a 15000 rpm.

Para calcular la fuerza centrífuga deben tomarse en cuenta los siguientes datos:

$$f = g \times n^2 \times m \times r \text{ donde:}$$

g = 0.0196, constante de gravedad.

f = fuerza centrífuga en dinas.

n = rotaciones por minuto.

m = masa centrifugada (g).

r = distancia radial del centro al punto más distante del cabezal (50).

a) La centrífuga deberá estar bien simentada y horizontal.

b) El rotor deberá tener en su extremo contrario el mismo peso, nunca ponerlos con pequeñísima diferencia de peso, ya que podría afectar la estabilidad de la centrifuga y romperse algún tubo.

c) Se debe aumentar la velocidad lentamente hasta obtener la velocidad deseada (rpm).

d) Bajar la velocidad lentamente hasta parar completamente, nunca hacerlo bruscamente ya que provocaría resuspensión del material centrifugado.

e) Los tubos a usar deben ser gruesos y del tamaño adecuado ya que en su rotación pueden romperse.

Cuidados:

- 1.- Al terminar de utilizar la centrifuga, limpiarla y secarla.
- 2.- Cuidar que las almohadillas de caucho estén completas.
- 3.- Desinfectar periodicamente la centrifuga aún cuando no se haya roto ningún tubo o derramado algún líquido contaminante.
- 4.- Cuidar que el eje de rotación se encuentre en buen estado (90).

## B) Fotocolorímetro.

Las sustancias en la naturaleza toman un color característico por absorber un tipo determinado de energía a diferente longitud de onda luminosa.

La luz blanca al pasar a través de un prisma se descompone en diferentes colores que podemos llamar fundamentales, cada uno de ellos tiene una amplitud de onda en donde se mezclan; a este punto definido para un color se le da el nombre de longitud de onda y se mide en unidades Armstrong ( $\text{\AA}$ ), o milimicras ( $m\mu$ ).

Tabla de rangos de color:

longitud de onda ( $m\mu$ )	absorción de luz
380	violeta
380-435	azul
490-500	verde
560-580	amarillo
580-595	naranja
595-650	rojo

En un principio se comparaba visualmente con el color de las soluciones una tabla de colores y se trataba de dar una concentración que era proporcional a la intensidad del color que presentaba la solución en relación a la tabla de colores.

Se trató de encontrar una forma en la cual se pudiera tener mayor exactitud, encontrándose que la luz es una corriente de electrones, que al chocar en una celda fotoeléctrica se puede convertir a corriente eléctrica y esta a su vez se puede medir en un galvanómetro.

Este método permite tener una mayor exactitud que no se podría igualar con el ojo humano (47,50,91).

También se puede hacer uso de la excitación de las moléculas o átomos de las sustancias, ya que al excitarse con una flama emiten un determinado tipo de longitud de onda, la cual puede medirse al igual que en fotocolorimetría y a ésta se le llama flamometría.

La medida de dispersión de la luz por una sustancia suspendida en una solución, se conoce como turbidimetría y puede ser medida en un nefelómetro.

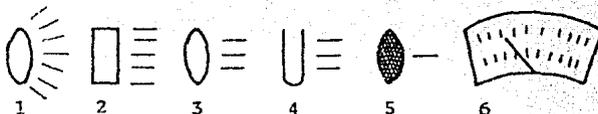
Podemos encontrar en el comercio varios aparatos a usar en estos casos:

Fotocolorímetro (espectrofotometría).

Flamómetro.

Nefelómetro.

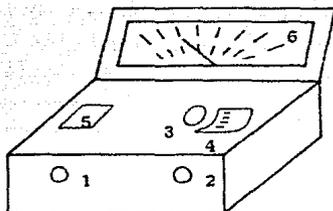
Fig. 1.- Esquema general de partes de un fotocolorímetro (30, 50, 51, 75, 126).



- 1.- Fuente luminosa de intensidad constante.
- 2.- Alineador de rayos luminosos. (Concentrar en paralelo los rayos luminosos entre 1 y 2).
- 3.- Lente o monocromador para seleccionar por medio de éste la longitud de onda requerida para trabajar.
- 4.- Cubeta. Recipiente de vidrio inerte al paso de la luz. En este recipiente de vidrio se coloca la sustancia a cuantificar.
- 5.- Celda fotoeléctrica. Mecanismo electrónico que transforma la energía luminosa en corriente eléctrica.
- 6.- Galvanómetro. Cuantifica la cantidad de energía eléctrica generada por la fotocelda, éste nos da la lectura en una escala ajustada a % de transmitancia ( $\%T$ ), o densidad óptica (D.O.).

La primera se da en escalas decimales lineales, mientras que la D.O. se da en escala logarítmica.

Fig. 2.- Instrucciones de manejo para el espectrofotómetro  
Baush & Lomb.



- 1.- Botón de encendido (1). Cuando se prende el aparato para su uso, dejar calentar por 5 a 10 minutos para lograr estabilidad de la corriente en el aparato.
- 2.- Ajustar con el botón 3 la longitud de onda deseada que aparece en la rejilla 4.
- 3.- Con el botón 1 se debe ajustar a cero de %T o a 100% de D.O., en la escala del aparato (5).
- 4.- Introducir la cubeta con blanco de reactivos en el orificio (5), y ajustar a 100% T o a cero de D.O., con el botón 2.
- 5.- Preparar la muestra problema o patrón, procediendo a introducir las en el orificio (5), leyendo en la escala (6), tomando la lectura en % T o en D.O., de acuerdo a la curva patrón con que se trabaje, o proceder a los cálculos.
- 6.- Al terminar de trabajar, apagar el aparato y desconectar de la corriente para evitar problemas de voltaje alto o que por error se deje prendido el aparato.

Causas de error:

- a) Grosor de las paredes de las cubetas que sea uniforme y pureza inadecuada de las mismas.
- b) Cubetas rayadas u opacas.
- c) Mala calibración del aparato.
- d) Lentes rayados o sucios por vapores de solventes o ácidos.
- e) Variaciones de corriente en el voltaje.

- f) No ajustar el aparato a la longitud de onda adecuada cada vez que se trabaje.
- g) Tiempo de vida de la lámpara.
- h) Aparatos en lugares muy húmedos.

### C) Microscopio.

El hombre trató de encontrar respuesta en los procesos biológicos en los que aparentemente no encontraba respuesta. Una de ellas fué que mientras que estudiaba la naturaleza, encontraba organismos mas pequeños.

Al sobreponer algunos lentes encontró que éstos podían aumentar el tamaño de los objetos, originándose estudios que dieron como resultado los primeros microscopios.

El microscopio nos permite aumentar el tamaño de los objetos, este aumento se indica en diámetros y se le llama amplificación (por ejemplo, si un parásito aumenta su tamaño 10 diámetros, se dice que aumentó 10 veces o sea 10 X).

En los microscopios actuales el poder de amplificación es mayor, ya que se colocan dos lentes separados en los extremos de un tubo haciendo que esta imagen se amplifique mucho más que cuando estos lentes están cerca.

Estas dos lentes por la posición que toman en los extremos del tubo, reciben nombres diferentes.

El lente cercano al ojo del observador se le dá el nombre de ocular, y al que está en el otro extremo recibe el nombre de objetivo. Por lo tanto, cuando usamos ocular 10 X y el objetivo es de 40 X el aumento real sería 400 X al verlo al microscopio.

El microscopio tiene varias partes importantes, dentro de ellas se encuentran las partes ópticas constando de:

- 1.- Ocular.
- 2.- Objetivo.
- 3.- Diafragma.
- 4.- Condensador.
- 5.- Espejo.
- 6.- Fuente luminosa.

Objetivo: Parte importante del microscopio que nos proporciona el grado de aumento requerido debido a la combinación de lentes pudiendo encontrarse dos tipos de objetivos, los objeti-

vos secos y de inmersión.

Los objetivos secos tienen que estar constituidos de dos o más lentes, mientras mayor número de lentes sean acopladas con precisión, darán mayor amplificación, este tipo de lente es común. En la mayoría de los microscopios de laboratorio clínico, son de dos tipos principales, objetivo seco de bajo poder, (10 X) y objetivo seco de alto poder (40 X). Estos objetivos pueden ser identificados, ya que tienen grabado su poder de resolución.

El segundo tipo de objetivos son los de inmersión que pueden dar mayor grado de amplificación, siendo el más utilizado el de 100 X.

La resolución de un objetivo depende de su abertura numérica (A.N.), de la cual depende la cantidad de luz que pasará por el lente, y los detalles que permitirá ver (resolución).

Mientras mayor sea la A.N. del objetivo, mayor brillantez y nitidez tendrá la imagen (30,51,75).

Cuidados:

- 1.- Los objetivos deberán mantenerse limpios de polvo y grasa.
- 2.- Se manejará de la misma manera a los oculares.
- 3.- Se deberá corregir y ajustar el aparato por lo menos cada año en sus partes ópticas.
- 4.- La corrección de ajuste a las partes mecánicas deberá verificarse cada seis meses.
- 5.- El diafragma de un microscopio deberá limpiarse y lubricarse periódicamente y evitar corrosión ya que es difícil de reparar.
- 6.- La platina deberá estar limpia y seca además de lubricada, ya que si se fuerza puede dañarse la parte mecánica (47,50).

## 2.- AGUA, ELECTROLITOS Y EQUILIBRIO ACIDO/BASICO.

### I.- Agua (6,98,132).

#### A) Compartimiento de los líquidos corporales.

- 1) Agua intracelular. Constituye aproximadamente el 45 a 60% del peso corporal.
- 2) Agua extracelular. Constituye aproximadamente el 20% del peso corporal:
  - Agua intersticial: 15%.
  - Agua intravascular: 5%.

#### B) Fuentes de agua.

- 1) Agua preformada. Agua tomada por el organismo como líquido y contenida en los alimentos sólidos (exógena).
- 2) Agua de la oxidación. Agua derivada de la oxidación de los alimentos en bióxido de carbono y agua (endógena).

#### C) Pérdida de agua.

- 1) Riñones. En la orina se excreta un poco mas del 50% del agua.
- 2) Pulmones.
- 3) Piel. Transpiración.
- 4) Heces. Pérdida mínima.

### II.- Electrolitos (6,7,70,85).

#### A) Cationes y aniones del plasma, líquido intersticial y líquido intracelular.

Cationes: Iones positivos que emigran hacia el electrodo negativo o cátodo.

##### 1) Cationes del plasma y líquido intersticial:

- Sodio: Principal catión del plasma y líquido intersticial.
- Potasio.
- Calcio.
- Magnesio.

##### 2) Cationes del líquido intracelular:

- Potasio: Principal catión del líquido intracelular.
- Sodio.
- Calcio.

- Magnesio.

Aniones: Iones negativos que emigran hacia el electrodo positivo o ánodo.

1) Aniones del plasma y líquido intersticial.

- Cloruro: Principal anión del plasma y líquido intersticial.

- Bicarbonato.

- Fosfato.

- Sulfato.

- Sales de ácidos orgánicos.

- Proteinato.

2) Aniones del líquido intracelular:

- Fosfato: Principal anión del líquido intracelular.

- Cloruro.

- Bicarbonato.

- Sulfato.

- Proteinato.

B) El equivalente químico total de los cationes siempre es igual al de los aniones en todos los líquidos.

III.- Equilibrio ácido-básico (7,52,85,91,121,125).

A) Sistemas amortiguadores.

El estado del equilibrio o desequilibrio ácido-básico del líquido extracelular depende principalmente de las cantidades relativas de ácido carbónico y del bicarbonato (base presente en el líquido extracelular). En condiciones normales se encuentran presentes en una proporción de 1 parte de ácido carbónico a 20 partes de bicarbonato.

Otros sistemas amortiguadores. Sólo participan en parte en la regulación del equilibrio ácido-básico.

- Sistema fosfato monosódico/fosfato disódico.

- Sistema de proteínas plasmáticas.

- Sistema fosfato monopotásico/fosfato dipotásico.

- Sistema oxihemoglobina/hemoglobina reducida.

B) Acidosis y alcalosis (7,19,28,52,106).

La proporción de 1 parte de ácido carbónico a 20 partes de

bicarbonato determina el pH del líquido extracelular; mientras esta proporción se mantenga, el pH permanecerá dentro de los límites normales de 7.35 a 7.45.

Cuando aumentan o disminuyen ya sea el ácido carbónico o el bicarbonato de manera que la proporción se modifica, se produce un desequilibrio ácido-básico.

Se presentan dos tipos generales de trastornos ácido-básicos.

1) Trastornos metabólicos: afectan la concentración de bicarbonato.

- Déficit: Acidosis.

- Exceso: Alcalosis.

2) Trastornos respiratorios: afectan la concentración de ácido carbónico.

- Déficit: Alcalosis.

- Exceso: Acidosis.

a.- Acidosis metabólica. Déficit de bicarbonato. La cetona y un exceso de iones cloruro o ambos reemplazan los iones bicarbonato, o también por un exceso de sustancias ácidas (diferentes al bicarbonato).

Causas:

Diarrea extrema.

Insuficiencia renal.

Cetosis.

Medicamentos acidificantes.

b.- Alcalosis metabólica. Exceso de bicarbonato. El ión bicarbonato está aumentado al aumentar la reabsorción renal concomitante a la pérdida del ión cloruro o por la ingestión excesiva de bicarbonato.

Causas:

Vómito excesivo. (pérdida excesiva de ácido clorhídrico).

Pérdida de potasio. (terapia con rayos X, administración prolongada de soluciones sin K, hiperadrenocorticismos).

c.- Acidosis respiratoria. Exceso de ácido carbónico debido a hipoventilación.

**Causas:**

**Trastornos de la respiración que produce retención del bióxido de carbono:**

- Neumonía.
- Enfisema.
- Edema pulmonar.
- Neumotorax.
- Parálisis de los músculos respiratorios.
- Oclusión de las vías respiratorias.

d.- **Alcalosis respiratoria. Déficit de ácido carbónico debido a respiración hiperactiva que produce un aumento en la pérdida de bióxido de carbono por los pulmones.**

**Causas:**

**Aumento de la frecuencia y la profundidad de la respiración:**

- Fiebre.
- Falta de oxígeno.
- Estimulación del centro respiratorio.
- Tensión.

A) Determinación de cloro.

I.- Técnica de Schales y Schales (25,65,91,95,106)

a.- Fundamento.

Los iones de cloro se combinan con los iones mercurícos. El exceso de éstos reacciona con el indicador S-difenil-carbazona y dá una coloración violeta.

b.- Material y equipo.

Matraces volumétricos.

Pipetas graduadas de 1 ml y 5 ml.

Reactivo de S-difenil-carbazona al 1% (indicador).

Reactivo de nitrato mercúrico al 1.7%.

Reactivo de cloruro de sodio 10 mEq/l.

Material biológico: Suero.

c.- Método

- 1.- A 0.2 ml de suero añadir 1.8 ml de agua destilada y 4 gotas de reactivo indicador.
- 2.- Titular con el reactivo de nitrato mercúrico hasta la aparición de una coloración violeta pálido permanente.
- 3.- Para calcular la concentración de cloro en la muestra se deben multiplicar los ml utilizados en la titulación por el factor de conversión y se obtendrán mEq/l de cloro.

Nota:

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

- a) Poner 2.0 ml de cloruro de sodio 10 mEq/l en un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Añadir 0.06 ml de solución indicadora.
- c) Titular con la solución de nitrato mercúrico, hasta obtener coloración violeta.
- d) Dividir 100 entre el número de ml utilizados en la titulación del cloruro de sodio y se obtendrá el factor de conversión.

B) Determinación de sodio y potasio.

I.- Técnica de SIGMA (6).

a.- Fundamento.

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

b.- Material y equipo.

Fotómetro de flama Coleman.

Escala de lectura directa para sodio y potasio.

Matraz volumétrico.

Vasos de precipitado.

Pipetas graduadas.

Sterox al 1.0% y 0.02%.

Labtrol (solución para calibrar el flamómetro).

Material biológico: Suero.

c.- Método.

1.- Colocar 0.5 ml de suero en un matraz volumétrico de 50 ml y aforar con solución de Sterox al 0.02%.

2.- Marcar 4 matraces aforados de 10 ml de la siguiente manera:

P- Problema.

O- Solución blanco limpiadora inicial.

F- Solución limpiadora final.

St- Patrón. Solución 150 mEq/l de sodio y 5 mEq/l de potasio.

3.- Añadir reactivos de la siguiente manera:

	Vaso P	Vaso O	Vaso F	Vaso St
Sol. de suero diluido con Sterox (número 1)	10 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Sol. Sterox 0.02%	-----	9 ml	9 ml	-----
Sol. Patrón 150 mEq/l de Na y 5 mEq/l de K	-----	-----	-----	9 ml

- 4.- Conectar el fotómetro de flama y el espectrofotómetro con sus respectivas clavijas y uno de los dos aparatos introduciendo el cable que sale de la parte inferior del espectrofotómetro en el correspondiente enchufe del flamómetro situado en la parte posterior, introducir con la clavija ancha hacia arriba. Sacar 1.0 cm el portacubetas de plástico del espectrofotómetro, girar lentamente y depositar nuevamente en su compartimiento, debe quedar un poco afuera, asegurarse que no hay paso de luz, tapar y cerrar los controles del espectrofotómetro y flamómetro. Girar a la derecha 1/4 de vuelta de los botones para ajuste grueso y fino del espectrofotómetro; el círculo de luz que se encuentra en la reglilla lectora se moverá hacia la izquierda y desaparecerá de la vista si los aparatos se conectan correctamente. Colocar el filtro de sodio en la ranura para filtros del flamómetro.
- 5.- Abrir la toma de gas y encender. Inmediatamente abrir la toma de oxígeno y lentamente llevar hasta 1.0 Kg y regular la flama a fin de obtener un cono azul intenso de 1.0 cm de altura.
- 6.- Colocar el matraz "C" en el portamuestras del flamómetro, cerrar la puerta y atomizar dando la vuelta al pasador en el sentido de las manecillas del reloj.
- 7.- Con los controles para ajuste grueso y fino del flamómetro llevar el índice luminoso del espectrofotómetro a cero (extremo izquierdo de la escala).
- 8.- Sustituya el vaso "O" por el vaso "St" y atomice de la misma manera.
- 9.- Con los controles del espectrofotómetro ajuste el índice de la luz a los mEq del "St" del Na en la escala correspondiente de la reglilla.
- 10.- Comprobar que el ajuste ha sido correcto, atomizando varias veces los vasos "O" y "St" hasta que se tengan dos lecturas iguales.

- 11.- Una vez estabilizadas las lecturas, coloque el vaso "p" lea y anote la concentración de Na según la lectura de la escala de Na.
- 12.- Vuelva a atomizar los vasos "O" y "St" para asegurarse de que los ajustes no variaron y la determinación del vaso "p" fué correcta.
- 13.- Quitar el filtro de Na y poner en su lugar el filtro de K.
- 14.- Colocar en el portamuestras el vaso "O", atomizar y ajustar a cero de la escala con los controles del flamómetro.
- 15.- Sustituir por el vaso "St", atomizar y ajustar a los mEq del "St" de K en la escala correspondiente con los controles del fotómetro.
- 16.- Comprobar si el ajuste es correcto al atomizar varias veces los vasos "O" y "St".
- 17.- Comprobada la exactitud, colocar el vaso de la muestra en el portamuestras y atomizar.
- 18.- Leer y anotar la concentración de K según la escala.
- 19.- Atomizar nuevamente los vasos "O" y "St" para comprobar el ajuste y asegurar la exactitud de la lectura del vaso "p".
- 20.- Por último, atomizar el vaso "F" durante 30 segundos para limpiar el atomizador.
- 21.- Limpiar el atomizador con el capilar metálico que tiene dicha función, introduzcalo siempre por el orificio inferior.
- 22.- Para apagar el aparato, quitar el capuchón, girar la llave del oxígeno e inmediatamente cerrar el gas.

### C) Calcio.

El 99% del calcio total está concentrado en los huesos, donde constantemente se está movilizando. Se asimila por actividad osteoblástica, y se libera por actividad osteoclástica. Mediada por la actividad de la hormona paratiroidea, que fisiológicamente produce hipercalcemia (movilizando calcio de los huesos, aumentando la absorción de éste en el intestino, aumentando la resorción en el túbulo renal y produciendo fosfaturia), y la tirocalcitonina, secretada por la glándula tiroides que produce hipocalcemia fisiológica (con efectos antagónicos a la paratornoma).

El calcio en la sangre se encuentra en tres formas: ionizado, unido a proteínas y formando complejos. Aproximadamente el 45% de calcio sanguíneo se encuentra en forma ionizada y es esta parte la responsable de la actividad fisiológica en procesos de coagulación sanguínea, excitación neuromuscular, actividad enzimática y la calcificación ósea (7,70,99).

El calcio se elimina por el aparato digestivo y riñón.

I.- Técnica de Ferro-Ham (25,52,58,91,95).

#### a.- Fundamento.

El calcio se precipita cuantitativamente como cloranilato que se disuelve en EDTA sal tetrasódica, liberando cloranilato de sodio. El color producido por el cloranilato de sodio es directamente proporcional a la cantidad de calcio. La cantidad de calcio se calcula interpolando la curva patrón (de concentración conocida).

#### b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye 10 X 100 mm o tubo cónico de centrífuga.

Pipetas graduadas de 1 ml, 2 ml y 10 ml.

Papel filtro.

Centrífuga clínica.

Espectrofotómetro.

Reactivo de solución de calcio patrón (1 ml = 0.1 mg de Ca).

Reactivo de cloranilato de sodio.  
Reactivo de alcohol isopropílico.  
Reactivo de EDTA sal tetrasódica al 5%.  
Material biológico: Suero.

c.- Método.

	Problema	Patrón
Suero.	2 ml	--
Solución de calcio patrón.	--	2 ml
Cloranilato de sodio.	1 ml	1 ml

Los tubos que contienen proteína deben agitarse constantemente por rotación para disolver el precipitado de proteínas.

Dejar reposar los tubos 30 minutos.

Centrifugar a 1800 rpm durante 10 minutos.

Decantar el sobrenadante y dejar escurrir los tubos 2 ó 3 minutos sobre papel filtro.

Secar la boca del tubo con papel filtro o gasa.

Lavar el precipitado con 6 ó 7 ml de alcohol isopropílico, usando un chorro fino para levantar el precipitado que debe quedar suspendido en el reactivo.

Repetir el centrifugado y escurrimiento anterior (el sobrenadante puede ser turbio, debido a la presencia de proteínas, lo que no afecta a los resultados).

Añadir al precipitado 0.1 ml de agua destilada a los precipitados empacados.

Pegando vigorosamente al fondo del tubo contra la palma de la mano para desbaratar el paquete del precipitado y suspender en el agua.

Añadir a los tubos 6 ml de EDTA tetrasódico al 5%.

Tapar los tubos y agitar por inversión varias veces, hasta la disolución total del precipitado, evitando la formación de espuma.

Leer a 520 nm. ajustando el aparato a 100% de transmitancia con blanco de agua destilada, puede leerse inmediatamente o hasta después de 5 días.

Cálculo:

$$\frac{\text{D.O. Problema}}{\text{D.O. Patrón}} \times 10 = \text{mg \% de calcio.}$$

## Examen General de Orina (Urianálisis).

Por ser la orina el producto final de un proceso fisiológico complicado y delicadamente equilibrado, pueden influir en la constitución de la misma muchos mecanismos normales y patológicos.

Los riñones son los órganos principales de regulación del medio interno, con la orina como subproducto de esas actividades reguladoras. Para mantener la constancia de los líquidos extracelulares, y en menor grado de los intracelulares, los riñones participan en las siguientes actividades:

- Eliminación del agua formada o introducida en el organismo (en exceso), en mayor abundancia de la requerida para los procesos metabólicos normales.
- Eliminación de elementos inorgánicos de acuerdo con las necesidades hídricas y de equilibrio ácido-básico del organismo.
- Eliminación de los productos no volátiles finales de la actividad metabólica.
- Retención en el organismo de sustancias necesarias para el mantenimiento de las funciones normales. Dentro de esas sustancias se encuentran aminoácidos, hormonas, vitaminas, proteínas plasmáticas, glucosa y otras.
- Eliminación de ciertas sustancias tóxicas.
- Formación y excreción de elementos como iones hidrógeno y amoníaco.

Por todo lo anterior, los riñones son de gran importancia en la regulación del equilibrio del agua, electrolitos, el equilibrio ácido-básico y en conservación de la presión osmótica de los líquidos de la economía. También intervienen de modo importante en la eliminación de los productos de desecho, así como de ciertas sustancias tóxicas (7,24,26,61).

La unidad funcional del riñón es la nefrona, la cual consta de dos porciones funcionalmente distintas que son el glomérulo y el túbulo. A su paso por los glomérulos, la sangre pierde un filtrado plasmático libre de proteínas. Este filtrado en los

túbulos, se modifica por excreción, reabsorción y otras actividades no bien explicadas de las células epiteliales tubulares. el producto final de ese conjunto de actividades es la orina (61,70).

El análisis de este producto renal revela con frecuencia alteraciones típicas propias de alguna enfermedad del mismo órgano, pero incluso puede dar información de algunas alteraciones de otros procesos fisiológicos del organismo (61).

1) Colección de muestras de orina.

Es muy importante el lograr que las muestras de orina conserven "in vitro" las mismas características que presentan "in vivo".

Los recipientes para recolección de orina, deben estar limpios, ya sean frascos de vidrio o plástico. de preferencia cuando no se va a trabajar inmediatamente la muestra, deberán usarse recipientes plásticos opacos para evitar la degradación de algunos constituyentes.

Tiempo de recolección: La muestra obtenida en la primera micción matutina es la más adecuada para la realización del examen, ya que es mas probable que contenga los constituyentes de importancia diagnóstica, debido a que es la orina mas concentrada en los componentes disueltos en ésta, y el animal se encuentra en reposo, o en estado basal de un organismo.

La recolección puede obtenerse aprovechando la simple micción del animal, es recomendable en ocasiones la limpieza de vulva y prepucio con un antiséptico para evitar la contaminación de las muestras. En especies mayores puede provocarse la micción del animal abriendo una llave de agua frente al animal y rociando sus patas con agua mediante manguera (medio rústico pero efectivo en la mayoría de las ocasiones), en ovinos se puede provocar la micción mediante la obstrucción de la respiración tapando las fosas nasales con la mano durante algunos segundos. En pequeñas especies algunas veces no es posible provocar que el animal orine o esperar a que lo haga por sí solo, de modo que puede recurrirse al sondeo uretral o a la cistocentesis, los cuales, son

traumáticos y peligrosos pues pueden provocar uretritis o cistitis, además, por el sondeo pueden acarrear células de descamación en abundancia dando falsos resultados en el examen microscópico. Pueden utilizarse diuréticos inyectados para provocar la micción, pero en algunos trastornos renales su uso puede ser contraproducente.

Conservación de muestras: Se prefieren muestras recién emitidas debido a que si trabaja la muestra después de 8 horas sin conservador (aún en refrigeración), las bacterias normales del tracto genitourinario pueden degradar componentes químicos de la crina y alterar la morfología de lo que se observe en el examen microscópico.

Cuando se tarda 3 a 4 horas en realizar el examen se recomienda refrigerar la muestra a 4°C, para proceder a trabajar una muestra refrigerada debe volverse a temperatura ambiente.

Es en algunas ocasiones imposible trabajar la muestra inmediatamente, o no tenemos refrigerador, en esos casos podemos utilizar conservadores, aunque éstos pueden intervenir en pruebas químicas:

- Tolueno.- Se agrega cantidad suficiente del conservador para cubrir la superficie de orina del recipiente. Es antimicrobiano, cambia la cantidad de cetonas.
- Timol.- Un pequeño cristal para una muestra de 30 ml es suficiente. Conserva la muestra 24 horas. Bacteriostático, da resultados falsos positivos en glucosa en tiras reactivas. Produce falsos positivos en proteínas por el método del ácido sulfosalicílico.
- Formol.- Una gota de formol al 40% en 30 ml de orina. Previene crecimiento bacteriano, interfiere en la reacción de glucosa y proteínas. Preserva las células para el examen de sedimento urinario (7,24,26,58,80,99).

Las pruebas del examen general de orina se divide en:

- Físico.
- Químico.
- Microscópico de sedimento.

## II) Examen físico.

### A) Densidad o gravedad específica.

La densidad o gravedad específica de la orina, significa la relativa cantidad de sólidos en solución y en consecuencia, es indicativo de la capacidad renal para concentrar la orina y podemos relacionarla con algunas enfermedades renales (7,99,137).

#### a.- Métodos.

##### 1.- Urinómetro.

Colocar 10 a 20 ml de orina en una probeta u otro recipiente. El recipiente que se utilice deberá ser lo suficientemente grande para evitar que el fondo del urinómetro toque con el fondo de este recipiente y para evitar que toque las paredes. Se introduce el urinómetro y se hace un movimiento rápido de rotación para evitar que el urinómetro toque las paredes, tomar la lectura en el lugar del urinómetro que quede a la altura del menisco de orina en la probeta, observándolo en una posición horizontal (7,26,137).

##### 2.- Refractómetro de Goldberg.

Se coloca una pequeña cantidad de orina en el prisma del refractómetro por capilaridad hasta que quede completamente abarcada la zona del prisma. Se observa a contra luz y el resultado se lee observando en la escala de la izquierda (76,91).

### B) Olor.

En general el olor no tiene valor diagnóstico específico, solo en algunos cambios patológicos según la especie se notará claramente la alteración en el olor característico de la orina del animal (sui generis).

### C) Color.

Se observará en un recipiente transparente y será reportado según el color observado y su tonalidad (intensidad), el color amarillo depende de la cantidad de urocromos.

### D) Aspecto o transparencia.

Se reporta como clara, turbia o floculenta tras la observa-

ción a simple vista.

E) Volumen.

Se refiere a la cantidad de orina excretada por un animal durante 24 horas, y es medida en una probeta (puede referirse al volumen remitido para el análisis) (7,26,99).

III) Examen químico.

A) pH.

I.- Tira de papel phyrion.

a.- Fundamento.

El pH de la orina es generalmente reflejo de la capacidad del riñón para mantener una concentración normal de hidrogeniones en el plasma y en el líquido extracelular.

b.- Método.

Se moja el papel en la orina, introduciéndolo en el recipiente que la contenga, se quita el exceso y se compara con el cuadro de colores (7).

B) Proteína.

Prueba cualitativa.

En condiciones normales la orina no contiene ninguna proteína, pues la pequeña cantidad que pueda pasar por el filtro glomerular se reabsorbe en los túbulos. En consecuencia su hallazgo traduce siempre un estado patológico (a excepción de parto, neonatos y ciclo estral).

I.- Prueba de Robert.

En un tubo de ensaye colocar 2 ml de reactivo de Robert y añadir 2 ml de orina (si la orina es turbia, centrifugar 5 minutos a 1000 rpm), la formación de un anillo blanco en la zona de contacto indica la presencia de proteína. El reporte se hace de una a cuatro cruces.

Negativo - no hay anillo en la zona de contacto.

Trazas - anillo escasamente perceptible.

+ - anillo angosto preciso.

++ - anillo amplio definido.

+++ - anillo amplio.

++++ - anillo denso y muy grueso (7,26,37,81).

## II.- Prueba con ácido sulfosalicílico.

Colocar en un tubo de ensaye 2.5 ml de orina filtrada o centrifugada, añadir 7.5 ml de reactivo de ácido sulfosalicílico, mezclar por inversión suavemente y se estima la cantidad de proteínas por el grado de turbidez.

### Prueba cualitativa.

<u>+</u>	- Turbidez tenue.
+	- Turbidez ligera.
++	- Turbidez moderada.
+++	- Turbidez fuerte.
++++	- Turbidez total, impide el paso de la luz (7,26, 137).

## C) Glucosa.

### Prueba cualitativa.

En la orina normal no hay glucosa. Aunque este azúcar pasa fácilmente por los glomérulos, su reabsorción es completa en los túbulos. Por otra parte, si la concentración es excesiva en la sangre, por encima del umbral normal de reabsorción, hay glucosuria, la presencia de glucosa es anomalía manifiesta, su examen deberá ser incluido en todo examen de orina.

### I.- Prueba de Benedict.

#### a.- Fundamento.

Los azúcares reductores de la orina reaccionan con el sulfato de cobre alcalino y reducen los iones cúprico a cuproso, dando color dependiendo de la cantidad de azúcares reductores presentes.

#### b.- Método.

Colocar 2 gotas de orina en un tubo de ensaye y añadir 1 ml de reactivo de Benedict, colocar el tubo en baño maría hirviendo durante 2 minutos. Dejar enfriar, estimar la coloración:

<u>+</u>	- Cambio de azul a verde con ligero sedimento amarillo.
+	- Similar a la anterior, con mayor sedimento.
++	- Cambio a color amarillo con gran sedimento.
+++	- Cambio a amarillo con gran sedimento rojizo. (7,26,128).

#### D) Cuerpos cetónicos.

##### Prueba cualitativa.

Los cuerpos cetónicos incluyen la acetona, el ácido acetoacético y ácido beta-hidroxibutírico. Un estado en el cual estas sustancias se encuentran presentes en exceso en la sangre y en la orina, se conoce como cetosis. Los ácidos anteriormente mencionados de los cuales se deriva la acetona, son productos intermedios normales del metabolismo de las grasas. Cuando se metabolizan mayores cantidades de ácidos grasos con el aumento subsecuente de ácido acetoacético y beta-hidroxibutírico, éstos en exceso no pueden ser oxidados, acumulándose en sangre y excretándose en orina. La cetosis se desarrolla en cualquiera de los estados clínicos de deficiencia en el metabolismo de los carbohidratos.

##### I.- Prueba de Rothera.

###### a.- Fundamento.

La acetona y el ácido acetoacético y en menor intensidad el ácido beta-hidroxibutírico, reaccionan con el nitroprusiato sódico para producir un color púrpura.

###### b.- Método.

Poner 5 gotas de orina en una superficie limpia y agregar aproximadamente 0.5 g de reactivo de Rothera. Un color púrpura indica la presencia de acetona, se reporta de una a cuatro cruces.

<u>+</u>	- Color escasamente perceptible.
+	- Color definido ligero.
++	- Color moderado.
+++	- Color fuerte.
++++	- Color púrpura oscuro o negro en la totalidad del tubo (6,7,26,137).

#### E) Sangre.

##### Prueba cualitativa.

En la prueba se pueden encontrar resultados positivos debido a: hematuria, sangre completa con presencia de eritrocitos completos que indica generalmente daño en el aparato genitourina-

rio; la hemoglobinuria, en estos casos no hay ocurrencia de eritrocitos, pero si de hemoglobina y generalmente se debe a hemólisis producida por diversas causas, en la mayoría de los casos ajeno a daño renal; la mioglobinuria (azoturia de los equinos), este compuesto dá una coloración café a la orina (en ocasiones negruzca), sin hallazgo de eritrocitos intactos en el sedimento urinario.

I.- Prueba del piramidón.

a.- Fundamento.

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

b.- Método.

Colocar 5 ml de orina en un tubo de ensaye y agitar, añadir unas gotas de ácido acético al 5%, añadir 1 ml de solución alcohólica de piramidón al 5% y agitar, añadir unas gotas de peróxido de hidrógeno al 15% y estimar la coloración:

- Ningún cambio de color.
- + Azul apenas perceptible.
- + Azul claro.
- ++ Azul intensidad media.
- +++ Azul intenso.
- ++++ Azul obscuro (6,7,18,137).

F) Bilirrubina.

Prueba cualitativa.

La bilirrubina debe conjugarse en hígado para pasar a bilis normalmente. La bilirrubina conjugada puede pasar a la orina por acúmulo excesivo en sangre, puede ser debida a enfermedad hepatocelular, obstrucción de conductos biliares y en ictericia hemolítica (asociada a casos de daño hepático severo).

I.- Prueba de Fouchet.

a.- Fundamento.

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

b.- Método.

Colocar 20 ml de orina en un vaso de precipitado, añadir

10 ml de cloruro de bario al 10% (para precipitar proteínas). Mezclar y dejar reposar 5 minutos, filtrar, añadir unas gotas de reactivo de Fouchet al precipitado, estimar la coloración:

-	- No hay cambio de color.
+	- Verde apenas perceptible.
+	- Verde claro.
++	- Verde de intensidad media.
+++	- Verde intenso.
++++	- Verde obscuro.

## II.- Prueba de la espuma.

### a.- Método.

Agitar vigorosamente varios mililitros de orina en un tubo de ensaye. El pigmento biliar le confiere color amarillo-verde o café a la orina y a la espuma formada (6,7,24,26).

### G) Urobilinógeno.

El urobilinógeno se elimina en condiciones normales por orina pudiendo estar aumentada su eliminación (debido a hepatitis, ictericia hemolítica) o disminuída (debido a obstrucción biliar, diarreas severas y en ocasiones en nefritis acompañada de poliuria).

Prueba cualitativa.

#### I.- Prueba de Ehrlich.

##### a.- Fundamento.

El urobilinógeno dá un color rojo al reaccionar con el p-dimetilamino benzaldehído.

##### b.- Método.

A 10 ml de orina recién emitida agregar 1 ml de reactivo de Ehrlich. La presencia de urobilinógeno se revela por el desarrollo de un color rojo.

Hacer diluciones de orina en agua destilada de la siguiente forma:

1 ml de orina a 19 ml, 29 ml, 39 ml, 49 ml, 99 ml, 149 ml de agua destilada.

Añadir 1 ml de reactivo de Ehrlich a 10 ml de cada una de las diluciones.

Esperar 5 minutos y anotar el último tubo en el que se produzca color.

Interpretación:

Color:

Normal hasta dilución 1:50.

Aumentado dilución 1:60 ó más.

Disminuido dilución 1:40 ó menos (7,26,137).

H) Calcio.

Prueba cualitativa.

I.- Técnica de Sulkowich.

a.- Fundamento.

El calcio de la orina se precipita como oxalato de calcio insoluble.

b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye 10 X 100 mm.

Pipeta graduada de 10 ml.

Reactivo de Sulkowich.

c.- Método.

	Tubo problema	Tubo patrón
orina	5 ml	5 ml
agua destilada	--	5 ml
reac. Sulkowich	5 ml	--

Se comparan los tubos de ensaye inmediatamente contra luz y nuevamente a los 30 minutos.

Interpretación:

El tubo problema se interpreta de la siguiente manera:

Bajo - No hay precipitado visible.

Normal - Nube fina o pequeño precipitado.

Alto - Precipitado blanco grueso (7,26,99).

I) Prueba con tira de papel múltiple (101).

Existen en el mercado tiras reactivas que incluyen varias pruebas para el urianálisis. Son tiras de plástico con porciones impregnadas con reactivos, las instrucciones de uso varían según el fabricante. Las determinaciones que contienen estas tiras son las de mayor utilidad en el diagnóstico clínico: pH,

glucosa, proteínas, cuerpos cetónicos, bilirrubina, sangre y urobilinógeno.

a.- Fundamentos.

pH. La mezcla de los colorantes rojo metilo y azul de bromotímol permite obtener determinaciones de pH entre 5 a 9, con coloraciones que varían en tonalidades de amarillo a azul, en relación al pH de la muestra.

Proteínas. El indicador azul de tetrabromofenol tiene una coloración amarilla, en presencia de proteínas el reactivo cambia de color desde el verde amarillo a azul verde, dependiendo de la concentración de proteínas en la orina.

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

Cuerpos cetónicos. El ácido acético con nitroprusiato sódico y en presencia de ácido aminoacético forma un complejo colorido, color púrpura proporcional a la concentración de cetonas presentes.

Sangre. La sangre catalíticamente desdobra el peróxido de hidrógeno con liberaciones de oxígeno, el cual oxida a la ortotoluidina, con la formación de un color azul.

Bilirrubina. La bilirrubina reacciona con la dicloroalanina 2, 4 diazotilo para formar azobilirrubina y la zona impregnada con el reactivo cambia de color dependiendo de la cantidad de bilirrubina presente de ante claro a café claro.

Urobilinógeno. El método se basa en la reacción de Ehrlich del reactivo con el urobilinógeno de un medio fuertemente ácido para formar un color rojizo.

b.- Método.

Se sumerge la tira en la orina, se elimina el exceso golpeando la tira contra el frasco suavemente y se leen las pruebas comparando con la carta de colores, el tiempo de lectura

para cada prueba es el siguiente:

- pH. El tiempo no es crítico, puede leerse de inmediato.
- Glucosa. 30 segundos.
- Proteínas. El tiempo no es crítico puede leerse de inmediato.
- Cuerpos cetónicos. 15 segundos.
- Sangre. 15 segundos.
- Bilirrubina. 20 segundos.
- Urobilinógeno. 45 segundos.

Interpretación.- Las diferentes reacciones pueden darnos los siguientes resultados, dependiendo del cambio de color obtenido y su comparación con la carta de colores.

- pH. Prueba cuantitativa. pH entre 5.0 y 9.0.
- Proteínas. Semicuantitativo. Negativo, trazas, 30, 100, 300, 2000 ó más mg/dl.
- Glucosa. Semicuantitativo. Negativo, 100, 250, 500, 1000, 2000 ó más mg/dl.
- Cuerpos cetónicos. Semicuantitativa. Negativo, 5, 15, 40, 80, 160 mg/dl.
- Bilirrubina. Cualitativo. Negativo, bajo, moderado o alto.
- Sangre. Cualitativo. Negativo, trazas no hemolizadas, trazas hemolizadas, bajo, moderado o alto.
- Urobilinógeno. Semicuantitativo. Normal (0.1-1 U. Ehrlich/dl), alto (2, 4, 8, 12 ó más U. Ehrlich/dl).

También existen en el mercado tiras reactivas y tabletas para cada una de las reacciones anteriores, son utilizadas por separado cuando no son necesarias todas las pruebas anteriormente citadas; ejemplo de ellas son:

- pH. Tiras de papel pH hidrión.
- Glucosa. Tabletetas reactivas Clinitest y tiras reactivas Clinistix y test-tape.
- Cuerpos cetónicos. Tiras reactivas Ketostix y Cetodiasstix, y tabletetas reactivas Cetotest.
- Sangre. Tiras reactivas Hemastix y tabletetas reactivas Hematest.

- Bilirrubina. Tiras reactivas Ictostix y tabletas reactivas Ictotest.
- Urobilinógeno. Tiras reactivas Urobilistix.

Cada una de ellas se utilizan según las instrucciones del fabricante.

J) Indican.

Prueba cualitativa.

I.- Prueba de Obermayer.

a.- Fundamento.

El indican es derivado del indol, el cual es un producto del metabolismo bacteriano de las proteínas en el intestino, el indol es absorbido a la sangre y es oxidado en el hígado a indoxil, el cual se combina con sulfato de potasio para formar indican (sulfato de potasio de indoxil), producto que es eliminado por orina. El reactivo de Obermayer oxida el indican a azul índigo, el cual se extrae en la capa de cloroformo confiriéndole un color azul.

b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye 10 X 100 mm.

Reactivo de Obermayer.

Cloroformo.

Cloruro férrico 2 g.

c.- Método.

Colocar 5 ml de orina y 5 ml de reactivo de Obermayer en un tubo de ensaye. Mezclar el tubo varias veces y añadir 2 ml de cloroformo. Dejar sedimentar el cloroformo en el fondo del tubo.

Interpretación:

Un color azul en la capa de cloroformo indica la presencia de indican.

Negativo	- Sin color.
+	- Azul pálido.
++	- Azul intenso medio.
+++	- Azul obscuro.
++++	- Negro (26,37,128).

IV) Examen microscópico del sedimento urinario.

a.- Fundamento.

El examen del sedimento urinario es una prueba microscópica de laboratorio accesible y económica, que nos dá información útil para llegar al diagnóstico y pronóstico, principalmente enfocado a problemas del tracto urinario (18,27).

b.- Material y equipo.

Tubo cónico de centrífuga.

Centrífuga clínica.

Microscopio.

Portaobjetos y cubreobjetos.

Pipeta Pasteur.

Colorante: Nuevo azul de metileno, Sternheimer-Malbin o Wright.

Material biológico: Orina.

c.- Método.

1.- Colocar 5 a 10 ml de orina mezclada (de preferencia recién emitida y sin conservador) en un tubo cónico de centrífuga.

2.- Centrifugar de 1 a 3 minutos a 1500 rpm.

3.- Decantar el sobrenadante conservando en el tubo aproximadamente 0.5 ml de volumen.

4.- Resuspenderlo removiendo con una pipeta Pasteur.

5.- Se puede añadir al tubo colorante (cualquiera de los tres arriba mencionados), que perfecciona la identificación de ciertas estructuras de la orina.

6.- Colocar una gota con la pipeta Pasteur en un portaobjetos, sobre cuyo material se aplica un cubreobjetos. La gota será del tamaño conveniente, sin exceso que haga flotar el cubreobjetos, ni tan escasa que no se extienda por completo debajo del mismo.

7.- Se coloca al microscopio y se recomienda utilizar el objetivo seco débil (10 X), y con luz tenue debido a que en ocasiones el índice de refracción de los elementos formados del sedimento es similar al medio que los rodea.

8.- Para evaluar la morfología de los elementos se utiliza el objetivo seco fuerte (40 X) (7,24,26,80,91,99).

Interpretación:

- 1.- Células epiteliales. Son células del tracto urinario.
  - a).- Células epiteliales escamosas. Son las células mayores del tracto urinario, de contorno irregular con un pequeño núcleo redondo y se derivan de la cara superficial de la uretra y vagina.
  - b).- Células epiteliales transitorias. Son de diversas formas, de tamaño mediano con núcleo pequeño, se derivan de parte de la uretra, vejiga, ureteres y pelvis renal.
  - c).- Células epiteliales renales. Son células pequeñas, redondas, con un solo núcleo, son de difícil observación debido a que provienen del epitelio renal y degeneran antes de llegar a la orina, generalmente solo se observan incluidas en cilindros.

Las células epiteliales escamosas pueden encontrarse en grandes cantidades especialmente en muestras de hembras. Las células epiteliales transitorias normalmente se encuentran en muy pequeñas cantidades y las epiteliales renales se encuentran solo en casos de nefritis intersticial aguda.

- 2.- Eritrocitos. La cantidad de estas células en el sedimento urinario es muy variable. La morfología variará en relación a la osmolaridad urinaria y pH. Así por ejemplo, en orinas de una gravedad específica de 1.025, los eritrocitos son de color amarillo pálido y redondeados. En orinas muy concentradas pueden encontrarse crenados y distorcionados, mientras que en orinas diluidas se observan hinchados y redondeados. Sin embargo su investigación puede apoyarse con la prueba química de sangre en orina (7,18,26,48,57,80,104).
- 3.- Leucocitos. La cantidad de éstos también es variable, en orinas frescas aparecen como células esféricas un poco mayor que los eritrocitos, puede distinguirse el núcleo, pero en ocasiones está degenerado (7).
- 4.- Cilindros. Son estructuras cilíndricas organizadas, su nombre deriva de la forma que presentan. Un cilindro real de la luz tubular se forma básicamente por mucoproteínas, en la

luz de los túbulos distales y colectores renales, es aquí donde la orina alcanza su concentración y acidez máxima, lo cual favorece la precipitación de proteínas. Así entonces, los cilindros no son encontrados comunmente en orinas alcalinas. El hallazgo de un elevado número de cilindros en el sedimento urinario es indicativo de daño tubular. Los cilindros no son un índice de la función renal, pero puede servir para localizar la lesión.

La mucoproteína incorpora cualquier tipo de material que se encuentre en los túbulos al momento de ser secretada. Es por ésto que los cilindros se clasifican de acuerdo a su aspecto y contenido en: hialinos, epiteliales, granulares, céreos, grasos, eritrocíticos, leucocitarios y mixtos.

Es acertado que los cilindros epiteliales granulares, céreos y grasos, representan los diferentes tipos de degeneración celular para convertirse en cilindros. Los cilindros epiteliales contienen células epiteliales descamadas que aún no se han desintegrado. Como resultado de la degeneración, el margen celular desaparece y el núcleo se desintegra apareciendo gránulos gruesos en su interior (cilindros granulados), concluyendo esta degeneración en la formación de un material incoloro, homogéneo con aspecto ceroso (cilindros céreos), por digestión total de la célula.

Los cilindros hialinos se componen de mucoproteínas, incoloro, transparentes, por lo general redondeados, para observarlos se recomienda la tinción de la muestra, con los colorantes antes recomendados.

Los cilindros granulares son cilindros que contienen gránulos finos o gruesos que derivan de la desintegración de células tubulares, aunque también de la degeneración de leucocitos.

Los cilindros epiteliales se encuentran en hileras de células epiteliales, se forman de células descamadas del recubrimiento epitelial de los túbulos renales.

Los cilindros céreos son de color amarillo o gris (mas

amplios), que los hialinos y generalmente con los extremos cuadrados.

Los cilindros de eritrocitos generalmente aparecen en hemorragia de los túbulos renales, si la orina es fresca tiene un color naranja rojizo, este color con el tiempo se desvanece y los eritrocitos se desintegran. Los cilindros se pueden pigmentar cuando hay gran cantidad de bilirrubina (7,27,57,80,104).

Los cilindros leucocitarios están formados por leucocitos incorporados en una matriz de mucoproteína, indicando un proceso inflamatorio, aunque pueden degenerar en cilindros granulados (127).

- 5.- Cristales. Los cristales en el sedimento tienen un valor diagnóstico limitado, ya que éstos son elementos normales en el sedimento. Estos podemos dividirlos en 2 categorías; aquellos que se observan en orina alcalina y los que se encuentran en orina ácida. Los anormales resultan de alteraciones del metabolismo (generalmente proteícos).

Los cristales comunmente observados en orina alcalina en condiciones normales son los de: fosfatos triples (amonio, magnesio), carbonato de calcio, fosfatos amorfos y de calcio y uratos de amonio. Los cristales comunmente encontrados en orina ácida en condiciones normales son los de: ácido úrico, uratos amorfos, oxalato de calcio y ácido hipúrico.

Los cristales de leucina y de tirosina se encuentran en enfermedad hepática aguda y los cristales de ácido úrico indican un trastorno en el metabolismo de las proteínas y pueden producir cálculos de ácido úrico.

- 6.- Pueden encontrarse otros hallazgos, como la presencia de hongos y levaduras, bacterias (pueden encontrarse con objetivo seco fuerte 40 X). Y mediante tinción con Sudan III, pueden observarse gotas de grasa.

Parásitos.- Huevos de Dictophyma renale y de Capillaria plica.

Espermatozoides (hallazgo normal), cuerpos extraños (te-  
la, materia fecal, algodón, alimentos, etc.) (7,24,48,57,  
80,99).

La evaluación de los elementos anteriores se reporta  
(después del examen realizado) de la siguiente manera:

evaluación por cruces:

+	- 1 a 5
++	- 5 a 10
+++	- 10 a 25
++++	- 25 ó más por campo.

Todo ello de un promedio de 5 campos.

Preparación de reactivos utilizados en las pruebas del examen general de orina anteriormente citadas (6).

a) Reactivo de Robert.

Sulfato de magnesio	76 g.
Acido nítrico	20 ml.
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

b) Acido acético al 5%.

Acido acético glacial	50 ml.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

c) Reactivo de ácido sulfosalicílico.

Acido sulfosalicílico	30 g.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

d) Reactivo de Benedict.

Sulfato de cobre	17.3 g.
Citrato de sodio	175.0 g.
Carbonato de sodio	100.0 g.
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml.

Disolver el citrato y el carbonato por separado, disolver el sulfato de cobre, mezclar las dos soluciones y aforar.

e) Reactivo de Rothera.

Nitroprusiato de sodio	10 g.
Sulfato de amonio	200 g.
Carbonato de sodio	200 g.

Mezclar en mortero, con espátula (no usar mano de mortero).

f) Piramidón al 5%.

Piramidón	5 ml.
Alcohol etílico al 96% c.b.p.	1000 ml.

g) Solución de cloruro de bario al 10%.

Cloruro de bario	10 g.
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

h) Reactivo de Fouchet.

Acido tricloroacético	25 g.
Sol. de cloruro férrico al 10%	10 ml.
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

i) Reactivo de Ehrlich.

P-dimetilaminobenzaldehído 2 g.  
Acido clorhídrico, diluido a la  
mitad con agua destilada c.b.p. 100 ml.  
Disolver y conservar a 4° C la solución.

j) Reactivo de Sulkowich.

Acido oxálico 2.5 g.  
Oxalato de amonio 2.5 g.  
Acido acético glacial 5.0 ml.  
Agua destilada c.b.p. 150.0 ml.

k) Reactivo de Obermayer.

Acido clorhídrico concentrado 1000 ml.  
Cloruro férrico 2 g.

### 3.- HEMATOLOGIA.

La sangre es un líquido rojo, claro y de composición variable que circula a través de los vasos sanguíneos del organismo. Participa en las actividades fisiológicas y patológicas de todos los órganos y está compuesta de un líquido, llamado plasma, en el que se encuentran suspendidos los eritrocitos, leucocitos, trombocitos y otras sustancias (54,55,130).

La hematología estudia la parte morfológica de la sangre, y se ocupa de la total interacción de los sistemas vascular y hematopoyético (87).

Cuando la sangre se coagula, la aglutinación de proteínas plasmáticas forman una porción líquida llamada suero, transparente o ligeramente amarillento, compuesto por sales inorgánicas, coloides (proteínas en alta dispersión), y principalmente de agua, carente de fibrinógeno, lo que lo diferencia del plasma el cual sí contiene fibrinógeno (16).

Los elementos celulares sanguíneos son los siguientes:

1.- Eritrocito: Llamado también glóbulo rojo o hematíe.

Es una célula que en los mamíferos es discoide elástica, bicóncava o plana (según la especie), y anucleada que normalmente se encuentra en la periferia de la luz de los vasos sanguíneos. Tiene un promedio de vida de 62 a 156 días dependiendo de la especie y un color anaranjado, rosado o rojo (con tinción Wright).

La principal función del eritrocito es el transporte de oxígeno a los tejidos del organismo mediante la hemoglobina contenida en él (68,70,85,117).

2.- Leucocito: Llamado también glóbulo blanco.

Es una célula nucleada, se encuentra en sangre periférica con un rango de vida muy variable. Estas células se dividen o clasifican en:

- Células polimorfonucleares:  
(Granulocitos)

Neutrófilos.  
Eosinófilos.  
Basófilos.

- Células mononucleares:                    { Linfocitos.  
  { Monocitos.  
  { (Agranulocitos)

Cada tipo de leucocito juega un determinado papel en la defensa del organismo frente a la enfermedad mediante sus propiedades de diapedesis, quimiotaxis, movimiento amiboideo, fagocitosis y producción de sustancias (68,117).

3.- Trombocito: Llamado también plaqueta.

Es un fragmento morfológicamente irregular, producto de una porción citoplasmática de los megacariocitos, tiene un promedio de vida de 8 a 11 días, mide de 2 a 5 micras, constituye parte de un mecanismo hemostático muy importante.

Obtención de muestras sanguíneas para biometría hemática (7,26,41).

1.- Lugar de extracción de muestras sanguíneas mas recomendable para las diferentes especies, así como, calibre de las agujas recomendadas (según el lugar de obtención y especie).

Equino.- Vena yugular; aguja 16, 18.

Bovino.- Vena yugular, coccigea y mamaria; aguja 16, 18.

Canino.- Venas cefálica, safena y yugular; aguja 20, 21, 22.

Felino.- Venas cefálica, safena y yugular; aguja 20, 21, 22.

Porcino.- Vena yugular; aguja 16. Golfo de la yugular; aguja 21.

Ovinos y Caprinos.- Venas yugular, cefálica y safena; aguja 18, 19 (7,24,99,117).

2.- La obtención sanguínea debe hacerse por venipuntura con una aguja y jeringa secas, a la punción de la vena aparecerá en la aguja una gota de sangre, se procede a la extracción mediante presión negativa, sacando el émbolo de la jeringa lentamente (para evitar hemólisis), hasta obtener la cantidad de sangre necesaria, para biometría hemática se recomiendan 5 ml. (La sangre puede obtenerse directamente de la punción con la aguja recolectándola en un tubo con anticoagulante).

Una vez hecha la extracción, inmediatamente deberá quitarse la aguja de la jeringa, deslizando la sangre lentamente por las paredes del tubo de recolección que deberá tener la dosis ne-

cesaria de anticoagulante, una vez vaciada toda la sangre, se mezcla lentamente, ya sea por rotación o inversión, pero nunca se deberá agitar. Si los estudios no se realizan de inmediato, guardar la muestra en refrigeración (26,58).

3.- Errores que deben evitarse ante la extracción de sangre:

a) Hemólisis. Puede ser producida por utilizar jeringas húmedas, obstruidas, despuntadas, en general agujas en mal estado.

b) No retirar la aguja antes de llenar los tubos de recolección, y retirar la sangre de la jeringa con mucha presión.

c) La muestra debe obtenerse cuando el animal está en absoluto reposo.

d) Cantidad de anticoagulante: Menor cantidad permitirá la formación del coágulo, mayor cantidad producirá hemólisis.

e) Cantidad de muestra. Debe ser la necesaria para las pruebas solicitadas. Para biometría hemática se recomiendan 5 ml.

f) Entre más tiempo se deje la sangre antes de examinarla, mayor será su deterioro.

g) Puede haber lipemia si no hay ayuno adecuado antes de la extracción de sangre (aproximadamente 4 horas de ayuno mínimo) (7).

La biometría hemática no se realiza como una prueba específica de una enfermedad, sino como una ayuda para el médico clínico, ya que la sangre se encuentra en íntima relación con el organismo y alguna alteración sufrida en él, puede desencadenar un cambio significativo en los resultados de laboratorio, en una o varias pruebas de la misma.

La biometría hemática consta de las siguientes pruebas: hemoglobina, hematocrito, conteo de glóbulos blancos y glóbulos rojos, frotis sanguíneo y velocidad de sedimentación globular (7,22,26,87,116).

Cuadro 1.- ANTICOAGULANTES.

PRODUCTO	MODO DE ACCION	CANTIDAD NECESARIA PARA 10 ml DE SANGRE	VENTAJAS	DESVENTAJAS
EDTA (sales de K o Na de ácido tetraacético de etilendiamina, Versate, Versene Sequestrene).	Forma sales insolubles de Ca.	10-20 mg (1 ml de solución al 1% secada a temperatura ambiente o en incubadora).	Excelente para preservar el poder por 6 horas, se recomienda para los procedimientos hematológicos de rutina; preserva los elementos celulares mejor que la heparina o los oxalatos.	La EDTA de sal de Na es menos soluble que la de K, por eso se recomienda la sal dipotásica; más de 2 mg hace que las células se arrugue.
Heparina.	Antitrombina y antitromboplastina.	1-2 mg (0.2 ml de solución al 1%); se puede humedecer la jeringa y la aguja con la solución estéril concentrada (10 mg/ml).	Menor efecto en el tamaño y hemólisis de los eritrocitos; se usa para el análisis de gases sanguíneos.	Puede producir amontonamiento de los leucocitos, no está indicado para hacer frotis porque interfiere con la tinción de los leucocitos; es costosa, no evita la coagulación por más de 8 horas, no

ANTICOAGULANTES (CONTINUACION).

PRODUCTO	MODO DE ACCION	CANTIDAD NECESARIA PARA 10 ml DE SANGRE	VENTAJAS	DESVENTAJAS
				es adecuada para pruebas de aglutinación ni del tiempo de protrombina.
Citrato de sodio.	Se combina con el Ca para formar una sal insoluble de citrato de calcio.	10-20 mg; para algunos estudios de coagulación, una parte de solución al 3.8% y 9 partes de sangre.	Puede usarse para transfusiones de sangre.	Interfiere con muchas pruebas químicas; evita la coagulación por unas cuantas horas; encoge las células.
Oxalato de K, Na y Li.	Se une con el Ca para formar oxalato de calcio insoluble.	20 mg o 2 gotas de solución al 20% secada en incubadora o en el horno a 55° C (el sobrecalentamiento convierte los oxalatos en carbonatos).	Muy soluble. El oxalato de Li es mas soluble que el de Na y K. El oxalato de Na se usa principalmente para el tiempo de protrombina.	Produce un encogimiento del volumen celular del 6 al 8% por lo tanto, interfiere en el lit y la cuenta diferencial; en exceso interfiere con la precipitación de las proteínas;

ANTICOAGULANTES (CONTINUACION).

PRODUCTO	MODO DE ACCION	CANTIDAD NECESARIA PARA 10 ml DE SANGRE	VENTAJAS	DESVENTAJAS
				niveles de glucosa muy bajos; altera la distribución electrolítica; es tóxico.
Oxalato de amonio y potasio (oxalato doble de Heller y Paul).	Se une con el Ca para formar oxalato de calcio insoluble.	1 ml o 20 mg secados a temperatura no mayor de 60° C (1.2 g de oxalato de amonio, 0.8 g de oxalato de potasio, 100 ml de agua destilada).	Puede usarse para la mayoría de los estudios hematológicos; produce menos distorsión y hemólisis de los eritrocitos que otros oxalatos.	El oxalato de potasio encoge los eritrocitos, mientras que el oxalato de amonio los hincha; no puede usarse para las determinaciones del NUS.
Fluoruro de sodio y timol (10:1).	Forma un componente de Ca débilmente disociado.	100 mg. de fluoruro de sodio y 10 mg de timol.	Anticoagulante y preservativo; excelente preservativo para la glucosa sanguínea ya que interfiere con el sistema enzimático	Interfiere con los métodos enzimáticos para la glucosa y el NUS (ureasa); el timol produce valores elevados en la determinación de hemoglobina por el

ANTICOAGULANTES (CONTINUACION).

PRODUCTO	MODO DE ACCION	CANTIDAD NECESARIA PARA 10 ml DE SANGRE.	VENTAJAS	DESVENTAJAS
			que participando en la glucólisis.	método del ferricianuro.

tomado de Benjamin, M.M. 1984 (7).

#### A) Hemoglobina (Hb).

La hemoglobina es una cromoproteína compuesta de una fracción prostática que es el grupo hem y una fracción protéica que es la globina. El grupo hem está compuesto por hierro en estado ferroso y pigmentos de tipo porfirínico, representa el 4-5% de la molécula. La globina es una proteína con estructura cuaternaria, de bajo peso molecular, que contiene gran cantidad de histidina y lisina, representa el 95% de la molécula. La capacidad que tiene la hemoglobina para captar oxígeno depende de la presencia de hierro en estado ferroso y de la estructura de la globina (54,55,70).

La síntesis de la hemoglobina se inicia en el proeritoblasto y continúa hasta la fase de los reticulocitos en donde termina.

Esta cromoproteína es la encargada del transporte de oxígeno de los pulmones a los tejidos y el CO<sub>2</sub> de los tejidos a los pulmones, por medio de la circulación sanguínea. La magnitud de este intercambio gaseoso es directamente proporcional a la concentración de hemoglobina en sangre (en estados patológicos de adición de otros gases como el monóxido de carbono se rompe esta regla). Por consiguiente, su determinación, es el procedimiento directo para estimar la eficiencia de la circulación sanguínea en este aspecto (7,26,70,85,99,132).

I.- Técnica de cianometahemoglobina (16,22,40,91,99,139).

##### a.- Fundamento.

El ferrocianuro convierte el hierro de la hemoglobina del estado ferroso al férrico formando metahemoglobina. La metahemoglobina se combina con el cianuro de potasio para producir el pigmento estable cianometahemoglobina.

##### b.- Material y equipo.

Espectrofotómetro.

Cubeta de 1 cm<sup>3</sup> a 3 cm<sup>3</sup>.

Pipeta de Sahli.

Tubo de ensaye 12 X 100 mm.

Pipeta graduada de 5 ml.

Reactivo de Drabkin.

Material biológico: sangre con anticoagulante.

c.- Método.

- 1.- Colocar en un tubo de ensaye 5 ml de reactivo de Drabkin.
- 2.- Agregar 0.02 ml ( $20\mu\text{l}$ ) de sangre con anticoagulante (con pipeta de Sahli, ésta contiene una graduación exacta de los  $20\mu\text{l}$ ).
- 3.- Mezclar por inversión y dejar reposar 5 a 10 minutos.
- 4.- Leer contra blanco de reactivo a 540 nm de longitud de onda.
- 5.- Cálculos:

Realizar la curva de calibración:

Colocar 3 tubos y añadir:

Solución patrón de Hb en diluyente de Drabkin (ml).	Solución de Drabkin (ml).	Equivalente a; g/dl de Hb.
5	0	15
2.5	2.5	7.5
0	5	0

Interpolar en la curva la lectura de absorción.

## II.- Técnica de oxihemoglobina (6,22,29,59,65,126).

### a.- Fundamento.

La hemoglobina contenida en la sangre, se oxida por efecto de la incorporación del ion amonio, transformándose cuantitativamente en oxihemoglobina.

### b.- Material y equipo.

Espectrofotómetro.

Cubeta de 1 cm<sup>3</sup> a 3 cm<sup>3</sup>.

Pipeta de Sahli.

Tubo de ensaye 12 X 100 mm.

Pipeta graduada de 5 ml.

Reactivo de oxihemoglobina.

Material biológico: Sangre con anticoagulante.

### c.- Método.

1.- Igual al mencionado para cianometahemoglobina solo que con reactivo de oxihemoglobina en lugar del reactivo de Drabkin.

### 2.- Cálculos:

Usando longitud de onda de 578 nm y curva de calibración anterior para cianometahemoglobina y se expresa el resultado en g/dl.

## B) Hematocrito (Ht).

### I.- Técnica del macrohematocrito y microhematocrito.

#### a.- Fundamento.

El paquete celular y el plasma se separan al centrifugar la sangre a una velocidad constante y durante un período de tiempo constante. El resultado se reporta en relación de porcentaje de paquete celular y plasma.

#### b.- Material y equipo.

Macrohematocrito:

Tubo de Wintrobe con tapón.

Centrifuga clínica.

Aguja metálica larga o pipeta Pasteur.

Material biológico: Sangre con anticoagulante.

Microhematocrito:

Tubo capilar con o sin anticoagulante.

Centrifuga para microhematocrito.

Lector de microhematocrito o regla para medir.

Sellador de plastilina o mechero.

Material biológico: Sangre con o sin anticoagulante (dependiendo si el tubo capilar tiene o no anticoagulante).

#### c.- Método.

Macrohematocrito. Mezclar la sangre con anticoagulante, llenar el tubo de Wintrobe con la aguja metálica hasta la marca de 0-10 (no deben quedar burbujas de aire dentro de la columna de sangre, retirar el exceso de sangre o burbujas superficiales con algodón), centrifugar el tubo a 2500 rpm. durante 30 minutos, leer el límite superior de la columna del paquete celular en la escala ascendente, el resultado se reporta en porcentaje de paquete celular (7,22,24,59,76,91,117,139).

Microhematocrito. Llenar con sangre venosa o capilar las dos terceras partes de un tubo capilar heparinizado, (puede utilizarse sangre con anticoagulante y tubo capilar no heparinizado) sellar el extremo que no contiene sangre con plastilina

o a fuego con mechero.

Colocar el tubo en una centrifuga de microhematocrito y centrifugar a 11000 rpm durante 5 minutos ó a 5000 rpm durante 10 minutos (según la centrifuga). Al sacar el tubo ya centrifugado vamos a observar tres capas:

a) Paquete celular rojo.- Contiene los eritrocitos.

b) Paquete intermedio o capa flogística, que es una capa pequeña color grisáceo, donde se encuentran leucocitos y plaquetas (7,24,59,65,87,91,117,126).

c) Plasma.

Lectura de microhematocrito.- Hay gran variedad de lectores, el más utilizado en el laboratorio de análisis clínicos de la FES-C es el siguiente:

Coloque el tubo capilar en el surco del lector, de manera que la capa flogística quede a la altura del indicador blanco y con el paquete celular dirigido hacia el indicador rojo, gire el disco a manera que el ángulo de 90° del disco abarque los extremos de la muestra total de sangre centrifugada. El resultado se lee en la escala central inferior, expresándolo en porcentaje.

C) Conteo de glóbulos blancos y glóbulos rojos.

I.- Técnica del hemocitómetro.

a.- Fundamento.

Mediante diluciones de una muestra sanguínea, con líquidos que nos permitan el conteo de un tipo celular (leucocitos o eritrocitos), observándose al microscopio en cámaras especialmente graduadas (de Neubauer), y contando una pequeña cantidad de la muestra en los lugares indicados para cada uno de ellos (7,22,24,60,76,99).

b.- Material y equipo.

Cámara de Neubauer o hemocitómetro.

Pipetas diluyentes para glóbulos blancos y rojos (pipetas de Thoma).

Líquidos diluyentes:

Glóbulos rojos.- Solución salina fisiológica al 0.85%, diluyente de Hayem o diluyente de Gowers.

Glóbulos blancos.- Acido clorhídrico 1 N o diluyente de Türk.

Microscopio.

Algodón.

Agitador mecánico.

Material biológico: Sangre con anticoagulante.

c.- Método.

Conteo de glóbulos rojos:

- 1.- Con una pipeta para dilución de glóbulos rojos (presenta un agitador color rojo dentro de la pipeta), extraer la sangre exacta hasta llegar a la marca de 0.5, succionando suavemente.
- 2.- Secar la sangre que queda en la punta de la pipeta con un algodón e introducir la pipeta en el líquido diluyente y hacer succión uniforme hasta la marca de 101 por encima del bulbo de la pipeta.
- 3.- Agitar la pipeta durante 2 a 3 minutos, de preferencia con un agitador mecánico, cuando se agita manualmente deberá

mantenerse la pipeta en posición horizontal.

- 4.- Descartar las primeras 5 ó 6 gotas de la pipeta.
- 5.- Colocar la punta de la pipeta en el espacio que se encuentra entre la cámara y el cubreobjetos, el líquido llenará el espacio por capilaridad.
- 6.- Esperar 3 minutos para que sedimenten las células y colocar la cámara en el microscopio.
- 7.- Con el objetivo seco débil (10 X), localizar el cuadro central de los 9 cuadros grandes.
- 8.- Con el objetivo seco fuerte (40 X), contar todos los eritrocitos que se encuentren en los 4 cuadros de las esquinas y el cuadro central de los 25 totales.
- 9.- Contar las células siempre en un orden secuencial para evitar la duplicación al contar las células que tocan las líneas:

Contar las células que toquen las líneas internas superior e izquierda, y no contar las que tocan las líneas inferior y derecha, ésto se refiere a la línea triple que rodea a los cuatro lados a cada uno de los cuadros por contar (fig. 3) (7,22,26,99).

Conteo de glóbulos blancos:

- 1.- Para el llenado de la pipeta, seguir la técnica descrita para el conteo de eritrocitos excepto que la pipeta de dilución se llena con el diluyente hasta la marca 11 por arriba del bulbo (presenta un agitador blanco dentro del bulbo), y el líquido diluyente es distinto, ya que éste destruirá los eritrocitos, también el llenado de la cámara es igual al descrito para la técnica de eritrocitos.
- 2.- Con el objetivo seco débil (10 X), se cuentan todas las células que se encuentran en los cuatro cuadros de las esquinas de los 9 cuadros grandes.
- 3.- La regla para contar o excluir células que toquen las líneas es igual a la usada para eritrocitos.
- 4.- Cálculos:

Glóbulos rojos contados en los 5 cuadros se multiplica por

10 000 y es igual a eritrocitos totales por microlitro o  $\text{mm}^3$ .

Glóbulos blancos contados en los 4 cuadros, se multiplica por 50 y es igual a leucocitos totales por microlitro o  $\text{mm}^3$ .

Si el número de leucocitos es menor de 2000 aspirar sangre con la pipeta de leucocitos hasta la marca 1 y diluyente hasta la marca 11; se cuentan los 9 cuadros grandes de la cámara y el resultado se multiplica por 11.1.

Para cuentas de 50 000 a 500 000 leucocitos, debe llenarse la pipeta para eritrocitos hasta la marca de 1 y con diluyente de glóbulos blancos hasta la marca 101, se cuenta de manera ordinaria para leucocitos, pero se multiplica por 250 (7,22, 24,26,60,76,99).



D) Frotis sanguíneo.

a.- Fundamento.

Consiste en hacer la extracción de una gota de sangre colodándola sobre una laminilla (portaobjetos), fijarla y teñirla con algún colorante (Wright, es el más utilizado o de rutina), que nos sirve para obtener una visión general morfológica de las estructuras celulares sanguíneas, así como, realizar el conteo diferencial leucocitario (7,16,65,87,91).

b.- Material y equipo.

Portaobjetos.

Tubo capilar o pipeta Pasteur.

Algodón.

Microscopio.

Colorante de Wright.

Solución amortiguadora de fosfatos.

Material biológico: Sangre, de preferencia hacer el frotis inmediatamente después de la toma de la muestra, si no es posible agregar anticoagulante a la muestra y procesarse después.

c.- Método.

- 1.- Colocar con un tubo capilar o la pipeta Pasteur una pequeña gota de sangre sobre un portaobjetos limpio (de preferencia nuevos y desengrasados).
- 2.- Colocar el extremo de un segundo portaobjetos sobre el primero, sosteniéndolo a un ángulo aproximado de  $35^\circ$ , y por delante de la gota de sangre.
- 3.- Deslizar el segundo portaobjetos para que entre en contacto con la sangre y ésta se extiende por capilaridad en el borde del portaobjetos.
- 4.- Cuando se haya extendido la sangre, mover hacia adelante el segundo portaobjetos con un movimiento firme y uniforme. La sangre se correrá formando una capa delgada.
- 5.- Deberá secarse rápidamente y fijarse, si se tardará en teñir.
- 6.- Proceder a la tinción y observarse secuencialmente con los

objetivos de 10 X, 40 X y 100 X (inmersión), y proceder al estudio de las células (16,22,26,65,76,87,117,139).

#### Conteo diferencial leucocitario.

Se hace contando y clasificando 100 leucocitos como mínimo, y los resultados de cada tipo de leucocito se expresa en porcentaje. En caso de una cuenta leucocitaria muy alta, o cuando sean muy abundantes los leucocitos en el frotis, se procede a contar 200 células y los resultados de cada tipo de leucocito se divide entre dos para expresarlo en porcentaje.

Para analizar una muestra representativa de todas las porciones del frotis se procede a estudiar el frotis en orden secuencial para evitar el doble conteo de algunas células, así como, elegir el lugar en donde la capa de la extensión sea más delgada y cercana a la orilla. Se debe tratar de contar la misma cantidad de campos cercanos a la orilla y hacia adentro de la extensión.

A los glóbulos rojos se les estudia: tamaño, forma y color, así como, estados y formas anormales e inclusiones (para éstas en ocasiones se requieren coloraciones especiales).

El estudio y diferenciación de los leucocitos es muy importante, y cada tipo tiene algunas características que los distinguen de los demás con la tinción de Wright:

Granulocitos polimorfonucleares (segmentados). Tiene un tamaño de 10 a 15 micras, tiene núcleo con 2 ó más lóbulos de color púrpura unido por una tira delgada de cromatina densa; el núcleo está rodeado por un citoplasma azul o rosa pálido y con gránulos finos color violeta o amarillo muy tenue en los neutrófilos, los eosinófilos tienen gránulos grandes color rojo amarillento o naranja y los basófilos también tienen gránulos grandes y de color azul oscuro.

Linfocito. Tienen un tamaño variable de 7 a 16 micras. Su núcleo tiene forma redonda y grande, tiene cromatina de color azul púrpura oscuro y es muy denso. No tiene nucleolos, su citoplasma es de color azul claro con algunos gránulos azuró-

filos.

Monocitos. Son las células sanguíneas de mayor tamaño, van de 12 a 16 micras. Su núcleo es oval y en forma arrañada. Posee cromatina de color púrpura claro o rosado. No tiene nucleolos. El citoplasma es abundante de color gris con muchos gránulos de color lila.

Glóbulos rojos. No pertenecen a la serie leucocitaria, es la célula mas abundante en una extensión sanguínea. Tienen un diámetro de 4 a 8 micras (según la especie), un color anaranjado o rojo y carente de núcleo en mamíferos.

Granulocitos jóvenes (neutrófilo en banda). Dentro de los granulocitos jóvenes éstos son los que mayor importancia clínica tienen debido a que su presencia en sangre periférica es muy importante. El núcleo de esta célula es curvado con membrana alisada, a veces en forma de "S", con cromatina menos densa y dispersa que en neutrófilo segmentado (7,24,68,91,116, 150).

En el presente trabajo no se detallan las características de las células sanguíneas inmaduras o patológicas que en un momento dado pueden estar circulando en sangre periférica y que por lo tanto puedan en algunas ocasiones aparecer en el frotis.

### E) Velocidad de sedimentación globular (VSG).

Es una prueba de laboratorio basada en la tendencia de los eritrocitos a sedimentar en la sangre, esta tendencia puede verse afectada por algunos trastornos patológicos, la VSG se verá aumentada en: Aumento de proteínas plasmáticas, aumento de colesterol sérico, disminución del número de eritrocitos, eritrocitos de mayor tamaño; disminuye la VSG en casos contrarios. Esta prueba no es de valor diagnóstico en ruminantes ya que la velocidad de sedimentación es muy lenta (0-1 mm/24 horas), ni en equinos pues esta prueba es muy rápida (25-40 mm en una hora) (7,16,24,60,82,99).

#### I.- Técnica de Wintrobe.

##### a.- Fundamento.

Consiste en determinar la velocidad con que las células sanguíneas de una muestra con anticoagulante descienden en posición vertical y en absoluto reposo durante un tiempo determinado, este descenso es un fenómeno dado por la gravedad y se observa siempre que una muestra sanguínea con anticoagulante está en reposo; la sedimentación puede variar por la alteración en las propiedades fisicoquímicas del plasma (concentración proteica, concentración celular).

##### b.- Material y equipo.

Tubo de Wintrobe.

Gradilla de sedimentación.

Cronómetro o reloj.

Aguja metálica larga con jeringa o pipeta Pasteur.

Material biológico: Sangre con anticoagulante.

##### c.- Método.

Mezclar la sangre con anticoagulante, llenar el tubo de Wintrobe de la misma manera que se indica para la prueba de macrohematocrito (pag. 53), colocar el tubo en la gradilla de sedimentación en posición vertical y dejarlo reposar durante un tiempo determinado para cada especie (1 hora), y hacer la

lectura en la escala descendente en milímetros de sedimentación por tiempo (7,8,22,76,91,117).

Normalmente el tiempo de sedimentación es de una hora, sin embargo, cuando éste aumenta (ejemplo, 2 horas), se puede utilizar el índice de Katz para obtener un valor corregido (8,22,76). Ejemplo:

Fórmula:

$$\text{Índice de Katz} = \frac{A + \frac{B}{2}}{2}$$

A = 3 mm a la hora.

B = 10 mm a las 2 horas.

$$\text{Índice de Katz} = \frac{3 + \frac{10}{2}}{2} = 4 \text{ mm.}$$

F) Valores corpusculares de los hematíes o índices hemáticos.

Wintrobe introdujo procedimientos para la clasificación de la anemia que han sustituido a los rangos cuantitativos objetivos por impresiones subjetivas.

Para determinarlos se necesitan tres valores básicos obtenidos en la biometría hemática: Conteo de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito.

Volumen globular medio (V.G.M.). Es el volumen medio de los eritrocitos individuales, expresado en fentolitros.

Cálculo:

$$V.G.M. = \frac{\text{Hematocrito (\%) } \times 10}{\text{Número de eritrocitos (millones)}} = fl$$

Al VGM también se le llama volumen corpuscular medio (VCM).

Si el VCM aumenta se trata de una anemia macrocítica.

Si el VCM disminuye se trata de una anemia microcítica.

Si el VCM se encuentra en valores normales se trata de una anemia normocítica.

(Esto de acuerdo a los valores normales de los índices en cada especie).

Hemoglobina globular media (H.G.M.). Es el contenido de hemoglobina en un eritrocito individual medio, expresado en picogramos (pg).

Cálculo:

$$H.G.M. = \frac{\text{Hemoglobina (g/dl)} \times 10}{\text{Número de eritrocitos (millones)}} = pg$$

Al HCM también se le llama hemoglobina corpuscular media (HCM).

Concentración de hemoglobina globular media (C.H.G.M.). Es la concentración media de hemoglobina por 100 ml de eritrocitos concentrados.

Cálculo:

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

Estos índices se emplean para determinar el tipo morfológico de anemias, y es útil para dar un pronóstico y elaborar un diagnóstico (7,8,15,24,26,82,99,117).

## Pruebas de coagulación.

### Coagulación sanguínea.

Cuando se rompe un vaso sanguíneo tiene lugar una pérdida de sangre durante un período de tiempo. Si el vaso no es demasiado grande se detiene la hemorragia mediante la hemostasis, la cual es consecuencia de un proceso que transcurre en forma secuencial. En primer lugar las plaquetas se adhieren a los vasos sanguíneos lesionados y también unas a otras y forman finalmente un tapón. Con la agregación de plaquetas, éstas liberan aminas vasoactivas (serotonina y epinefrina), las cuales estimulan la vasoconstricción. En éste momento se inicia la coagulación sanguínea alrededor de las plaquetas y los tejidos lesionados, conduciendo a la formación de un coágulo sanguíneo.

El proceso de coagulación sanguínea de los mamíferos, tiene dos mecanismos que se conocen como vía extrínseca e intrínseca de la coagulación, reguladas en forma muy estricta por un sistema de cascada (ver fig. 4). Las diversas sustancias que intervienen en dicha cascada reciben el nombre de factores de la coagulación, dentro de éstos existen factores exclusivos de cada una de las vías y otros comunes a ambas:

Sistema extrínseco (o extravascular). Consta de los siguientes factores:

Tromboplastina tisular: Factor III.

Proconvertina: Factor VII.

Sistema intrínseco (o intravascular). Consta de los siguientes factores:

Factor de Hageman: Factor XII.

Antecedente de tromboplastina plasmático: Factor XI.

Factor de Christmas: Factor IX.

Factor antihemofílico: Factor VIII.

Factores comunes a ambos sistemas:

Factor de Stuart: Factor X.

Proacelerina: Factor V.

Protrombina: Factor II.

Fibrinógeno: Factor I.

Calcio: Factor IV.

Factor estabilizador de fibrina: Factor XIII.

En resumen ambos sistemas trabajan en la activación del factor X, en donde éstos siguen el mismo mecanismo.

La protrombina se convierte en trombina por una activación secuencial de los factores de coagulación en sangre circulante. La trombina convierte el fibrinógeno en fibrina, la cual consolida al tapón plaquetario formado en un principio porque forma una red alrededor de él y se contrae para formar un coágulo estable. Para evitar que continúe el proceso y cause un trombo oclusivo completo, se estimulan los procesos anticoagulantes de la sangre además de activar el mecanismo fibrinolítico, el cual posteriormente disuelve el coágulo.

Trastornos hemorrágicos. Se llama hemorragia a la salida constante de sangre, por alguna pared vascular y puede ser debida a:

Un aumento en la fragilidad de los vasos sanguíneos.

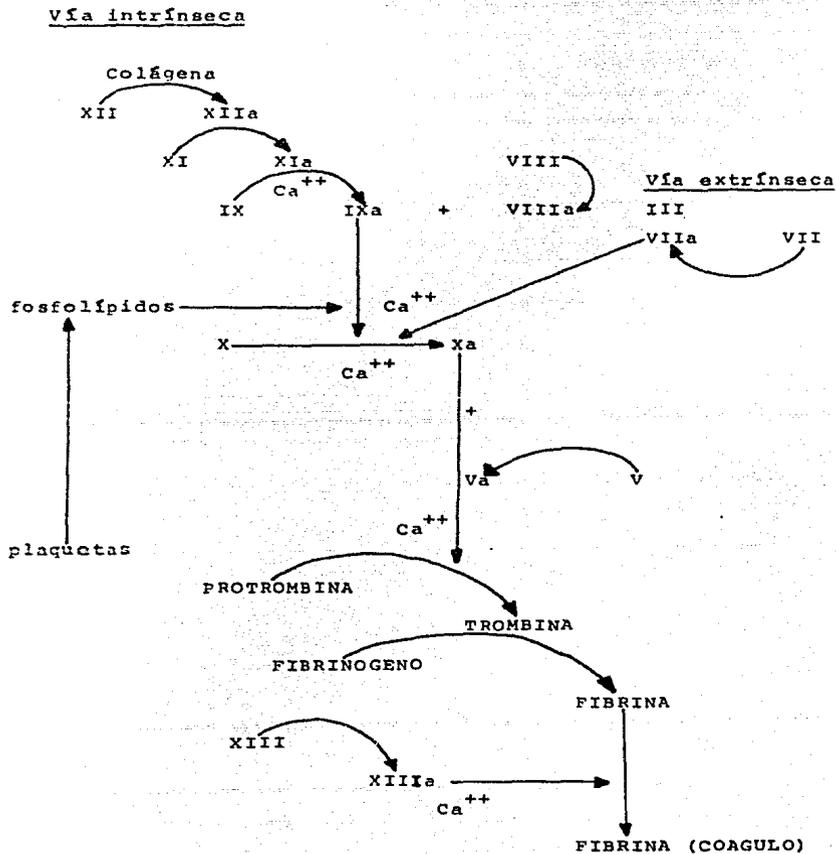
Una disminución plaquetaria.

Trastorno en el mecanismo de coagulación por alteración en cualquier punto de él.

Combinación de las anteriores (7,26,33,109,132).

Las siguientes, son pruebas para detectar algunos trastornos hemorrágicos.

Fig. 4.- Vía extrínseca e intrínseca de la coagulación sanguínea.



Modificado de White A. (132).

A) Tiempo de sangrado.

Es una prueba no específica de algún trastorno de la coagulación. En general el tiempo de sangrado lo utilizamos para detectar lesiones vasculares, defectos plaquetarios y fragilidad capilar. A partir de los resultados obtenidos, se procede o no a pruebas mas específicas (7,26,99,120).

I.- Método de Duke.

a.- Fundamento.

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

b.- Material y equipo.

Lanceta desechable.

Tira de papel filtro.

Cronómetro o reloj.

c.- Método.

- 1.- Desinfectar el lugar elegido para la punción (nariz, labio, oreja).
- 2.- Puncionar profundamente la piel.
- 3.- Poner en marcha el cronómetro cuando aparezca por primera vez la sangre.
- 4.- Secar la sangre sin tocar la piel con el papel filtro cada 15 segundos hasta que no aparezca sangre en el lugar puncionado. Tomar el tiempo y reportarlo en segundos (38,41,69, 91).

B) Tiempo de coagulación de sangre completa.

Al igual que el tiempo de sangrado es una prueba no específica, pero en este caso la prueba nos dá una medición de los factores de coagulación del sistema intrínseco (12,38,120).

a.- Fundamento.

La sangre "in vitro", ante condiciones de temperatura parecidas a las corporales va a formar un coágulo, en determinado tiempo, provocándose la formación de fibrina partiendo del fibrinógeno.

Esta prueba indica un tiempo aproximado de eficacia del mecanismo de coagulación, teniendo un margen de error ya que las insuficiencias ligeras de distintos factores de coagulación pueden no afectar el tiempo de coagulación.

I.- Método de Lee y White.

b.- Material y equipo.

Jeringa estéril.

Cronómetro,

Tubos de ensaye 12 X 100 mm.

Baño maría a 37° C.

c.- Método.

- 1.- Extraer 3 ml de sangre venosa con la jeringa (a partir de la aparición de sangre en la jeringa). Poner a funcionar el cronómetro.
- 2.- Colocar inmediatamente en cada uno de los tubos de ensaye (marcados con 1, 2, 3), un mililitro de sangre aproximadamente y colocarlos en baño maría a 37° C.
- 3.- Sacar los tubos (uno por uno) del baño maría cada 30 segundos, inclinándolos, el tiempo de coagulación debe observarse cuando al inclinar los tubos no se derrame su contenido, detener el cronómetro a la aparición de coágulo en los tres tubos.
- 4.- Tomar el tiempo de coagulación de cada uno de los 3 tubos y sacar un promedio, reportando el tiempo en minutos (22,58, 65,91).

## II.- Método de Dale y Laidlaw.

### a.- Material y equipo.

Lanceta.

Cronómetro.

Tubo capilar.

### b.- Método.

- 1.- Puncionar profundamente la piel y poner en marcha el cronómetro.
- 2.- Decantar la primera gota.
- 3.- Llenar por capilaridad dos terceras partes del tubo capilar con sangre de la punción.
- 4.- Dejar reposar 2 minutos el tubo horizontalmente, observar el deslizamiento de la sangre dentro del tubo capilar, cuando el deslizamiento sea mas lento, cortar una porción pequeña de tubo cada 30 segundos.
- 5.- La coagulación es evidente cuando al cortar el capilar se forme entre los 2 fragmentos un hilo de fibrina que indica la coagulación, detener el cronómetro y reportar el tiempo en minutos (22,38,91).

C) Retracción del coágulo.

Es otra prueba inespecífica, ésta nos va a ayudar a determinar de manera global todos los factores de coagulación del sistema intrínseco (24,26).

a.- Fundamento.

Determinar la rapidez e intensidad de la retracción del coágulo, que depende de todos los factores (intrínsecos) de coagulación.

b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye con tapón.

Alambre de hierro de 1.5 mm de diámetro, enroscado de manera que tenga 6 vueltas por cada 2.5 cm. La espiral debe tener unos 5 cm de largo.

5 ml de sangre recién tomada sin anticoagulante.

c.- Método.

- 1.- Tomar 5 ml de sangre en un tubo de ensaye.
- 2.- Colocar el alambre dentro del tubo y taparlo.
- 3.- Se incubaba el tubo en baño maría a 37° C y una hora después de haberse formado el coágulo sacarlo del baño.
- 4.- Decantar el suero y medir su volumen.
- 5.- Cálculo:

$$\text{Retracción} = \frac{\text{volumen de suero} \times 100}{\text{ml de sangre}} = \%$$

Ejemplo: 3 ml de suero después de decantado.

$$\text{Retracción} = \frac{3 \times 100}{5} = 60\%$$

(1,22,38,91).

D) Conteo de plaquetas.

Técnica para determinar directamente la cantidad de plaquetas presentes en una muestra. Es importante para determinar su funcionamiento en el tapón plaquetario, debe de considerarse ya que el 75% de los problemas de sangrado adquiridos, afectan a las plaquetas (7,24,26,120).

a.- Fundamento.

De una muestra sanguínea con anticoagulante, se toma una pequeña cantidad y se añade un colorante que tñe las plaquetas, lo que nos permitirá su conteo.

I.- Método directo.

b.- Material y equipo.

Pipeta de dilución de eritrocitos.

Caja de Petri con papel filtro húmedo.

Hemocitómetro.

Reactivos colorantes: A elegir cualquiera de los tres.

1.- Rees-Ecker.

2.- Oxalato de amonio al 1%.

3.- EDTA disódico al 1 ó 2% en cloruro de sodio al 85% mas azul de cresilo brillante.

c.- Método.

1.- Llenar la pipeta de dilución de eritrocitos hasta la marca de 0.5.

2.- Completar con reactivo colorante hasta la marca 101.

3.- Mezclar por 5 minutos en rotor mecánico.

4.- Desechar las primeras 5 gotas y después llenar los 2 lados del hemocitómetro.

5.- Dejar reposar el hemocitómetro dentro de la caja de Petri que contiene el papel filtro húmedo, durante 15 minutos.

6.- Con iluminación reducida contar el cuadro central grande con sus 25 divisiones de los 2 lados de la cámara con objetivo de 40 x.

Cálculo: No. de plaquetas X 1000 = número de plaquetas/mm<sup>3</sup>  
(7,14,26,38,91,99).

II.- Método indirecto.

a.- Material y equipo.

Frotis sanguíneo teñido con colorante Wright.

Microscopio.

b.- Método.

- 1.- Se examina un frotis de sangre teñido y se anota el número de plaquetas y glóbulos rojos en varios campos representativos y se promedia por separado (objetivo 100 X).
- 2.- Puede utilizarse también otra tinción de rutina para sangre.
- 3.- El hallazgo de tres o menos plaquetas por campo de inmersión sugiere trombocitopenia.
- 4.- El número de plaquetas puede compararse con el de eritrocitos del frotis; éste número relativo puede transportarse a número absoluto por medio del siguiente cálculo:

$$\frac{\text{número de plaquetas/campo} \times \text{cuenta total de eritrocitos}}{\text{número de G.R./campo}} =$$
$$= \text{número de plaquetas/mm}^3. \quad (7,99,126).$$

E) Tiempo de protrombina (TP).

Es una prueba por la cual vamos a poder determinar el funcionamiento del sistema extrínseco de coagulación, mediante la detección de deficiencia de protrombina y los factores V, VII y X de coagulación, además de poder utilizarse para determinar deficiencia de vitamina K, mal absorción de ésta o posibles intoxicaciones con dicumarol (7,24,26,99).

a.- Fundamento.

La tromboplastina en presencia de iones de calcio, actúa sobre la protrombina y produce trombina, la cual actúa sobre el fibrinógeno convirtiéndolo en fibrina que produce el coágulo.

b.- Material y equipo.

Centrífuga.

Baño maría a 37° C.

Cronómetro.

Tubos de ensayo 12 X 100 mm.

Tromboplastina con calcio.

Solución de oxalato de sodio 0.1 M.

c.- Método.

- 1.- Tomar sangre con anticoagulante de oxalato de sodio (9 partes por una respectivamente), y mezclar por inversiones repetidas.
- 2.- Centrifugar la sangre a 1500 rpm durante 5 minutos.
- 3.- Poner 0.1 ml de plasma en un tubo en baño maría a 37° C.
- 4.- Añadir 0.2 ml de tromboplastina con calcio y simultáneamente medir el tiempo con el cronómetro.
- 5.- Agitar el tubo dentro del baño maría durante dos a tres segundos, después dejarlo reposar hasta los 10 segundos.
- 6.- Enseguida examinar el tubo hasta que aparezca el coágulo, en ese momento se toma el tiempo y se anota el número de segundos (109,110).

F) Tiempo parcial de tromboplastina (TPT).

Es el método más confiable para buscar un defecto del sistema intrínseco, por medio de ésta podemos probar todos los factores de este sistema a excepción de el VII y las plaquetas (7,24,26,99).

a.- Fundamento.

El sistema intrínseco se prueba mediante caolín, que se usa para activar el factor XII y cefalina que suplanta el papel de las plaquetas.

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

b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye 12 X 100 mm.

Centrífuga.

Baño maría a 37° C.

Cronómetro.

Jeringa tuberculina o pipeta de 0.2 ml.

Tromboplastina parcial.

Solución de cloruro de calcio 0.03 M.

Solución de oxalato de sodio 0.1 M.

c.- Método.

- 1.- Colocar 4.5 ml de sangre en un tubo de ensaye conteniendo 0.5 ml de anticoagulante de oxalato. Invertir el tubo varias veces para impedir la coagulación.
- 2.- Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos, trasladar el plasma a otro tubo y conservarlo entre 0° y 5° C hasta el momento de la prueba, ésta debe efectuarse antes de 2 horas.
- 3.- Incubar en baño maría a 37° C durante 3 minutos los tubos y el volumen de solución suficiente para el número de pruebas que se van a efectuar.

- 4.- Poner 0.1 ml de tromboplastina parcial reconstituida en un tubo.
- 5.- Añadir 0.1 ml de plasma en estudio y mezclar el contenido mediante un giro rápido. Incubar a 37° C durante 3 minutos exactos.
- 6.- Añadir 0.1 ml de solución de cloruro de calcio 0.02 M previamente incubada y expulsándola rápidamente con la jeringa tuberculina, simultáneamente empezar a medir el tiempo. Mezclar el contenido con un giro rápido.
- 7.- Retirar el tubo del baño a los 30 segundos, inclinarlo con suavidad de un lado a otro con velocidad no mayor de una vez por segundo, vigilar la aparición de un coágulo pequeño y tomar el tiempo al inicio de su formación (71, 108).

### G) Tiempo de trombina (TT).

#### a.- Fundamento.

El tiempo de trombina, es el tiempo que tarda el plasma en formar un coágulo de fibrina por la adición de trombina.

Es una prueba rápida para medir la concentración de fibrinógeno plasmático y para detectar la presencia de fibrina o producto de desdoblamiento de ésta (7,24,26,99).

#### b.- Material y equipo.

Jeringa.

Tubo de ensayo.

Cronómetro.

Centrífuga.

Solución de citrato de sodio 3.8%.

Solución de cloruro de sodio al 0.85% (SSF).

Solución de trombina 0.5 unidades en 1.0 ml.

#### c.- Método.

- 1.- Se extrae la sangre (4.5 ml) y se coloca en un tubo con 0.5 ml de citrato de sodio al 3.8%, se centrifuga 5 minutos a 3000 rpm y se separa el plasma.
- 2.- Se hace por duplicado, empleando un plasma normal y el problema.
- 3.- Poner 0.2 ml de solución de trombina y medir el tiempo, mezclar suavemente y esperar 15 segundos.
- 4.- Observar el tubo en el momento en que se forma el coágulo, tomar el tiempo y anotarlo.
- 5.- Cuando el problema coagula en más de 26 segundos se hacen diluciones del plasma problema con plasma normal, de la siguiente manera:
  - 0.1 ml de plasma + 0.1 ml de plasma normal.
  - 0.05 ml de plasma + 0.15 ml de plasma normal.
  - 0.02 ml de plasma + 0.18 ml de plasma normal.

Si con las diluciones el tiempo de trombina se corrige a lo normal, se interpreta como deficiencia de fibrinógeno, si no se corrige, se interpreta como que existe algún factor antitrombínico en la sangre (6).

Preparación de reactivos utilizados en las pruebas de hematología anteriormente descritas (6).

- a) Anticoagulante EDTA 10%.
- |                       |          |
|-----------------------|----------|
| EDTA                  | 100 g.   |
| Agua destilada c.b.p. | 1000 ml. |
- b) Diluyente de Drabkin.
- |                         |         |
|-------------------------|---------|
| Ferrocianuro de potasio | 200 mg. |
| Cianuro de potasio      | 50 mg.  |
| Bicarbonato de sodio    | 1 g.    |
- Disolver y aforar a 1000 ml con agua destilada.
- c) Reactivo de oxihemoglobina.
- |                     |       |
|---------------------|-------|
| Hidróxido de amonio | 4 ml. |
|---------------------|-------|
- Aforar con agua destilada a 1000 ml.
- d) Solución salina al 0.85%.
- |                  |        |
|------------------|--------|
| Cloruro de sodio | 8.5 g. |
|------------------|--------|
- Disolver y aforar a 1000 ml con agua destilada.
- e) Solución de Hayem.
- |                     |         |
|---------------------|---------|
| Cloruro de mercurio | 0.5 g.  |
| Cloruro de sodio    | 1.0 g.  |
| Sulfato de sodio    | 5.0 g.  |
| Agua destilada      | 200 ml. |
- f) Solución de Gower.
- |                          |          |
|--------------------------|----------|
| Sulfato de sodio anhidro | 12.5 g.  |
| Acido acético glacial    | 33.3 ml. |
| Agua destilada           | 200 ml.  |
- g) Acido clorhídrico N/10 (0.1 N).
- |                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Acido clorhídrico concentrado | 1 ml.   |
| Agua destilada                | 100 ml. |
- h) Diluyente de Türk.
- |                       |         |
|-----------------------|---------|
| Acido acético glacial | 2 ml.   |
| Azul de metileno      | 1 ml.   |
| Agua destilada        | 100 ml. |
- i) Colorante de Wright (pag.150).

j) Solución amortiguadora para colorante de Wright (pag. 154).

k) Diluyente Rees-Ecker.

Citrato de sodio	3.8 g.
Formaldehído al 40%	0.2 ml.
Azul de cresilo brillante	0.1 g.
Agua destilada	100 ml.

l) Oxalato de amonio al 1%.

Oxalato de amonio	1.1 g.
Agua destilada	100 ml.

m) Solución de citrato de sodio al 3.8%.

Citrato de sodio	3.8 g.
Agua destilada	100 ml.

#### 4.- QUIMICA SANGUINEA.

La determinación química de varios constituyentes de la sangre es uno de los aspectos dirigidos al diagnóstico más completo de las enfermedades. Estos análisis de la sangre, sobre todo si van con otros procedimientos de investigación, como el examen físico y la historia clínica del animal enfermo, pueden ser de extremo valor para el médico veterinario, en sus criterios diagnóstico y pronóstico, así como para ponderar los resultados del tratamiento. Por supuesto, los exámenes químicos de la sangre no deben ser exigidos sin motivo, ni mucho menos intentar que sean un sustituto del examen clínico cuidadoso. Las respuestas de los mencionados análisis serán de valor, solo si se acompañan del examen del animal y si el médico veterinario se halla en condiciones de saber interpretar los resultados.

Todas las pruebas de química sanguínea deberán de procesarse lo más rápido posible, después de la toma de las muestras, para evitar pérdidas de compuestos como resultado de los procesos degradativos, bacterianos o enzimáticos. Entre otras alteraciones posibles son importantes las desintegraciones de los compuestos nitrogenados y la descompensación de los electrolitos del plasma o suero, como consecuencia de variaciones en la permeabilidad de los glóbulos rojos y otras células. Si se presentan dificultades para completar el examen inmediatamente, el suero o el plasma podrán separarse de los elementos celulares y refrigerarlos hasta que pueda procederse a la determinación que falte. Si para la técnica se hace preciso un filtrado desproteínizado, deberá prepararse inmediatamente y mantenerlo en refrigeración hasta que se trabaje.

Para la mayoría de las determinaciones químicas de la sangre, casi siempre se prefieren utilizar el suero o el plasma a la sangre completa.

El empleo de sangre completa es un medio mas variable que

el plasma o suero, aparte de que, las variaciones son posibles en mayor extensión por la presencia de estructuras celulares. El suero en general es más aceptable, pues el plasma puede contener anticoagulantes que alteran la dilución de los elementos sanguíneos.

La sangre destinada a los análisis químicos deberá obtenerse en condiciones precisas, pues de otro modo los procesos fisiológicos pueden causar alteraciones en el estado de equilibrio, y en consecuencia, en las concentraciones de varias sustancias. En la interpretación de los resultados deberá recordarse que, para cada elemento presente, hay un estado de equilibrio dinámico entre las células de los tejidos y el líquido que las rodea. Los elementos químicos entran y salen del torrente circulatorio y de las células, de manera que su respectiva concentración en el momento de la toma de la muestra, solo representa un estado de equilibrio entre producción y utilización (5,7,26,72,99).

A) Filtrado de Folin-WU (filtrado libre de proteínas).

a.- Fundamento.

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

b.- Material y equipo.

Matraz de Erlen-meyer de 50 ml.

Embudo de 5 a 10 cm de diámetro.

Tubos de ensaye 15 X 175 mm o tubo de Folin.

Pipetas de 1 y 10 ml.

Acido sulfúrico 0.666 N (2/3 N).

Tungstato de sodio al 10%.

Agua destilada.

Material biológico: Sangre con anticoagulante.

c.- Método.

- 1.- Colocar en un matraz Erlen-meyer, 7 ml de agua destilada.
- 2.- Agregar 1 ml de ácido sulfúrico gota a gota y mezclarlo a la vez.
- 3.- Agregar 1 ml de sangre gota a gota y mezclar a la vez (que la sangre baje lentamente para que no se adhiera a las paredes del matraz).
- 4.- Dejar reposar 5 minutos para que precipiten las proteínas.
- 5.- Filtrar o centrifugar.
- 6.- El filtrado o sobrenadante del centrifugado deben ser completamente transparentes.
- 7.- Si el filtrado no es transparente, agregar unas gotas de ácido sulfúrico para activar la precipitación de las proteínas aún presentes y repetir el filtrado o centrifugado hasta obtenerlo transparente (19,65,91).

## B) Glucosa.

La glucosa es el principal azúcar sanguíneo y de vital importancia, siendo un producto resultante de la digestión de los alimentos y cuya posterior oxidación, llena las siguientes finalidades; proporciona la fuente principal de energía para el trabajo muscular, provee una parte importante del calor corporal.

La glucosa proviene de tres fuentes, que son: La digestión de los carbohidratos, precursores que no son carbohidratos y glucógeno hepático, los niveles de este azúcar en la sangre son regidos por dos hormonas pancreáticas que son la insulina y el glucagón, además de las catecolaminas que juegan un papel muy importante (principalmente adrenalina). El metabolismo de la glucosa es complejo, pero su determinación en laboratorio se restringe a determinar la actividad pancreática endócrina y en ocasiones el estado nutricional del individuo (42,70,114).

### I.- Técnica de Folin-WU.

Las determinaciones deben de hacerse lo más rápido posible después de recolectada la muestra, ya que la mayoría de los anticoagulantes interfieren en las concentraciones de glucosa sanguínea. Se puede mantener la sangre para la determinación de glucosa hasta por 24 horas con adición de fluoruro de sodio pero no puede determinarse por este método el nitrógeno uréico sanguíneo (7).

#### a.- Fundamento.

En solución alcalina la glucosa reduce fácilmente el ion cúprico a cuproso con formación de óxido cuproso. Al agregar ácido fosfomolibdico o arsenomolibdato, éste es reducido por el óxido cuproso con formación de óxidos, los cuales producen un color azul, proporcional a la concentración de glucosa.

#### b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye de 175 X 15 mm o tubo de Folin.

Pipetas de 1 ml.

Baño maría en ebullición.

Espectrofotómetro.

Solución alcalina de sulfato de cobre.

Solución de arsenomolibdato.

Solución patrón de glucosa al 2%.

Material biológico: Filtrado de Folin-Wu.

c.- Método.

- 1.- Colocar en un tubo de ensaye 1 ml de filtrado de Folin-Wu.
- 2.- Agregar 1 ml de solución de sulfato de cobre y mezclar.
- 3.- Colocar el tubo en baño maría en ebullición durante 10 minutos.
- 4.- Enfriar a chorro de agua.
- 5.- Agregar 1 ml de solución de arsenomolibdato y mezclar.
- 6.- Dejar en reposo 2 minutos y diluir con agua destilada, aforando a 25 ml, mezclar por inversión por lo menos 3 veces.
- 7.- Leer la muestra a 490 nm contra blanco de reactivos, la reacción es estable por 1 hora.
- 8.- Obtener el resultado interpolando en la curva patrón.
- 9.- Curva patrón:

Colocar en 6 tubos de ensaye y añadir:

Sol. patrón de glucosa (200 mg/10 ml) (ml).	agua destilada (ml)	mg/100 ml de glucosa
1.0	9.0	200
0.8	9.2	160
0.6	9.4	120
0.4	9.6	80
0.2	9.8	40
0.0	10.0	0

(blanco)

Tomar 1 ml de cada tubo y proseguir en el punto 2 del método antes descrito (haciendolo por igual en todos los tubos) (65,126).

II.- Técnica de Ortotoluidina.

a.- Material y equipo.

Tubos de ensaye 10 X 100 mm.

Pipetas de 1 y 5 ml.

Baño maría en ebullición.

Espectrofotómetro.

Reactivo de ortotoluidina.

Solución patrón de glucosa (dextrosa 100 mg/100 ml).

Material biológico: Suero o plasma.

b.- Método.

- 1.- Colocar 3 tubos de ensaye marcados con la letra P (problema), S (patrón) y B (blanco).

	patrón	problema	blanco
Suero o plasma	--	0.1 ml	--
Solución patrón	0.1 ml	--	--
Agua destilada	--	--	0.1 ml
Ortotoluidina	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml

- 2.- Calentar en baño maría en ebullición durante 10 minutos.

- 3.- Enfriar a chorro de agua.

- 4.- Leer a 630 nm contra blanco de reactivos, la reacción es estable por 30 minutos.

- 5.- Cálculos:

$$\frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. patrón}} \times 100 = \text{mg/100 ml de sangre (39)}.$$

C) Nitrógeno ureico sanguíneo (N.U.S.).

La urea es un producto del catabolismo de las proteínas producido en el hígado, se excreta completamente por riñón. Su aumento indica una disfunción del aparato urinario (7,61,99).

Los niveles de urea se ven incrementados por una dieta rica en proteínas y de manera muy variable, en mal funcionamiento hepático.

I.- Técnica de Ormsby.

a.- Fundamento.

La urea reacciona con la 2, 3-butanediona 2-oxima en un medio ácido y se produce un complejo de color amarillo, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de urea presente.

b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye 15 X 175 mm.

Pipetas de 1 ml y 10 ml.

Gradilla.

Baño maría de ebullición.

Espectrofotómetro.

Mezcla fosfo-sulfúrica-cúprica.

Diacetil monoxima al 3%.

Solución patrón de urea 3 mg/100 ml.

Agua destilada.

Material biológico: Filtrado de Folin-WU.

c.- Método.

- 1.- Colocar en un tubo de ensaye 1 ml de filtrado de Folin-WU.
- 2.- Añadir 2 ml de diacetilmonoxima al 3% y mezclar.
- 3.- Añadir 3 ml de mezcla fosfo-sulfúrica-cúprica y mezclar.
- 4.- Poner el tubo de ensaye en baño maría en ebullición, tapado y durante 20 minutos.
- 5.- Enfriar a chorro de agua.
- 6.- Aforar a 10 ml y mezclar.
- 7.- Leer la absorción a 475 nm contra blanco de reactivos.
- 8.- Obtener resultados en la curva patrón.

9.- Curva patrón.

Sol. patrón de urea (ml) (5 mg/100 ml)	Agua destilada (ml)	mg/100 ml de urea
1.0	9.0	5
0.8	9.2	2.4
0.6	9.4	1.8
0.4	9.6	1.2
0.2	9.8	0.6
0.0	10.0	0.0

(blanco)

Tomar 1 ml de cada tubo y proseguir en el punto 2 del método con todos los tubos (19,79,122,131).

#### D) Creatinina.

El fosfato de creatinina actúa como un depósito de alta energía, convertible fácilmente en ATP en los músculos y en otros tejidos. La propia creatinina es sintetizada en el hígado y en el páncreas. La creatinina es eliminada por filtración glomerular y ésta no aumenta en general en el plasma hasta que no esté disminuída sustancialmente la función renal (13,26,61).

I.- Técnica de Fonanes Taussky.

##### a.- Fundamento.

El picrato en solución alcalina dá una coloración amarilla con la creatinina, la intensidad del color es proporcional a la concentración de esta sustancia.

##### b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye 100 X 10 mm.

Pinetas de 1 ml y 10 ml.

Gradilla.

Espectrofotómetro.

Solución de ácido picrico 0.04 M.

Solución de hidróxido de sodio 0.75 N.

Solución patrón de creatinina 1 mg/100 ml.

Material biológico: Filtrado de Folin-WU.

##### c.- Método.

1.- Colocar 3 ml de filtrado de Folin-WU en un tubo de ensaye.

2.- Añadir 1.0 ml de ácido picrico y mezclar.

3.- Añadir 1.0 ml de hidróxido de sodio y mezclar.

Puede hacerse una mezcla de los reactivos anteriores en proporción 1.5:1.5 y tomar 2 ml.

4.- Tapar el tubo y dejar reposar 15 minutos.

5.- Leer la absorción contra blanco de reactivos a 540 nm, la reacción estable durante 20 minutos.

6.- Obtener resultados interpolando en la curva patrón.

7.- Curva patrón:

Colocar 6 tubos y añadir:

Sol. patrón de creatinina (ml) (1 mg/100 ml)	Agua destilada (ml)	mg/100 ml creatinina
1.0	9.0	1.0
0.8	9.2	0.8
0.6	9.4	0.6
0.4	9.6	0.4
0.2	9.8	0.2
0.0	10.0	0.0 (blanco)

De cada uno de los tubos tomar 3 ml y proseguir en el punto 2 del método con todos los tubos (13,19,91).

## E) Acido úrico.

El ácido úrico es un producto de desecho derivado de las purinas de la dieta y de las sintetizadas en el cuerpo, es degradada hasta alantoina en hígado (en la mayoría de los mamíferos a excepción del hombre, mono y perros de raza dálmata), y el 10% de la creatinina es eliminada por riñón, por lo tanto, nos sirve para valorar el funcionamiento hepático (en caninos principalmente), y renal (en animales tiene poca importancia como prueba de funcionamiento renal) (13,26).

### I.- Técnica de Caraway.

#### a.- Fundamento.

El ácido úrico reduce al fosfotungstato en medio alcalino, produciendo un compuesto de color azul, de intensidad proporcional a la cantidad de ácido úrico presente.

#### b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye 100 X 10 mm.

Pipetas graduadas de 1 ml y 10 ml.

Gradilla.

Espectrofotómetro.

Solución de carbonato de sodio al 10%.

Reactivo de ácido fosfotúngstico Folin y Denis.

Acido fosfotúngstico diluido.

Solución patrón de ácido úrico 100 mg/100 ml.

Material biológico: Filtrado de Folin-WU.

#### c.- Método.

1.- Colocar en un tubo 5 ml de filtrado de Folin-WU.

2.- Añadir 1 ml de solución de carbonato de sodio al 10% y mezclar.

3.- Dejar reposar 10 minutos.

4.- Añadir 1 ml de ácido fosfotúngstico diluido.

5.- Dejar reposar 30 minutos.

6.- Leer la absorción a 700 nm contra blanco de reactivos.

7.- Obtener resultados en la curva patrón.

Nota: De la solución de ácido úrico (100 mg/100 ml) medir 5 ml en un matraz volumétrico de 200 ml y aforar con agua destilada. La concentración que se obtiene es de 1.5 mg/100 ml.

8.- Curva patrón:

Colocar 6 tubos y añadir:

Sol. patrón diluida de ácido úrico (1.5 mg/100 ml) (ml)	Agua destilada (ml)	mg/100 ml de ácido úrico
2	8	3
4	6	6
6	4	9
8	2	12
10	0	15

De cada uno de los tubos tomar 5 ml y proseguir en el punto 2 del método (19,20,91).

## F) Proteínas totales y relación albúmina y globulina.

En el hígado se produce toda la albúmina y la mayor parte de las globulinas (en el sistema retículo endotelial se produce una parte de las gammaglobulina). Las anomalías de las proteínas plasmáticas no indican una enfermedad específica sino un estado que altera los tejidos responsables del balance entre la síntesis de proteínas y el catabolismo. Para interpretar la concentración total de proteínas, deben conocerse también las cantidades de albúmina y globulinas, ya que una disminución en una fracción puede enmascarse con el aumento en la otra (7,24,26).

### I.- Técnica de Biuret.

#### a.- Fundamento.

Las proteínas dan una coloración violeta en presencia de iones cúpricos en solución alcalina, color que es proporcional a la cantidad de proteínas presentes.

#### b.- Material y equipo.

Tubos de ensayo de 100 X 10 mm y 125 X 15 mm.

Pipetas de 1 ml y 10 ml.

Centrífuga clínica.

Estufa a 37° C.

Espectrofotómetro.

Cloruro de sodio 0.85%.

Reactivo de Biuret.

Sulfato de sodio 26.8%.

Ether sulfúrico anhidro.

Agua destilada.

Suero control conteniendo versatol 7 g/100 ml de proteínas totales.

Material biológico: Suero.

#### c.- Método.

1.- En un tubo de ensayo colocar 0.5 ml de suero.

2.- Agregar 9.5 ml de cloruro de sodio 0.85% y mezclar.

- 3.- Tomar 2 ml de la muestra diluida y colocarlos en otro tubo.
- 4.- Agregar 8 ml de reactivo de Biuret y mezclar por inversión.
- 5.- Dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 6.- Leer la absorción a 540 nm contra blanco de reactivos.

### Seroalbúmina.

#### a.- Fundamento .

Al agregar sulfato de sodio a una muestra de suero, se precipitan las globulinas quedando en solución las albúminas séricas, restando del valor de las proteínas totales el de las albúminas se obtiene, por diferencia, el valor de las seroglobulinas precipitadas.

#### b.- Material y equipo.

Igual al de proteínas totales.

#### c.- Método.

En un tubo de ensaye poner 9.5 ml de sulfato de sodio al 26.8%, agregar 0.5 ml de suero. Tapar el tubo, agitarlo bien y poner en estufa a 37° C durante 24 horas. Agregar ether sulfúrico anhidro 2 ml, centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos y del líquido transparente tomar 2 ml y añadir 8 ml de reactivo de Biuret. Leer a 540 nm de absorción contra blanco de reactivos. Antes de leer dejar reposar 30 minutos.

#### Curva patrón:

Tanto para proteínas totales como para albúmina.

Colocar 5 tubos de ensaye:

Versatol (ml) (7 g/100 ml)	Solución salina (ml)	g de proteína en 100 ml
0.0	2.0	0 (blanco)
0.5	1.5	1.75
1.0	1.0	3.5
1.5	0.5	5.25
2.0	0.0	7

Tomar 0.5 ml de cada tubo de ensaye y continuar en el punto 2 del método para proteínas totales (19,112,126).

### G) Colesterol.

El colesterol es un alcohol esteroide del tipo de los lípidos. La síntesis del colesterol ocurre sobre todo a nivel hepático, sintetizándose en menor grado en otros tejidos incluyendo corteza adrenal, ovarios, testículos y epitelio intestinal (7,26,99).

Su conversión en ácidos biliares y la excreción de esteroides neutros a través de la bilis y heces es papel del hígado, por el cual se elimina el 90% de la excreción total, siendo el otro 10% eliminado por orina, este pequeño porcentaje viene de la conjugación y degradación de la síntesis de hormonas esteroideas.

I.- Técnica de Schoenheimer, Zak y Ferro Ham.

#### a.- Fundamento.

El ácido acético, el anhídrido acético y el ácido sulfúrico producen con el colesterol un compuesto de color verde cuya intensidad es proporcional a la concentración de colesterol existente.

#### b.- Material y equipo.

Tubos de ensayo 100 X 10 mm.

Pipetas graduadas de 1 ml y 5 ml.

Espectrofotómetro.

Acido sulfúrico al 97%.

Reactivo de colesterol.

Solución patrón de colesterol 400 mg/100 ml.

Agua destilada.

Material biológico: Suero.

#### c.- Método.

Colocar 3 tubos:

	Problema	Patrón	Blanco
Suero	0.5 ml	----	----
Solución patrón de colesterol	----	0.5 ml	----
Agua destilada	----	----	0.5 ml
Reac. de colesterol	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

A los 30 minutos aproximadamente agregar a cada tubo directamente sobre la superficie del líquido 0.5 ml de ácido sulfúrico al 97%. Agitar los tubos durante 10 minutos.

Agitar fuertemente los tubos para desprender las proteínas que puedan haberse quedado adheridas a la pared del tubo.

Después de 20 minutos leer la absorción del problema y patrón contra blanco de reactivos a 600 nm.

Cálculo:

$$\frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. patrón}} \times 420 = \text{mg/100 ml de sangre.}$$

Nota: Deben prepararse 2 tubos blancos y 2 patrones.  
(49,107,118,140).

## H) Creatinfosfocinasa (CPK o CK).

Esta enzima se encuentra principalmente en el músculo esquelético y cardiaco, y en menor proporción en cerebro, por lo tanto, se encuentra aumentada en daño al músculo esquelético y en menor proporción en infarto al miocardio (7).

### I.- Técnica de Merck.

#### a.- Fundamento.

La enzima CPK cataliza la transferencia de un grupo fosfato del 5-trifosfato de adenosina a la creatina. En una doble reacción la piruvatocinasa cataliza la transferencia del grupo fosfo-enol-piruvato al 5-difosfato de adenosina, formando 5 trifosfato de adenosina y piruvato, este piruvato reacciona con la 2,4 dinitrofenilhidrazina e hidróxido de sodio y forma la hidrazona de color amarillo, cuya intensidad es proporcional a la actividad de la enzima.

#### b.- Material y equipo.

Pipetas graduadas de 1 ml, 5 ml y 10 ml.

Tubos de ensaye 18 X 150 mm.

Baño maría a 37° C.

Espectrofotómetro.

Sustrato de creatina.

Sustrato de CPK.

Solución de 2, 4-dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico.

Solución de ácido fosfo-enol-pirúvico y creatina.

Solución de piruvato 0.5 moles/ml.

Solución de hidróxido de sodio 4 N y EDTA.

Material biológico: Suero.

#### c.- Método.

Se preparan 2 soluciones, el sustrato de CPK y el blanco de sustrato.

- 1.- Se reconstituye el sustrato CPK con 5.5 ml de sustrato de creatina, si se efectúan más de 5 pruebas, y con 1.2 ml de sustrato de creatina si se efectúan menos de 5 pruebas.
- 2.- Se reconstituye 1 ml de sustrato de CPK con 5.5 ml de ácido

fosfo-enol-pirúvico y creatina, o con 1.2 ml dependiendo del número de pruebas a realizar.

3.- Colocar 3 tubos de ensaye:

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
Sustrato de CPK 1 ml	Acido fosfo-enol pirúvico 1 ml	Acido fosfo-enol pirúvico 1 ml
Colocar los tres tubos a 37° C durante 5 minutos.		
Suero problema 0.1 ml	Suero problema 0.1 ml	Agua destilada 0.1 ml

Incubar a 37° C durante 30 minutos.

Añadir 1 ml de solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina en HCl.

Dejar reposar 20 minutos.

Añadir 10 ml de hidróxido de sodio 4 N y EDTA.

Mezclar perfectamente y dejar reposar 15 minutos.

Leer la absorción del blanco de problema y problema contra el blanco de sustrato.

Curva de calibración:

Sustrato CPK Sol. de piruvato 0.5 moles/ml (ml)	Agua destilada (ml)	Actividad U.I. Unidades CPK
0	1.1	0
0.2	0.9	33
0.4	0.7	67
0.6	0.5	100
0.8	0.3	133

Incubar a 37° C durante 30 minutos continuando los pasos indicados del método.

Cálculos:

Determinar las unidades del problema y del blanco en la curva, restar a las unidades problema las unidades del blanco y se obtienen las unidades de CPK (2,29,100).

Preparación de reactivos utilizados en las pruebas de química sanguínea.

a) Acido sulfúrico 0.666 N (2/3 N).

Acido sulfúrico 0.66 g.  
Agua destilada c.b.p. 1000 ml.

b) Tungstato de sodio al 10%.

Tungstato de sodio 100 g.  
Agua destilada c.b.p. 1000 ml.

Colocar en frasco color ambar y tapado.

c) Solución de sulfato de cobre alcalina.

Fosfato disódico hidratado 29 g.  
Tartrato sódico potásico 40 g.  
Hidróxido de sodio 1.0 N 100 ml.  
Sulfato de cobre pentahidratado 80 ml.  
Sulfato sódico anhídrido 180 g.

Disolver el fosfato disódico y el tartrato en 700 ml de agua destilada se agrega el hidróxido de sodio y, agitando se agrega la solución de sulfato de cobre. Se agrega el sulfato sódico anhídrido mezclar y aforar a un litro con agua destilada. Dejar en reposo 2 días para separar sales de cobre precipitadas.

d) Solución de arsenomolibdato.

Molibdato amónico 50 g.  
Acido sulfúrico concentrado 42 ml.  
Arseniato sódico 6 g.  
Agua destilada 950 ml.

El color debe ser amarillo, si es azul verdoso desecharse.

e) Solución de glucosa al 1%.

Se trasfiere 1 gramo de glucosa grado reactivo (dextrosa en el mercado), a un matraz volumétrico de 100 ml, diluir hasta la marca con solución de ácido benzoico al 2%. Se guarda en un frasco color ámbar y el refrigeración.

- f) Reactivo de ortotoluidina.
- |                       |         |
|-----------------------|---------|
| Tiourea               | 1.5 g.  |
| Ortotoluidina         | 60 ml.  |
| Acido acético glacial | 940 ml. |
- g) Solución patrón de glucosa. Dextrosa 100 mg/100 ml.
- |                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Dextrosa                      | 100 mg. |
| Acido benzoico al 0.2% c.b.p. | 100 ml. |
- Disolver y aforar.
- h) Solución patrón de urea al 3%.
- |                |         |
|----------------|---------|
| Urea q. p.     | 3.0 g.  |
| Agua destilada | 100 ml. |
- i) Solución de ácido pícrico 0.04 M.
- |                       |          |
|-----------------------|----------|
| Acido pícrico         | 10 g.    |
| Agua destilada c.b.p. | 1000 ml. |
- Disolver en agua caliente y aforar.
- j) Solución de hidróxido de sodio 0.75 N.
- |                       |          |
|-----------------------|----------|
| Hidróxido de sodio    | 30 g.    |
| Agua destilada c.b.p. | 1000 ml. |
- Disolver, aforar y titular.
- k) Solución de creatinina 1 mg/ml.
- |                          |          |
|--------------------------|----------|
| Creatinina               | 1 g.     |
| Acido clorhídrico c.b.p. | 1000 ml. |
- Disolver y aforar.
- l) Solución diluida de creatinina.
- |                                |         |
|--------------------------------|---------|
| Solución de creatinina 1 mg/ml | 10 ml.  |
| Acido clorhídrico c.b.p.       | 100 ml. |
- m) Solución de carbonato de sodio al 10%.
- |                            |          |
|----------------------------|----------|
| Carbonato de sodio anhidro | 100 g.   |
| Agua destilada c.b.p.      | 1000 ml. |
- n) Reactivo de ácido fosfotúngstico Folin y Denis.
- |                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| Tungstato de sodio libre de molibdato | 50 g.   |
| Agua destilada                        | 400 ml. |
| Acido ortofosfórico                   | 40 ml.  |
- Disolver y mezclar, poner a reflujo durante 2 horas, enfriar a temperatura ambiente.

n) Acido fosfotungstico diluido.

Medir 10 ml del reactivo anterior y aforar a 100 ml con agua destilada.

o) Solución de ácido úrico 100 mg/100 ml.

Acido úrico	1 g.
Carbonato de litio	0.6 g.
Formaldehído 40%	20 ml.
Acido sulfúrico 97%	25 ml.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

Mezclar y aforar.

p) Cloruro de sodio 0.85%.

Cloruro de sodio	8.5 g.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

Disolver y aforar.

q) Reactivo de Biuret.

Sulfato de cobre	1.5 g.
Tartrato de Na y K	6.0 g.
Yoduro de potasio	1.0 g.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

En un matraz volumétrico de 1000 ml colocar el sulfato de cobre y el tartrato de sodio y potasio, agregar aproximadamente 500 ml de agua destilada y agitar hasta disolución; agregar con agitación constante 300 ml de hidróxido de sodio 2:5 N y mezclar. Agregar el yoduro de potasio y agitar hasta disolución. Aforar hasta un litro y conservar en un frasco oscuro. Se descarta a la aparición de un precipitado negro o rojo.

r) Hidróxido de sodio 2.5% para reactivo de Biuret.

Hidróxido de sodio	25 g.
Agua libre de CO <sub>2</sub> (hervida)	1000 ml.

Disolver y aforar.

Diluir 20 ml de la solución anterior a 100 ml de agua destilada y titular con ácido clorhídrico 0.5 N usando fenolftaleína como indicador, se deben gastar 20 ml de la solución de HCl 0.5 N.

- s) Sulfato de sodio al 26.8%.  
Sulfato de sodio 268 g.  
Agua destilada c.b.p. 1000 ml.  
Disolver y aforar.
- t) Reactivo de colesterol.  
Anhídrido acético 450 ml.  
Acido acético 450 ml.  
Acido sulfúrico 100 ml.  
Mezclar y conservar en refrigeración.
- u) Solución de colesterol 400 mg/100 ml.  
Colesterol 4 g.  
Acido acético glacial c.b.p. 1000 ml.  
Disolver y aforar.
- v) Acido sulfúrico 97%.  
Acido sulfúrico 970 ml.  
Agua destilada c.b.p. 1000 ml.

## 5.- PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPATICO.

El hígado es un órgano de variadas actividades metabólicas importantes para el equilibrio orgánico del cuerpo, entre algunas de las más importantes están: Producción y secreción de la bilis, detoxificación del organismo, almacén de glucógeno, almacén de vitaminas (A, K, complejo B), gluconeogénesis, transformación de amoniaco a urea, síntesis de aminoácidos, síntesis de ácidos grasos, almacén o reservorio de sangre, síntesis de la mayoría de las proteínas plasmáticas y forma parte del sistema de defensa (12, 42).

La selección de las pruebas de función hepática a elegir están sujetas a serias limitaciones:

Las funciones del hígado son variadas y en caso de enfermedad no se ven afectadas de la misma manera, lo que sucede solo en caso de que se dañe de un 60 a 80% del órgano. La reserva funcional hepática es tan grande, que casi la totalidad del órgano puede encontrarse destruido antes de que se haya detectado alguna anormalidad.

La regeneración de las células hepáticas es activa, y la función del tejido nuevo rápidamente compensa la pérdida, a menos que el daño sea generalizado.

El trastorno funcional del hígado puede presentarse antes de que se detecte la lesión tardíamente, por examen histopatológico, inclusive puede ser al inicio de la lesión: pero también es posible detectarlo hasta la necropsia y el examen histopatológico (63).

Todas las pruebas de función hepática pueden ser clasificadas por el tipo de función buscada. Con este criterio las dividimos en las siguientes categorías:

1.- Pruebas que dependen fundamentalmente de secreciones o excreciones hepáticas:

a) Pigmentos biliares.

b) Depuración de sustancias extrañas del suero.

2.- Pruebas que dependen de funciones bioquímicas específicas.

- a) Pruebas del metabolismo de las proteínas.
- b) Pruebas del metabolismo de los lípidos.
- c) Pruebas del metabolismo de los carbohidratos.

3.- Pruebas en las que se mide la actividad de las enzimas en el suero.

- a) Fosfatasa.
- b) Transaminasa.
- c) Otras pruebas enzimáticas (26,102).

#### A) Bilirrubina total, directa e indirecta.

La bilirrubina es formada en un 85% a partir de la hemoglobina liberada de los eritrocitos viejos que se destruyen en las células retículoendoteliales del bazo. Así, se separan la porfirina del hierro y las fracciones de globina de la molécula, abriéndose el anillo para formar la biliverdina, que por acción de la enzima biliverdina reductasa forma la bilirrubina (libre), que es transportada a través de la sangre hacia el hígado unida a una albúmina y a una globulina alfa-1.

La bilirrubina libre se le conoce como indirecta, debido a que en el laboratorio reacciona con el diazo reactivo de Ehrlich solamente en presencia de alcohol (también se le conoce como bilirrubina no conjugada). Esta bilirrubina es insoluble en agua debido a su unión con una albúmina y una globulina alfa-1, de tal modo, que no puede ser eliminada por riñón o hígado como tal.

El hepatocito actúa sobre la bilirrubina libre, aumentando su solubilidad, pues elimina las proteínas y conjuga la bilirrubina con el ácido glucorónico. Esta bilirrubina también es conocida como bilirrubina directa, ya que reacciona con el diazo reactivo de Ehrlich en agua, sin necesidad de alcohol en la reacción (62,70,132).

Las determinaciones de bilirrubina en suero son útiles para diferenciar las enfermedades que se acompañan de hiperbilirrubinemia no conjugada (ictericia prehepática), de las que causan de preferencia hiperbilirrubinemia conjugada (ictericia hepática y posthepática), pero esta última no es de valor para diferenciar una ictericia por enfermedad hepatocelular de la colestasis posthepática o extrahepática (7,24,45).

##### I.- Técnica de Malloy-Evelin.

###### a.- Fundamento.

La bilirrubina forma con el ácido sulfanílico diazotado, un colorante azoico que en solución neutra es rojo y en solución alcalina es azul.

El glucorónido de bilirrubina hidrosoluble reacciona "directamente", mientras que la bilirrubina "indirecta" libre reacciona tan solo en presencia de un solvente adecuado (en el cual reaccionan ambas).

b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye 10 X 100 mm.

Pipetas graduadas de 1 ml, 5 ml, 10 ml.

Espectrofotómetro.

Reactivo diazo blanco.

Reactivo diazo A.

Reactivo diazo B.

Solución diluída de bilirrubina 0.02 mg en 1.0 ml de cloroformo.

Diazo reactivo Ehrlich.

Material biológico: Suero reciente y protegido de la luz.

c.- Método.

1.- Diluir 1 ml de suero con 9 ml de agua destilada.

2.- Colocar 4 tubos de ensaye marcados de la siguiente manera:

	Blanco directo	Problema directo	Blanco total	Problema total
Agua destilada	5 ml	5 ml	--	--
Alcohol metílico	--	--	5 ml	5 ml
Diazo blanco	1 ml	--	1 ml	--
Diazo Ehrlich	--	1 ml	--	1 ml
Suero diluído	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml

3.- Dejar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

4.- Leer la absorción a 540 nm los tubos problema, contra los tubos blanco respectivos.

5.- Curva patrón:

Reconstituir un versatol pediátrico de concentración 20 mg en 100 ml de cloroformo.

Colocar 5 tubos de ensaye:

Agua destilada (ml)	Alcohol me tílico (ml)	Versatol 20 mg/100ml (ml)	Equivalencia mg/100 ml de bilirrubina
4.0	5.0	0.0	0
3.5	5.0	0.5	2.5
3.0	5.0	1.0	5.0
2.5	5.0	1.5	7.5
2.0	5.0	2.0	10.0

Agregar a cada tubo 1 ml de diazo reactivo Ehrlich.

Dejar reposar durante 20 minutos.

Leer a 540 nm calibrando con el primer tubo y realizar la curva patrón.

Obtención de la bilirrubina indirecta.

Cálculos:

Bilirrubina total - bilirrubina directa = bilirrubina  
indirecta.

(11,72,94).

B) Transaminasa glutámico oxalacética (TGO).  
(Aspartato amino transferasa).

Las concentraciones mas elevadas de esta enzima se encuentran en células musculares, con cantidades menores en el hígado y en el músculo cardiaco, la TGO no es específica de un órgano (7,96).

La TGO cataliza la transferencia del grupo alfa-amino del ácido aspártico al ácido alfa-cetoglutarico, produciendo ácido oxalacético y ácido glutámico respectivamente.

Se ha propuesto el término aspartato amino transferasa en lugar de TGO, pero el término antiguo ya se ha generalizado en la práctica clínica (7).

I.- Técnica de Reitman-Frankel.

a.- Fundamento.

La TGO cataliza la transferencia del grupo amino del ácido aspártico al ácido cetoglutarico, formando como uno de los productos ácido oxalacético que reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidrazina, dando origen al acetohidrazona que en presencia de hidróxido de sodio produce una coloración café intensa proporcional a la cantidad de ácido oxalacético presente en la muestra.

b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye 10 X 100 mm.

Pipetas graduadas de 1 ml y 10 ml.

Baño maría a 37° C.

Espectrofotómetro.

Agua destilada.

Sustrato para TGO.

Solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina.

Hidróxido de sodio 0.4 N.

Amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4.

Suero control conteniendo versatel con 331 Unidades.

Material biológico: Suero.

c.- Método.

1.- A 1 ml de sustrato de TGO precalentado 5 minutos a 37° C

añadir 0.2 ml de suero y mezclar.

- 2.- Incubar a 37° C durante 60 minutos.
- 3.- Añadir 1 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina, mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- 4.- Agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0.4 N y mezclar, dejar reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 5.- Leer a 505 nm contra blanco de reactivos.
- 6.- Obtener resultados interpolando en la curva patrón.
- 7.- Curva patrón:

Colocar 6 tubos de ensaye y agregar:

Sustrato	Versatol	Agua destilada	Unidades
TGC (ml)	diluido (ml)	(ml)	X 10 ml
2.0	0	0.4	0 (blanco)
1.8	0.2	0.4	132.2
1.6	0.4	0.4	198.4
1.4	0.6	0.4	232.6
1.2	0.8	0.4	265.8
1.0	1.0	0.4	331.0

Proseguir en el punto 2 del método, tomando 1.2 ml de cada tubo, hacerlo con todos los tubos (113,133).

Factores de conversión (Unidades X factor = Unidades Internacionales).

Reitman-Frankel = 0.48.

SIGMA = 0.48.

Karmen = 0.48.

Aunque Reitman-Frankel han fijado las unidades de esta prueba colorimétrica, en sueros patológicos frecuentemente no es posible la conversión exacta de los resultados. Esto se debe a que se determinan distintas magnitudes. En los distintos sueros la relación de estas magnitudes puede diferir en un + 20% aproximadamente (100).

C) Transaminasa glutámico pirúvica (TCP).

(Alanina amino transferasa).

Las cantidades más grandes de TGP se encuentran en los hepatocitos de los perros, gatos y primates, proporcionándoles una enzima que es específica del daño hepatocelular en todas estas especies. En el tejido hepático del caballo, bovino, ovino y cerdo existe una pequeña cantidad de TGP, por lo que no está indicado su uso en estas especies (7,67).

La TGP cataliza la transferencia del grupo alfa-amino de la alanina a ácido alfa-cetoglutarico produciendo ácido pirúvico y glutámico respectivamente.

Se ha propuesto el término de alanina amino transferasa en lugar de TGP, pero el término antiguo ya se ha generalizado en la práctica clínica (7).

I.- Técnica de Reitman-Frankel.

a.- Fundamento.

La TGP cataliza la transferencia de un grupo amino de la DL-alanina, al alfa-cetoglutarico, formando como uno de los productos de la reacción ácido pirúvico que reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidrazina y da origen a la cetohidrazona que en presencia de hidróxido de sodio producen una coloración café intensa que es proporcional a la cantidad de ácido pirúvico presente en la muestra.

b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye 10 X 100 mm.

Pipetas graduadas de 1 ml y 10 ml.

Baño maría a 37° C.

Espectrofotómetro.

Agua destilada.

Sustrato para TGP.

Solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina.

Hidróxido de sodio 0.4 N.

Amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4.

Suero control conteniendo versatol con 65 Unidades.

Material biológico: Suero.

c.- Método.

- 1.- A 1 ml de sustrato de TGP precalentado a 37° C añadir 0.2 ml de suero y mezclar.
- 2.- Incubar a 37° C durante 30 minutos.
- 3.- Añadir 1 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina, mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- 4.- Agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0.4 N, mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 5.- Leer a 505 nm contra blanco de reactivos.
- 6.- Obtener resultados en la curva patrón.
- 7.- Curva patrón:

Colocar 5 tubos de ensaye y agregar:

Sustrato	Versatol	Agua destilada	Unidades
TGP (ml)	(ml)	(ml)	por ml
1.0	0	0.2	0 (blanco)
0.9	0.2	0.2	65.0
0.7	0.3	0.2	97.5
0.6	0.4	0.2	130.0
0.5	0.5	0.2	162.5

Proseguir en el punto 2 del método, con todos los tubos (113,133).

Factores de conversión (Unidades por factor = Unidades Internacionales).

Reitman-Frankel = 0.48.

SIGMA = 0.48.

Karmen = 0.48.

Aunque Reitman-Frankel han fijado las unidades de esta prueba colorimétrica, en sueros patológicos frecuentemente no es posible la conversión exacta de los resultados. Esto se debe a que se determinan distintas magnitudes. En los distintos sueros la relación de estas magnitudes puede diferir en un  $\pm 20\%$  aproximadamente (100).

D) Prueba de enturbiamiento por timol.

Esta prueba en medicina veterinaria es un poco empírica ya que puede darnos resultados falsos por la relación albúmina-globulina que en los animales domésticos puede ser menor de uno.

Esta prueba puede ser útil en pacientes con enfermedad hepática parenquimatosa.

I.- Técnica de MacLagan.

a.- Fundamento.

El suero de pacientes con enfermedades hepáticas parenquimatosas al ser mezclado con timol en solución amortiguadora tamponada a pH de 7.55 produce turbidez y floculación, por la formación de un complejo proteína-timol-fosfolípido.

b.- Material y equipo.

Matraz aforado de 100 ml.

Tubos de ensaye de 15 X 125 mm.

Pipetas graduadas de 1 ml y 10 ml.

Espectrofotómetro.

Solución amortiguadora de timol.

Cloruro de bario 0.0962 N.

Acido sulfúrico 0.2 N.

Material biológico: Suero.

c.- Método.

Determinación nefelométrica:

Colocar y marcar 2 tubos de la siguiente manera:

	Problema	Blanco
Suero	0.1 ml	0.1 ml
Solución amortiguadora de timol	6.0 ml	--
Solución salina fisiológica	--	6.0 ml

Mezclar, agitar después de 30 minutos y leer a 578 nm el tubo problema contra el blanco.

Obtener resultados interpolando en la curva patrón.

Curva patrón:

Acido sulfúrico	Cloruro de bario	Unidades
0.2 N (ml)	0.0962 N (ml)	por ml
10.0	0	0
8.65	1.35	5
5.95	4.05	15
3.25	6.75	25
0.55	9.45	35

Tomar 0.1 ml y tratarlos igual que el problema y el blanco (92,112).

E) Proteínas totales. Consultar química sanguínea (pag. 93).

F) Urobilinógeno en orina. Consultar examen general de orina, examen químico (pag. 27).

G) Deshidrogenasa láctica (DHL).

Esta enzima cataliza la oxidación reversible del ácido láctico en ácido pirúvico (132).

La DHL se localiza en los tejidos del cuerpo que utilizan glucosa para obtener energía. No es específica de algún órgano debido a su gran concentración en muchos de éstos (a menos que se emplee el análisis de las isoenzimas mediante electroforesis), se eleva principalmente en procesos de necrosis celular y se observa con frecuencia en linfosarcoma bovino; probablemente se asocia necrosis del tumor o necrosis secundaria de los tejidos afectados (7,99).

I.- Técnica de Cabaud y Wrolewski (Dade).

a.- Fundamento.

La DHL reduce el ácido pirúvico en presencia de difosfopiridin nucleótido reducido (DPNH), y lo convierte en ácido láctico. Después de esta reducción el resto del ácido pirúvico se hace reaccionar con dinitrofenilhidrazina y forma piruvato-dinitrofenilhidrazona, ésta con una solución alcalina forma un compuesto cuyo color es proporcional a la cantidad de ácido pirúvico presente.

La dinitrofenilhidrazina detiene la acción de la DHL. Mientras mayor sea la actividad de la DHL, menor será la cantidad de ácido pirúvico que quede sin ser convertido a ácido láctico.

b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye 15 X 150 mm.

Pipetas graduadas de 1 ml y 10 ml.

Baño maría 37° C.

Espectrofotómetro.

Agua destilada.

Equipo para determinar DHL.

Material biológico: Suero.

c.- Método.

- 1.- Colocar en un tubo de ensaye 1 ml de sustrato (que se prepara en el momento de usarse), se disuelve el DPNH del frasco en 1 ml de solución amortiguadora con piruvato.
- 2.- Incubar en baño maría a 37° C durante 5 minutos.
- 3.- Agregar 0.1 ml de suero diluido 1:6 con agua destilada.
- 4.- Incubar en baño maría a 37° C durante 30 minutos.
- 5.- Agregar 1 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina.
- 6.- Dejar reposar 20 minutos.
- 7.- Agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0.4 N, mezclar y esperar 5 minutos.
- 8.- Leer a 505 nm contra blanco de agua destilada.
- 9.- Convertir el porcentaje de transmitancia a Unidades de DHL/ml según la curva patrón.

Si el resultado es mayor de 2000 Unidades, la determinación se repite haciendo una dilución de 1:5 de la dilución del suero del paso 3 y el resultado se multiplica por 5.

10.- Curva patrón:

Colocar 6 tubos y agregar:

Solución de sustrato (ml)	Agua destilada (ml)	Unidades de DHL en 1.0 ml de suero
1.0	0.1	0
0.8	0.3	280
0.6	0.5	640
0.4	0.7	1040
0.2	0.9	1530
0.1	1.0	2000

Añadir a cada tubo 1 ml de reactivo de color DPNH, y mezclar, dejar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Añadir a cada tubo 10 ml de solución de hidróxido de sodio 0.4 N, mezclar y dejar a temperatura ambiente 5 minutos.

Leer a 505 nm (6).

## H) Fosfatasa alcalina sérica (FAS).

Las fosfatasas son agentes que hidrolizan los ésteres fosfóricos con liberación de fosfato inorgánico. En la sangre se hallan dos tipos principales: La fosfatasa alcalina con pH óptimo entre 9 y 10, y la fosfatasa ácida cuya actividad enzimática principal se halla a un pH aproximado de 4 a 5 (19).

Las fosfatasas alcalinas participan en la hidrólisis de los monoésteres del fosfato a un pH alcalino. Las fosfatasas alcalinas están muy difundidas en el organismo, principalmente en los huesos (osteoblastos), mucosa intestinal, células de los túbulos renales y la bilis. El principal lugar de su función es en el interior de las células, a excepción de los osteoblastos donde actúa principalmente en una localización extracelular (7,132).

I.- Técnica de A. Bessey & Lowry (Merckotest).

### a.- Fundamento.

Para la determinación de la fosfatasa se utiliza p-nitrofenilfosfato, que por la acción de la enzima se convierte en p-nitrofenol y ácido fosfórico. Añadiendo hidróxido de sodio se interrumpe la acción. El p-nitrofenol liberado se encuentra en forma de anión color amarillo, que puede determinarse fotométricamente. La cantidad de p-nitrofenol liberado en la unidad de tiempo es directamente proporcional a la actividad de la fosfatasa.

### b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye 15 X 150 mm.

Pipetas graduadas de 1 ml y 10 ml.

Baño maría a 37° C.

Espectrofotómetro.

Sustrato amortiguador pH de 10.3.

Hidróxido de sodio 0.02 N.

Material biológico: Suero.

c.- Método.

- 1.- Marcar 2 tubos de ensaye, uno con la letra P (Problema), y el otro con la letra B (Blanco).
- 2.- Añadir a cada tubo 1.0 ml de sustrato amortiguador.
- 3.- Colocar los tubos en baño maría a 37° C durante 5 minutos.
- 4.- Agregar al tubo "P" 0.1 ml de suero y mezclar.
- 5.- Incubar los tubos en baño maría a 37° C durante 30 minutos.
- 6.- Agregar a los dos tubos 10.0 ml de hidróxido de sodio y mezclar.
- 7.- Agregar al tubo blanco 0.1 ml de suero y mezclar.
- 8.- Medir la absorción del problema contra el blanco a 405 nm.
- 9.- Cálculos:

D.O. del problema X 200 = mU/ml (U/L) (9,10,100).

I) Fosfatasa ácida.

Las determinaciones de fosfatasa ácida son raras en animales domésticos, en éstos puede estar elevada en el líquido prostático en relación con hipertrofia o neoplasia de la glándula, aunque en resumen hay escasas pruebas de que esta reacción bioquímica tenga valor diagnóstico en medicina veterinaria (7,99).

J) Colesterol. Consultar química sanguínea (pag. 95).

K) Cefalín colesterol.

I.- Técnica de Hanger.

a.- Fundamento.

Esta prueba se basa en la propiedad que tiene la gammaglobulina de provocar la floculación de las soluciones de cefalín colesterol cuando la concentración de sero-albúmina se encuentra disminuída.

b.- Material y equipo.

Tubos de ensaye 13 X 100 mm.

Pipetas graduadas de 1 ml y 5 ml.

Solución de cloruro de sodio al 0.85%.

Antígeno de cefalín colesterol.

Reactivo diluído de cefalín colesterol.

Material biológico: Suero reciente no hemolizado.

c.- Método.

- 1.- En un tubo de ensaye colocar 0.2 ml de suero.
- 2.- Añadir 4 ml de cloruro de sodio al 0.85% y 1.0 ml de reactivo diluído de cefalín colesterol.
- 3.- Agitar y tapar. Dejar reposar en la oscuridad durante 30 minutos.

Resultados:

Normalmente no debe de haber floculación, si la hay, dependiendo de la intensidad de ésta, se reportará de una a cuatro cruces (97).

L) Prueba de Gros.

a.- Fundamento.

La reacción está basada en la turbidez que produce en el suero por el líquido de Hayem. Esta prueba revela la modificación que hay en el suero en cuanto a la relación albúmina/globulina.

b.- Material y equipo.

Tubo de ensaye 15 X 175 mm.

Bureta.

Pipetas graduadas de 1 ml y 10 ml.

Reactivo de Hayem.

Material biológico: Suero fresco sin refrigerar.

c.- Método.

Colocar en un tubo de ensaye 1 ml de suero y por medio de una bureta agregar el reactivo de Hayem, gota a gota y agitando después de cada adición. El punto final de la reacción se presenta cuando al agregar una gota, ésta provoque la opacidad del suero (estable por un minuto).

Medir el volumen utilizado del reactivo en la bureta.

Normal - Cuando la opacidad se produce con mas de 2 ml de reactivo.

Variaciones - 1.75 ml puede estar entre normal y patológico, menor de esta cantidad indica insuficiencias hepáticas de origen diverso (66).

Preparación de reactivos utilizados en las pruebas de funcionamiento hepático anteriormente citadas (6).

- a) Reactivo de diazo blanco.
- |                       |          |
|-----------------------|----------|
| Acido clorhídrico     | 15 ml.   |
| Agua destilada c.b.p. | 1000 ml. |
- Mezclar y aforar.
- b) Reactivo diazo A.
- |                       |          |
|-----------------------|----------|
| Acido sulfanílico     | 1 g.     |
| Acido clorhídrico     | 15 ml.   |
| Agua destilada c.b.p. | 1000 ml. |
- Disolver el ácido sulfanílico, añadir el ácido clorhídrico y aforar.
- c) Reactivo diazo B.
- |                       |          |
|-----------------------|----------|
| Nitrito de sodio      | 500 g.   |
| Agua destilada c.b.p. | 1000 ml. |
- Disolver y aforar.
- d) Solución diluida de bilirrubina 0.02 mg/1 ml.  
Diluir el versatol pediátrico de 20 mg en 100 ml, 1:10.
- e) Reactivo de Ehrlich.
- |                          |         |
|--------------------------|---------|
| Reactivo diazo A         | 10 ml.  |
| Reactivo diazo B diluido | 0.3 ml. |
- Mezclar, prepararse antes de usarse.
- f) Sustrato para TGO.
- |  |           |
|--|-----------|
| Acido alfa-cetoglutarico                       | 0.292 g.  |
| Acido DL-aspártico                             | 26.6 ml.  |
| Hidróxido de sodio 1 N                         | 200.0 ml. |
| Amortiguador de fosfato<br>0.1 M pH 7.4 c.b.p. | 1000 ml.  |
- Disolver y aforar.
- g) Hidróxido de sodio 0.4 N.
- |                       |          |
|-----------------------|----------|
| Hidróxido de sodio    | 16 g.    |
| Agua destilada c.b.p. | 1000 ml. |
- Disolver y aforar.

- h) Solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina.  
2,4-dinitrofenilhidrazina 0.198 g.  
Acido clorhídrico 1 N c.b.p. 1000 ml.  
Disolver y aforar.
- i) Amortiguador de fosfato 0.1 M pH 7.4.  
1) Solución de fosfato disódico.  
Fosfato disódico 14.2 g.  
Agua destilada c.b.p. 1000 ml.  
Disolver y aforar.  
2) Solución fosfato monopotásico.  
Fosfato monopotásico 13.609 g.  
Agua destilada c.b.p. 1000 ml.  
Disolver y aforar.
- Mezclar 840 ml de la solución 1 y 160 ml de la solución 2,  
si es necesario ajustar el pH a 7.4.
- j) Sustrato para TGP.  
Acido alfa cetoglutárico 0.292 g.  
DL-alanina 17.8 g.  
Agua destilada 200 ml.  
Amortiguador de fosfato  
0.1 M pH 7.4 c.b.p. 1000 ml.  
Disolver y aforar.
- k) Solución amortiguadora con timol.  
Barbital sódico 2.6 g.  
Acido dietilbarbitúrico 2.76 g.  
Timol al 10% 10 ml.  
Agua destilada c.b.p. 1000 ml.  
Disolver, mezclar y aforar.  
Ajustar a 7.5-7.6 de pH.
- l) Cloruro de bario 0.0962 N.  
Cloruro de bario 11.73 g.  
Agua destilada c.b.p. 1000 ml.  
Disolver y aforar.

- m) Acido sulfúrico 0.2 N.  
Acido sulfúrico q. p. 9.8 g.  
Agua destilada c.b.p. 1000 ml.  
Mezclar y aforar.
- n) Sustrato amortiguador (FAS) pH 10.3.  
Glicina 75 g.  
Cloruro de magnesio exahidratado 0.095 g.  
Hidróxido de sodio 1 N 85 ml.  
Agua destilada c.b.p. 1000 ml.  
Disolver la glicina y el cloruro de magnesio, agregar al hidróxido de sodio y aforar con agua destilada.
- ñ) Hidróxido de sodio 0.02 N.  
Hidróxido de sodio 0.08 g.  
Agua destilada c.b.p. 1000 ml.  
Disolver y aforar.
- o) Antígeno de cefalín colestero1.  
Reconstituir de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- p) Equipo para determinar DHL.  
Reconstituir de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- q) Solución de Hayem.  
Cloruro de mercurio 2.5 g.  
Sulfato de sodio cristal 25 g.  
Cloruro de sodio 5 g.  
Agua destilada c.b.p. 1000 ml.

## 6.- PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO PANCREATICO.

El páncreas de los mamíferos tiene doble función. La función hormonal de este órgano se limita a la producción de insulina y glucagón, importantes en el metabolismo de los carbohidratos. La función exócrina del páncreas es la producción de enzimas digestivas, que son secretadas mediante el jugo pancreático hacia el intestino, estas enzimas contienen alto poder digestivo, entre las más importantes se encuentran:

Enzimas proteolíticas.- Tripsinógeno, quimotripsinógeno, proelastasa, procarboxipeptidasas A y B, desoxirribonucleasa y ribonucleasa.

Enzimas amilolíticas.- Amilasa.

Enzimas lipolíticas.- Lipasa y colesterolcínasa (77,85,132, 138).

La mayoría de las enzimas pancreáticas son expulsadas en forma inactiva, llamados zimógenos:

Tripsinógeno. Es activado a tripsina por la enzima intestinal llamada enterocinasa, el producto final de su función son los aminoácidos.

Amilasa pancreática. Es activada por el ion cloro ( $Cl^-$ ), degrada almidones y dextrinas hasta maltosa.

Lipasa pancreática. Es activada por las sales biliares, hidroliza las grasas hasta ácidos grasos y glicerol.

El diagnóstico de las enfermedades pancreáticas, ofrece dificultades en las circunstancias de que los signos clínicos sean atípicos, o de que el cuadro observado sea propio de un trastorno digestivo. En estos casos, las pruebas de laboratorio toman gran importancia diagnóstica; las más comúnmente empleadas para la observación de las anomalías pancreáticas, se fundan en el examen directo de la acción de las enzimas propias (26).

## A) Determinación de amilasa sérica.

La amilasa es sintetizada en el páncreas principalmente (en el perro los niveles séricos se mantienen normales después de la extirpación total del páncreas). Otras fuentes de secreción de amilasa son la mucosa intestinal, hígado y glándulas salivales. La determinación de esta enzima, nos permite tener una ayuda en caso de daño pancreático (necrosis, pancreatitis, abscesos, etc) (3,7,119).

### I.- Técnica de Merck.

#### a.- Fundamento.

La amilasa ("diatasa") degrada el almidón formando dextrinas reductoras y azúcares de bajo peso molecular. En este método, la amilasa, fracción de degradación del almidón, sirve de ensayo para la determinación de la actividad amilolítica, formando una coloración azul por adición de la solución de yodo, mediante la formación de un complejo yodo-almidón.

Como la disminución de la absorción es proporcional a la cantidad de sustrato degradado, es posible calcular la actividad amilolítica. Es un método que presenta sencillez experimental y buena reproductibilidad.

#### b.- Material y equipo.

Tubos de ensayo 15 X 175 mm.

Baño maría a 37° C.

Espectrofotómetro.

Agua destilada.

Sustrato amortiguador.

Reactivo de coloración.

Material biológico: Suero.

#### c.- Método.

Es necesario preparar 1 ó 2 blancos para cada determinación.

	Problema	Blanco
Sustrato amortiguador	1 ml	1 ml
Dejar en baño maría a 37° C durante 5 minutos.		
Suero	0.1 ml	--
Mezclar e incubar 15 minutos a 37° C.		
Agua destilada	10 ml	10 ml
Reactivo de coloración	0.5 ml	0.5 ml

Mezclar y después de 10 minutos medir las extinciones del problema frente a blanco de reactivos a 623 nm.

Cálculo:

$$\frac{\text{D.O. blanco} - \text{D.O. problema}}{\text{D.O. blanco}} \times 100 = \text{Unidades STREET-CLOSE/100 ml.}$$

Unidades STREET-CLOSE X 6 = Unidades X litro (5,26,89,100).

## P) Determinación de lipasa sérica.

La lipasa es una enzima que hidroliza los ésteres de glicero1 de ácidos grasos de cadena larga. La fuente principal de lipasa es el páncreas, y en pequeñas cantidades, lo es la mu-cosa intestinal (7,70).

### I.- Técnica de Merck.

#### a.- Fundamento.

Se incuba una porción de suero con una emulsión de aceite de oliva tamponada con fosfato a pH de 8 durante 3 horas a 37° C, luego se titulan con hidróxido de sodio 0.05 N, los áci-dos grasos liberados, hasta obtener un color azul claro con timolftaleína como indicador.

Nota: Las muestras de suero utilizadas no deben de tener hemólisis, pues la hemoglobina inhibe la actividad de la lipa-sa incluso en un 50% (o ésta interfiere colorimétricamente en la prueba).

#### b.- Material y equipo.

Matraces Erlen meyer 50 ml.

Tubos de ensaye 15 X 175 mm.

Bureta.

Baño maría a 37° C.

Agua destilada.

Emulsión de aceite de oliva.

Solución amortiguadora TRIS (pH 8).

Etanol al 95%.

Indicador de timolftaleína al 1%.

Material biológico: Suero.

#### c.- Método.

Colocar 2 tubos y marcarlos con la letra "P" (Problema) y el otro con la letra "B" (Bianco).

	Problema	Blanco
Agua destilada	1.25 ml	1.25 ml
Emulsión de aceite de oliva	5.0 ml	5.0 ml
Solución amortiguadora TRIS	0.5 ml	0.5 ml
Dejar en baño maría 10 minutos a 37° C.		
Suero	0.5 ml	--

Tapar ambos tubos, agitar bien y ponerlos en baño maría a 37° C durante 3 horas. Después sacar ambos tubos y poner su contenido en un matraz Erlen meyer y enjuagar ambos tubos con 1.5 ml de etanol al 95% y verterlo a sus respectivos matraces. Agregar al tubo blanco 0.5 ml de suero.

Titular, después de agregar a cada matraz 5 gotas del indicador de timolftaleína al 1% y agitar. La titulación se hace con hidróxido de sodio 0.05 N.

Cálculos:

Unidades CHERRY CRANDALL/ml = ml problema - ml blanco.

1 unidad CHERRY CRANDALL = 227 mU/ml (5,6,26,100,124).

C) Determinación de glucosa sanguínea (pag. 84).

D) Prueba de tolerancia a la glucosa.

Mediante esta prueba, se comprueba Diabetes mellitus en un animal, éstos presentan glicemia prolongada después de la administración, ya sea intravenosa u oral de una dosis de glucosa.

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico crónico que se caracteriza por alteraciones en el metabolismo.

Las causas principales pueden ser, una deficiencia relativa o absoluta de insulina para los requerimientos de los tejidos; debida a destrucción de las células de los islotes de Langerhans, con frecuencia acompañada de pancreatitis aguda. Otras causas menos frecuentes son los antagonistas de insulina (anticuerpos anti-insulínicos), exceso de corticosteroides, de ACTH, de hormonas del crecimiento y reacciones de tensión (134).

a.- Método.

1.- Ayuno por 24 horas.

2.- Tolerancia a la glucosa intravenosa.

a) Se administran 0.5 g de glucosa por Kg de peso corporal en solución al 50% después de obtener una muestra de sangre previa a la inyección.

b) Se toman muestras de sangre a intervalos de 30 minutos durante 3 horas, partiendo de la primera toma anterior a la administración de la glucosa.

c) Interpretación.

Animal normal: La glucosa retorna al nivel de ayunas en 60 a 90 minutos.

Animal diabético: Tarda más de 90 minutos en retornar al nivel de ayunas.

Cuando la prueba se hace por vía oral se aplica la misma dosis que por vía intravenosa, solo que en la interpretación, el animal diabético es el que tarda más de 2 horas en retornar a su nivel de ayunas (26,31,134).

## F) Examen de heces.

El examen de las heces se utiliza para buscar deficiencia de enzimas pancreáticas. Es de valor diagnóstico en las enfermedades pancreáticas crónicas como pancreatitis crónica, fibrosis pancreática y atrofia acinar pancreática. El examen de las heces revelará alteraciones macro y microscópicas indicadoras de enfermedad pancreática. Con respecto a la actividad proteolítica, este examen puede también reflejar la disminución de la función pancreática exócrina (7,99,119,123).

### I.- Examen macroscópico.

El examen macroscópico debe hacerse sobre heces frescas, en daño pancreático podemos encontrar:

- Alimentos no digeridos.
- Consistencia semisólida o suave.
- Esteatorrea. La grasa neutra puede brillar.
- Olor fétido o rancio.
- De color pálido. Amarillas o color arcilla (26,119,123).

### II.- Examen microscópico.

1.- Grasa. Mezclar heces y solución salina fisiológica 1:1, tomar una parte de la mezcla y añadirle otra parte igual de colorante Sudan III (partes iguales de alcohol al 70% y acetona con exceso de colorante). Observar al microscopio en un portaobjetos con objetivo 10 X, después de colocar un cubreobjetos sobre la muestra. La grasa en forma de glóbulos aparece con tonos anaranjados o rojos. En casos de deficiencia de lipasa se ve una numerosa presencia de estos glóbulos de tamaño variable y diferentes formas (26,119,123).

2.- Músculo estriado. Las heces diluidas 1:1 en solución salina fisiológica, puestas al microscopio, revelan la presencia de fibras de músculo estriado, de color amarillo brillante. Si las fibras están sin digerir por falta de tripsina, las estriaciones cruzadas son fácilmente visibles. Esta prueba no tendrá valor si no se administró al animal carnes como alimento antes

de la prueba. Un resultado falso positivo puede darse en aumentos de peristalsis, como se observa en la diarrea.

3.- Almidón (amilorrea). Se mezclan las heces con solución de lugol, la cual las tiñe de un color azul negroizo. Tiene poca importancia en la enfermedad pancreática (26,119,123).

### III.- Pruebas de la tripsina fecal.

1.- Prueba del tubo de gelatina. Esta prueba relativamente sencilla se funda en la facultad de la tripsina para atacar la gelatina, de tal manera que, después de la incubación de ella y de la enzima, la gelatina ya no se solidifica. El procedimiento de la técnica es el siguiente:

- a) Un volumen de 9 ml de agua se lleva a un total de 10 ml con la adición de heces, todo lo cual se mezcla bien.
- b) Se calientan 2 ml de una solución de gelatina al 7.5% a 37° C, se añade entonces 1 ml de una solución al 5%, de bicarbonato de sodio y 1 ml de la solución fecal, todo lo cual se mezcla bien. Se prepara una muestra testigo mediante la mezcla en un segundo tubo de 2 ml de gelatina, 1 ml de bicarbonato de sodio y 1 ml de agua destilada.

Se incuban ambos tubos a 37° C por 1 hora.

Se refrigeran a 4° C por 20 minutos.

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

Si no se forma un gel, indica la presencia de tripsina, la cual ha digerido la gelatina.

La formación de un gel, indica la ausencia de tripsina y una insuficiencia pancreática, es necesario comprobar el resultado de manera que en pruebas subsecuentes se obtenga este mismo resultado (26,74).

2.- Prueba de la película. Poner 9 ml de bicarbonato de sodio al 5%, agregando heces para un volumen total de 10 ml. Se mezcla bien.

Se pone una cantidad de esta solución en un tubo de ensaye y se sumerge una tira delgada de una película radiográfica debiendo quedar una pequeña parte de la película fuera de la

solución de heces.

Incubar a 37° C durante 30 minutos.

Lavar la película bajo un chorro suave de agua de la llave.

- a) Una zona clara en la porción sumergida de la película indica la presencia de tripsina.
- b) Con una deficiencia de tripsina la emulsión solo se marcará con el agua o se eliminará parcialmente (26).

IV.- Prueba de absorción de grasa.

1.- Se toma una muestra sanguínea previa, se centrifuga para determinar el grado de lipemia, (el grado de lipemia se observa por una capa blanca formada en la superficie de la muestra centrifugada), se le administran al animal por vía oral 3 ml/Kg de lipomul, el animal debe de estar en ayunas, se toman muestras sanguíneas a las 2 y 3 horas de haber administrado el lipomul, se procesan las muestras de la misma manera que la primera y se determina el grado de lipemia.

- a) Un perro normal debe mostrar un aumento de grasa sérica.
- b) Un suero con deficiencia de lipasa pancreática o con mal absorción, no mostrará lipemia en el suero (26).

Nota: Las muestras sanguíneas pueden procesarse para la determinación de lipasa sérica en forma cuantitativa cuya técnica se explica en la pag. 126 de este capítulo. La determinación cuantitativa se recomienda cuando no es muy urgente la obtención de los resultados (enfermedad pancreática crónica).

## 7.- PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO RENAL.

Por medio de las pruebas de funcionamiento renal en algunas ocasiones, es posible establecer la naturaleza del trastorno. Solo en caso de enfermedad renal severa es posible detectar el disfuncionamiento, ya que los riñones tienen una gran capacidad de reserva. Un trastorno renal solamente se diagnostica cuando más del 50% de las nefronas no funcionan, por lo tanto, el examen general de orina es la única prueba que proporciona ayuda diagnóstica un poco mas temprana.

Las pruebas de funcionamiento renal, determinan el grado de un trastorno en la función, ya que es mejor realizar pruebas seriadas para determinar si el grado de afección es reversible o sigue la evolución de los trastornos renales crónicos. El mayor aporte de las pruebas de función renal es que proporcionan parte de la confirmación sobre la cual deberá basarse un pronóstico. Las determinaciones seriadas son mas confiables que las pruebas sencillas para fines de pronóstico (7).

Se conocen varios procedimientos prácticos satisfactorios para dar información cuantitativa sobre algunas fases esenciales de la actividad funcional del riñón. Los métodos de estudio se clasifican en las siguientes categorías (26).

- a) Estudio sobre la facultad del riñón de excretar determinados colorantes. Fenolsulfonftaleína (FSF).
- b) Pruebas basadas en el concepto de depuración. Depuración de creatinina endógena, urea, paramino hipurato.
- c) Estimación de la concentración de sustancias nitrogenadas en la sangre. Urea (NUS), creatinina.
- d) Examen general de orina.

## A) Excreción de fenolsulfonftaleína (FSF).

La excreción de FSF es más importante para detectar un defecto de la capacidad excretora tubular y por reducción de la corriente sanguínea en el riñón, que por las alteraciones de la función glomerular. Esta prueba parece ser más aplicable para tasar la función renal en la especie canina (7,26).

### a.- Fundamento.

Después de ser inyectado el colorante FSF se elimina casi en su totalidad por orina. La mayor proporción se elimina del plasma por excreción tubular, en tanto una mínima fracción se elimina por filtración glomerular.

### b.- Material y equipo.

Colorante FSF.

Hidróxido de sodio 2.5 N.

Hidróxido de sodio 100% 100 ml

Agua destilada c.b.p. 1000 ml (6)

Agua corriente.

Agua destilada.

Sonda gástrica.

Sonda uretral.

Cronómetro o reloj.

Matraz volumétrico 1000 ml.

Espectrofotómetro

Pipeta 5 ml.

### c.- Método.

Inyectar al animal por vía endovenosa 10 ml (6 mg) de FSF (presentación comercial). Si es necesario tranquilizar al animal.

A los veinte minutos vaciar la vejiga del animal por sondeo e inmediatamente después, administrar agua corriente por sondeo gástrico a razón de 40 ml/Kg de peso corporal.

Quince minutos después vaciar nuevamente la vejiga y lavándola con solución fisiológica (20-50 ml). Recoger la orina y el lavado en un recipiente limpio.

Colocar la orina lavada en un matraz volumétrico de 1000 ml.

Diluir hasta 500 ml con agua destilada.

Si la muestra queda clara utilizarla inmediatamente, si es turbia hacer un filtrado y proceder.

Añadir el hidróxido de sodio lentamente por medio de la pipeta hasta obtener el máximo de color azul púrpura (1.0 ml).

Leer a 550 nm contra blanco de agua destilada.

Obtener resultados en la curva patrón:

Colorante FSF (6 mg/10 ml) ml	Hidróxido de sodio (ml)	Agua destilada (ml)
0 (0%)	1.0	c.b.p. 500 ml
2	1.0	c.b.p. 500 ml
4	1.0	c.b.p. 500 ml
6	1.0	c.b.p. 500 ml
8	1.0	c.b.p. 500 ml
10 (100%)	1.0	c.b.p. 500 ml

Valores normales:

20-30% de colorante excretado a los 15 minutos (3,7,36,73,83).

### B) Depuración renal.

La "Depuración renal", es la expresión cuantitativa de la velocidad con la que el riñón excreta una sustancia en la orina, en relación a la concentración de esa misma sustancia en el plasma sanguíneo.

En realidad ninguna sustancia es completamente eliminada del plasma cuando pasa a través del riñón, por lo que el concepto de depuración equivale a un volumen virtual mas que un volumen real. Además, la depuración es el resultado de una suma algebraica de la filtración glomerular y la reabsorción o excreción tubular.

Las pruebas de depuración son utilizadas únicamente en caninos dentro de la práctica veterinaria y generalmente en estudios experimentales. No es utilizada como prueba de diagnóstico rutinario, ya que requiere procedimientos complicados de inyección y estimación de las sustancias químicas (7,26).

Por definición: La depuración es el volumen de plasma, en ml, que contiene la cantidad de la sustancia excretada en la orina en un minuto. Se expresa matemáticamente de la siguiente manera:

$$\text{ml de plasma depurado/min} = \frac{U \times V}{P \times PC}$$

Donde:

U = Concentración de sustancia en orina.

P = Concentración de la sustancia en plasma.

V = Volumen de orina en ml/minuto.

PC = Peso corporal.

C) Urea. (N.U.S.). Consultar química sanguínea pag. 87.

D) Creatinina. Consultar química sanguínea pag. 89.

E) Examen general de orina. Consultar pag. 23.

## 8.- LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO.

En los ventrículos del sistema nervioso central y el espacio subaracnoideo, se encuentra el fluido denominado líquido cefalorraquídeo, tiene su origen en el plexo coroideo y retorna a la sangre a través de los vasos subaracnoideos de la región lumbar. La composición del líquido cefalorraquídeo indica que es un trasudado (por filtración selectiva), ya que se compone de agua, sales y entre 15 y 40 mg de proteína por 100 ml, con un cociente albúmina/globulina igual a 4. Su función es la de amortiguar a la masa encefálica, y una cantidad de células componentes del sistema nervioso central, obtienen sus elementos nutritivos de éste.

El líquido cefalorraquídeo sufre modificaciones en su presión, contenido de células, glucosa, proteínas y cloruros en algunos nadecimientos.

El examen de este fluido está indicado cuando existe evidencia clínica de una alteración patológica en el sistema nervioso central y ocasionalmente para determinar el grado de avance de la enfermedad y la respuesta a la terapia.

La remoción de líquido puede aliviar la presión alta y servir para drenar exudados (7,26,70).

1) Obtención de la muestra.

A) Bovinos: Puede ser obtenido por punciones lumbares o suboccipitales.

a.- Punción lumbar.

Se buscará por palpación la suave depresión entre la apófisis espinosa de la última vértebra lumbar y el extremo anterior de la cresta sacra medial. Antes de proceder a la punción, la zona deberá ser trasquilada, rasurada y desinfectada (ésto es aplicable para la punción en todas las especies). La punción se realiza con aguja de calibre 14 ó 16 con 12 cm de longitud, provista de estilete. Si el animal está en decúbito lateral aumentarán las dificultades para penetrar en el espacio por la artí-

culación lumbosacra.

b.- Punción suboccipital.

Con aguja calibre 16 de 8 a 10 cm de longitud con estilete y el animal en decúbito lateral, la cabeza deberá estar flexionada al máximo y firmemente mantenida en esta posición, la punción se realizará en la línea media a nivel de otra línea, que une los 2 bordes anteriores a las alas del atlas.

B) Ovinos: La punción suboccipital es la más recomendada, pero debido a la reciedumbre de los músculos y al borde sobresaliente del hueso occipital, el método, algunas veces es difícil y puede ser motivo de hemorragia. En la punción lumbar, debe mantenerse al animal en posición semisentada. Para estas punciones se recomienda aguja calibre 16 de 10 cm de longitud con estilete.

C) Porcinos: La punción occipital es demasiado difícil ya que se necesita mantener al animal con anestesia general. La punción lumbar es la más recomendada, la punción debe hacerse igual que en los ovinos, en posición semisentada, nunca deberá hacerse la punción por delante de la articulación lumbosacra, ya que en esta región la médula llena por completo el saco dural.

D) Equinos: La punción occipital es la más recomendada. El caballo deberá estar en decúbito lateral; la cabeza se mantendrá en fuerte flexión ventral acentuada, hasta que las tangentes de las líneas nasal y del cuello formen un ángulo de 90 grados. Se utilizará aguja calibre 14 ó 16 con 10 cm de longitud con estilete.

E) Caninos y felinos: Se recomienda la extracción a nivel de la articulación atlanto-occipital. Deberá anesthesiarse o tranquilizarse al animal en vista de que todo movimiento brusco, puede ser de consecuencias irreparables. Se coloca al animal en decúbito lateral derecho, la cabeza se mantendrá flexionada, aproximadamente en ángulo recto con el eje largo del cuello. Esta posición separará del atlas los cóndilos del hueso occipital con lo que aumentará la zona de penetración de la punción. Se trazará una línea imaginaria a lo ancho del cuello, entre los bor-

des anteriores de las alas del atlas; se trazará una segunda línea entre la cresta del occipital y el borde dorsal del axis. Entonces será posible la punción en la línea media del cuello, en el punto de intersección de las dos líneas. La aguja deberá ser de calibre 20 y de 5 a 10 cm de longitud con estilete. Puede ser peligroso quitar más de 4 ó 5 ml de líquido en perros y más de 0.5 a 1 ml en gatos (26).

#### II) Examen físico.

El líquido cefalorraquídeo normal es incoloro, transparente y sin coagulación, puede contener sangre como resultado de contaminación, debida a la punción de un vaso meníngeo y se alterarán los resultados, para evitar esto, puede tomarse el primer mililitro y si es turbio, de color rojizo o coagula, puede desecharse cambiando el recipiente y recolectando en otro. La muestra debe obtenerse en un recipiente transparente (puede utilizarse tubo de ensaye 10 X 100 mm) (7,26,99).

#### A) Color.

Como se mencionó anteriormente, este líquido es incoloro y se observa a simple vista, siendo comparable con agua destilada. La alteración más notable es cierto enrojecimiento por mezcla de sangre, por rotura de un vaso en el momento de la toma de la muestra (7,26,99).

#### B) Turbidez.

El líquido debe de ser normalmente transparente, generalmente el enturbiamiento es consecuencia de la presencia de células lo que se empieza a notar hasta que existen por lo menos  $500 \text{ cels/mm}^3$ . En las infecciones agudas de las meninges, el líquido puede ser ligeramente nebuloso, en casos extremos, de aspecto notadamente purulento. La hemorragia por punción de un vaso durante la toma de muestra da lugar a un líquido rojizo turbio (7,26,99).

#### C) Coagulación.

Después de la toma de la muestra, debe observarse si ésta tiene coagulación total o parcial. Normalmente el líquido ce-

falorraquídeo no coagula, pero ocurre, si hay aumento de proteí-  
nas, especialmente fibrinógeno. En las meningitis supurativas  
agudas es posible observar la coagulación total de la muestra  
(7,26,99).

D) Densidad específica.

La técnica para la obtención de densidad específica es la  
del refractómetro de Goldberg descrita en el examen general de  
orina en la página 26. La densidad específica normal máxima es  
1.018, aumenta en casos de presencia de células o sustancias  
que se encuentren en casos patológicos (7,26).

III) Examen citológico.

A) Conteo celular.

a. - Método.

- 1.- Llenar la pipeta de Thoma para leucocitos con líquido ce-  
falorraquídeo hasta la marca de 0.5 y llenar con colorante  
nuevo azul de metileno hasta la marca 1.1, llenar ambos  
lados de la cámara cuenta glóbulos. Se cuentan todas las  
células presentes en los dos cuadros primarios, con obje-  
tivo seco fuerte.

Cálculo: Total de células de los dos cuadros; igual al  
total de células por  $\text{mm}^3$  de líquido cefalorraquídeo  
sin diluir.

- 2.- Llenar la pipeta de Thoma para leucocitos con diluyente de  
Türk hasta la marca de 0.5 y completar con líquido cefalo-  
rraquídeo hasta la marca 1.1. Se llena la cámara cuenta  
glóbulos, se cuentan todas las zonas cuadrículadas de am-  
bos lados de la cámara y el resultado se multiplica por  
0.6 para obtener número de células por  $\text{mm}^3$ .
- 3.- Sin diluir. Para la cuenta total tanto eritrocítica y leu-  
cocitaria, se llena la cámara cuenta glóbulos con líquido  
cefalorraquídeo sin diluir y se cuentan todas las células  
de los dos lados de la cámara y el resultado se multiplica  
por 1.1, para obtener el número de células por  $\text{mm}^3$ .

Los líquidos cefalorraquídeos de la vaca, oveja y cerdo.

contienen de 0 a 15 células por  $\text{mm}^3$ , en tanto 25 se consideran normales en el perro y hasta 23 en el caballo. La presencia de eritrocitos en el líquido cefalorraquídeo, debe ser estrictamente negativa (7).

B) Cuento diferencial.

a. - Método.

- 1.- Centrifugar el líquido cefalorraquídeo 5 minutos a 1500 rpm, se decanta el sobrenadante. Se colocan tres gotas de sedimento en un tubo de ensaye, se mezcla con una gota de colorante nuevo azul de metileno y se coloca una gota de esta mezcla sobre un portaobjetos y encima un cubreobjetos, contar diferenciando 100 células en mononucleares y polimorfonucleares (7,26,51,88).
- 2.- Centrifugar el líquido cefalorraquídeo a 1000 rpm durante un minuto, colocar una gota de sedimento en un portaobjetos y dejar que seque a temperatura ambiente.  
Fijar en metanol durante 4 minutos.  
Teñir con colorante de Wright o Giemsa.  
Contar 100 células (leucocitos), diferenciando mononucleares y polimorfonucleares.

IV) Examen químico.

A) Glucosa.

- 1.- Método de ortotoluidina. Consultar química sanguínea (pag. 85).
- 2.- Determinación con tira reactiva Dextrostix. Consultar examen general de orina (pag. 34).

B) Proteínas totales.

Determinación cualitativa.

1.- Reacción de Pandey.

a.- Fundamento.

Albúminas y globulinas precipitan en una solución saturada de fenol.

b.- Método.

Colocar en un tubo de ensaye 1 ml de solución saturada de

fenol (reactivo de Pandey), y adicionar una gota de líquido cefalorraquídeo.

Cuando la cantidad de globulinas es mayor a lo normal, se forma inmediatamente un anillo blanco o turbio, el grado de turbidez se reporta de una a cuatro cruces.

- - No hay formación de anillo.
- + - Ligera turbidez.
- ++ - Formación de un anillo turbio irregular.
- +++ - Formación de un anillo blanco, delgado e irregular.
- ++++ - Formación de anillo blanco, claro y regular.

Nota: Pueden presentar ligera opalescencia en concentraciones normales, por lo que se recomienda soluciones de fenol al 65% que no provoca este efecto (7,26).

## II.- Reacción de Nonne-Apelt.

### a.- Fundamento.

Cuando una solución saturada de sulfato de amonio es cubierta con una capa de líquido cefalorraquídeo, se observa precipitación de fibrinógeno y globulina.

### b.- Método.

En un tubo de ensaye colocar 1 ml de solución de sulfato de amonio saturado y 1 ml de líquido cefalorraquídeo.

Dejar reposar 3 minutos y observar.

Interpretación:

Claro.- Cantidad normal de globulina, también ligeramente opalescente puede ser normal.

Precipitado turbio.- Exceso de globulina.

Anillo turbio entre los dos líquidos.- Casos patógenos.

El grado de turbidez se reporta de una a cuatro cruces.

- + - Opalescente.
- ++ - Ligera turbidez.
- +++ - Fuerte turbidez.
- ++++ - Precipitado (7).

### III.- Reacción de Ross-Jones.

#### a.- Fundamento.

Cuando una solución saturada de sulfato de amonio es cubierta con una capa de líquido cefalorraquídeo, se observa separación de fibrinógeno y globulinas. La proteína no se precipita, solo se deshidrata, produciendo su separación de la solución (baja solubilidad).

#### b.- Método.

Tomar 2 ml de solución saturada de sulfato de amonio y 1 ml de líquido cefalorraquídeo (agregarlas tratando de no romper la interfase), observar.

#### Interpretación:

Amarillo claro o blanco grisáceo, es un exceso de globulina. Esto se presenta en la zona de contacto de los dos líquidos, en pocos segundos o antes de 5 minutos, si después de 5 minutos se observa coloración amarilla, es normal (7).

Determinación cuantitativa: Método de Biuret. Consultar química sanguínea (pag. 93).

#### C) Cloruros.

Similar a la determinación de cloruros sanguíneos. Consultar el capítulo de agua, electrolitos y equilibrio ácido-básico (pag. 16).

D) Exámenes químicos por tira reactiva "Labstix". Consultar examen general de orina (pag. 32).

#### E) Examen bacteriológico.

Tomar la muestra en un tubo de ensaye estéril para mandar al laboratorio de bacteriología, y para realizar las pruebas microbiológicas (7,26,51,99).

## 9.- EXUDADOS Y TRASUDADOS.

Existen enfermedades asociadas a la acumulación de líquidos extravasculares, ya sea exudación o trasudación, habiendo una diferencia importante entre estos dos procesos.

Se llama exudado a la efusión de un líquido con densidad específica superior a 1.018. Esta elevada densidad, supone la ocurrencia de alteración vascular que permita la salida libre de proteínas.

Un exudado es de origen inflamatorio, puede ser debido a:

- Infecciones bacterianas, virales, parasitarias y micóticas.
- Traumatismos causados por lesión física o química.
- Trastornos estériles causados por cuerpos extraños.

Los trasudados se forman como consecuencia de la fuga líquida de sangre o linfa, en las cavidades orgánicas, o en los espacios intratisulares, debido a diferencias de presión entre el interior y el exterior de los vasos. La acumulación de trasudados, generalmente se limita a dos causas:

- Estasis venosa. Insuficiencia cardíaca con disfunción renal y sucesiva salida de líquido a las cavidades.
- Hipoproteinemia. Queda alterado el mecanismo osmótico normal, con la consecuencia de una corriente de plasma a las cavidades y tejidos.

Los trasudados se conocen con diferentes nombres dependiendo de su localización: Hidrotorax, hidroperitoneo (ascitis), hidroartrosis.

Las cavidades serosas tienen normalmente muy poco líquido, pero en estados patológicos, es frecuente que encierren cantidades aumentadas considerablemente de éstos (26,46).

### 1) Obtención de muestras.

La obtención de muestras de exudados o trasudados se hace por punción de cualquiera de las zonas que contienen líquidos, previa trasquila, rasurado y desinfección de la zona a punccio-

nar. Se deben obtener dos muestras, una sin anticoagulante (para la prueba de coágulos), y otra con dosis de anticoagulante adecuada (EDTA el de elección), para la realización de las otras pruebas. Se recomienda obtener 10 ml de muestra cuando sea posible. Se debe contar con un recipiente estéril si se requiere de un cultivo (26,44,56,88).

## II) Examen físico.

### A) Apariencia.

Trasudado. Generalmente seroso, amarillento, claro; ocasionalmente turbio u opalescente.

Exudado. Puede ser seroso, serofibrinoso, fibrinoso, purulento, seropurulento, hemorrágico, quiloso, serohemorrágico, quiloideos o mixtos.

### B) Densidad específica.

Método del refractómetro de Goldberg. Consultar examen general de orina (pav. 26).

Trasudado. Generalmente menor de 1.018.

Exudado. Generalmente mayor de 1.018 (7,26,99).

### C) Color.

Trasudado. Sin color o amarillo muy pálido (depende de la especie y raza del animal).

Exudado. Variable; lechoso, rojizo, amarillento.

Prueba de poco valor diagnóstico (7,26,99).

### D) Coágulos.

Se toma una pequeña cantidad de líquido inmediatamente después de colectado en un tubo de ensaye y se observa si coagula espontáneamente. Se anota el tiempo de aparición, cantidad y el tipo de coágulo.

Trasudado. Generalmente no coagulan (puede contener filamentos de fibrina).

Exudado. Usualmente coagulan (7,26,99).

### E) pH.

Se hace mediante tira reactiva "Labstix" u otros.

Trasudado. Alcalino generalmente.

Exudado. Acido generalmente (7,26).

III) Examen químico.

A) Proteínas.

1.- Método del refractómetro de Goldberg.

a.- Método.

Se coloca una pequeña cantidad del líquido a examinar en el prisma del refractómetro por capilaridad hasta que quede completamente abarcada la zona del prisma. Se observa a contra luz y el resultado se lee observando en la escala de la derecha (7,26, 76,91).

2.- Método de Biuret (pag. 93).

Trasudado. Menor de 2.5 g/100 ml.

Exudado. Más de 3 g/100 ml (7,26).

B) Seromucina.

Prueba de Rivalta.

a.- Fundamento.

Esta prueba se utiliza para diferenciar exudados de trasudados. Los exudados contienen una proteína que es la seromucina, ésta es precipitable con ácido acético, la presencia de dicha proteína es una muestra de líquido filtrado, se revela por una ligera precipitación o floculación, cuando se les adiciona ácido acético. Puede dar resultados falsos positivos, cuando se contamina con suero.

b.- Método.

En un tubo de ensaye colocar 2 ml de ácido acético diluido (0.1% con agua destilada), y una o dos gotas del líquido.

Trasudado. Se disuelve la gota inmediatamente sin producir turbidez.

Exudado. Se hunde la gota dejando un rastro claramente visible de precipitado blanco (produce turbidez) (7).

C) Glucosa.

Tira reactiva "Dextrostix".

Técnica de ortotoluidina. Consultar química sanguínea (pag 85).

D) Otras pruebas químicas.

Cuerpos cetónicos, sangre. Tira reactiva múltiple "Labstix". Consultar examen general de orina, examen químico (pag. 32).

#### IV) Examen citológico.

1.- Se pueden realizar varios frotis y teñir con colorante de Wright o Giemsa.

a.- Método.

1.- Centrifugar la muestra (5 ml), a 1500 rpm.

2.- Decantar el sobrenadante.

3.- Obtener una gota de sedimento en un portaobjetos y secar.

4.- Proceder a la tinción (7,26).

2.- Tinción de nuevo azul de metileno.

Se mezclan tres gotas de sedimento en un tubo de ensaye con una gota de colorante nuevo azul de metileno, colocar una gota en un portaobjetos, cubrir con un cubreobjetos.

Interpretación:

Hacer un conteo diferencial leucocitario con cualquiera de las dos tinciones anteriores. Observar polimorfonucleares, mononucleares, células neoplásicas, eritrocitos, células epiteliales.

Trasudado. Leucocitos y eritrocitos escasos o ausentes.

Exudado. Leucocitos y eritrocitos muy abundantes (26,51, 56,84).

3.- Conteo leucocitario.

Método del hemocitómetro (pag. 56).

Trasudado. Generalmente menos de 500 células por  $\text{mm}^3$ .

Exudado. Abundantes leucocitos, generalmente entre 500 a 50000 células por  $\text{mm}^3$  (7,26,99).

V) Examen bacteriológico.

1.- Tinción de Gram.

2.- Cultivo (26).

## 10.- CITOLOGIA VAGINAL.

La citología vaginal tiene varias aplicaciones en todas las especies, como son la detección de enfermedades tanto uterinas como vaginales y la valoración de las etapas del ciclo estral.

En medicina veterinaria una de las aplicaciones más valiosas de la citología vaginal, es la determinación del ciclo estral, siendo en la perra donde más estudios se han realizado.

Para obtener una interpretación citológica vaginal, se requieren datos clínicos detallados; fecha del último estro, duración del mismo, número de gestaciones y aplicación de fármacos y hormonas (34).

### I) Toma de muestra.

Es requisito realizar una buena toma de la muestra, para ello se recomienda la siguiente técnica:

- 1.- Mantener al animal de pie, sujetándole la cola hacia arriba, se asean los labios de la vulva y se introduce un espéculo previamente lubricado.
- 2.- Introducir un hisopo procurando llegar lo más profundo posible, y mediante movimientos rotatorios sobre las paredes vaginales obtener la muestra.
- 3.- El material obtenido se extiende uniformemente sobre un portaobjetos y se fija inmediatamente sumergiéndolo en alcohol de 96°, durante un mínimo de 10 minutos.
- 4.- Teñirlo con colorante Papanicolaou, Wright, Giemsa ó Shorr, en ese orden preferencial. Siempre es conveniente realizar 2 ó 3 frotis (7,26,34).

### II) Examen citológico.

Al examen citológico normal, se encuentran células de los diferentes estratos vaginales:

- 1.- Células basales o germinales. Son las más pequeñas que se encuentran en un frotis vaginal, de forma redonda a ovalada, de 15 a 20 micras de tamaño y núcleo central con apetencia por los colorantes básicos. Se desprenden por lo general en peque-

ños grupos o escamas. No suelen encontrarse en frotis normales, siendo frecuentes en atrofia, vaginitis o úlceras mucosas.

2.- Células parabasales. Miden 25 micras, son de forma redonda u oval con citoplasma basófilo, más claro que el de las células basales y en ocasiones con vacuolas de glucógeno. El núcleo presenta cromatina granular uniformemente distribuida y dependiendo de su actividad podrá presentar en el núcleo, nucleolo prominente. Son llamadas células del metaestro.

3.- Células intermedias. Son las más vistas y numerosas, de 20 a 40 micras de tamaño, de forma redonda o poligonal, presentan citoplasma eosinófilo, núcleo redondo u oval, se puede descubrir cromatina sexual. Se diferencian de las parabasales por su abundante citoplasma y tamaño del núcleo.

Dentro de estas células encontramos variaciones llamadas células naviculares, en forma de barca (de aquí su nombre), con citoplasma de bordes doblados y núcleo alargado excéntrico. Se describen como típicas de preñez y significativas de acción lútea interna y quistes lúteos.

4.- Células superficiales. Son células de 40 a 60 micras de tamaño, de forma poligonal y citoplasma transparente con núcleo picnótico pequeño, el citoplasma se tiñe color rosa. A veces pueden presentar en su citoplasma granulaciones.

Las células superficiales de la perra en el estro, contienen queratina en el citoplasma y cuando pierden el núcleo, dan lugar a escamas, las cuales son abundantes en esta etapa del ciclo estral (34).

III) Características observadas en la perra en cada etapa del ciclo estral.

1.- Proestro. 4 a 14 días de duración, promedio de 9 días.

Signos clínicos. Congestión de órganos genitales, edema vulvar, secreción sanguinolenta desde el inicio hasta la aceptación del macho (tiempo en que comienza el estro).

En el frotis se encuentra gran cantidad de eritrocitos y células intermedias, además de neutrófilos (que desaparecen hacia el último día del proestro).

2.- Estro. Duración de 4 a 14 días.

Signos clínicos. Aceptación del macho, disminuye o desaparece el flujo sanguinolento, hay edema de labios vulvares.

En el frotis se encuentran gran cantidad de escamas y células superficiales en menor cantidad. Los neutrófilos aparecen hacia el último día del estro y los eritrocitos desaparecen al inicio de éste.

3.- Metaestro. Duración 50 a 60 días.

Signos clínicos. El período se caracteriza por cambios gestacionales y pseudogestacionales, y posteriormente por un período de regresión de estos cambios.

En el frotis hay gran cantidad de células parabasales y en pequeñas cantidades células intermedias y neutrófilos.

4.- Anestro.

Signos clínicos. Período de regresión hasta la siguiente presentación del proestro.

En el frotis pueden encontrarse células intermedias y parabasales, pero en pequeñas cantidades, lo mismo que neutrófilos.

Debe considerarse la existencia de trastornos patológicos, en los cuales podemos encontrar eosinófilos, histiocitos, linfocitos, células plasmáticas, bacterias, parásitos, metaplasias o hiperplasias endometriales o cambios neoplásicos.

Se recomienda que todo citodiagnóstico sea observado en varias laminillas secuenciales y seriadas, para comprobar los cambios celulares mencionados (7).

## 11.- PREPARACION DE SOLUCIONES PARA TINCCIONES CELULARES.

### A) Tinción de Wright.

#### I.- Preparación del colorante.

- 1.- Se colocan en un mortero 0.5 g de polvo de colorante de Wright seco. Agregar al colorante 300 ml de alcohol metílico absoluto, poco a poco y triturando la mezcla, el alcohol se le agrega hasta que todo el colorante esté en solución y la cantidad total del colorante se haya utilizado.
- 2.- Se coloca en un frasco ámbar. Agitar el frasco diariamente y durante dos semanas.
- 3.- Dejar madurar la tinción de 2 a 4 semanas, filtrar la solución antes de utilizarse. Guardar el polvo que quede de residuo en el papel filtro para posteriores soluciones de colorante (6,7).

#### II.- Método de tinción.

- 1.- El frotis seco, secado al aire se coloca en posición horizontal y se cubre totalmente con colorante, se deja reposar el tiempo calculado en el ensayo (la selección del tiempo variará dependiendo de la potencia del colorante cada vez que se prepare).
- 2.- Se agrega sobre el colorante igual cantidad de agua destilada amortiguada o neutra (pH de 6.6 a 6.8), teniendo cuidado de no derramar el agregado, dejar reposar de 3 a 5 minutos (aparecerá una película delgada metálica color verde en la superficie de la tinción).
- 3.- Lavar a chorro de agua no alcalina o agua destilada.
- 4.- Limpiar el colorante de la parte posterior de la laminilla, y dejar secar a temperatura ambiente. (26,99).

### B) Tinción de Leishman.

#### I.- Preparación del colorante.

- 1.- Mezclar 0.15 g de polvo de colorante de Leishman con pequeñas cantidades de metanol absoluto hasta obtener una solu-

ción uniforme, agregando en total 100 ml de metanol para producir una solución completa.

2.- Se pone en un frasco ámbar y dejar madurar varias semanas antes de utilizarse (en reposo y en un lugar obscuro) (6,7).

II.- Método de tinción.

1.- El frotis seco se baña (de igual manera que para Wright) con colorante de Leishman, dejándolo actuar un tiempo, que dependerá del ensayo previo.

2.- Agregar igual cantidad de agua destilada amortiguada y dejar reposar de 5 a 15 minutos.

3.- Enjuagar con agua destilada de 30 segundos a 2 minutos.

4.- Limpiar la parte posterior de la laminilla (7,68).

C) Tinción de Wright-Giemsa.

I.- Preparación del colorante.

1.- Se trituran en un mortero 300 mg de polvo de Wright y 30 mg de polvo de Giemsa con 100 ml de metanol absoluto.

2.- Dejar reposar 24 a 48 horas antes de usarse, en un frasco obscuro y bien tapado (6,7).

II.- Método de tinción.

1.- Similar al descrito para Wright.

D) Tinción de Wright para aves.

I.- Preparación del colorante.

1.- Colorante de Wright: 3.3 g de polvo de colorante en 500 ml de metanol.

2.- Solución de formalina: 0.5 ml de formalina concentrada en 500 ml de agua destilada, ajustar pH a 6.8 con carbonato de sodio al 0.25% ó ácido clorhídrico al 0.25%.

II.- Método de tinción.

1.- Cubrir el frotis seco con colorante de Wright y dejar reposar durante 8 minutos.

2.- Agregar solución de formalina con gotero poco a poco.

3.- Esperar a que se forme el brillo metálico en toda la su-

perficie del colorante, en cuanto suceda, lavar con agua destilada amortiguada con pH de 6.8.

4.- Sumergir la laminilla de 6 a 10 veces en ether-alcohol metílico (1:1) (7).

#### F) Tinción de Wright-Leishman.

##### I.- Preparación del colorante.

1.- Colorante de Wright: Combinar 0.6 g de polvo de colorante de Wright, 5 ml de glicerina y 300 ml de metanol absoluto en un matraz "pirex" de Erlen meyer de 500 ml.

2.- Calentar la muestra con agitador hasta un punto anterior a la ebullición.

3.- Repetir este proceso por 3 ó 4 veces después de dejar enfriar unos minutos entre cada proceso.

4.- Dejar enfriar y filtrar.

5.- Colorante de Leishman. El mismo procedimiento anterior para Wright.

6.- Mezclar los dos colorantes de la siguiente manera:

3 partes de Wright.

1 parte de Leishman (6,7).

##### II.- Método de tinción.

###### 1) Convencional.

1.- Fijar el frotis con metanol 5 minutos.

2.- Se vierte colorante hasta cubrir la laminilla en posición horizontal durante 3 minutos.

3.- Aplicar encima solución amortiguadora (pH de 6.6) durante 6 minutos.

4.- Se enjuaga con agua destilada, limpiando la parte posterior de la laminilla.

###### 2) Frasco Coplin.

1.- Colocar la laminilla en un frasco Coplin lleno del colorante durante 3 minutos.

2.- Sacarla y pasarla a otro frasco Coplin que contenga 5 partes de amortiguador por una parte de colorante durante 6 minu-

tos.

3.- Se enjuaga con agua destilada, se limpia la parte posterior de la laminilla (7,26).

F) Nuevo azul de metileno.

I.- Preparación del colorante.

1.- Disolver 0.5 g de colorante nuevo azul de metileno pulverizado en 100 ml de solución salina fisiológica.

2.- Agregar 1 ml de formaldehído al 40%.

3.- Se filtra y se almacena en un frasco oscuro bien cerrado (6,7,34,44).

II.- Método de tinción.

1.- Hacer el frotis y secarlo al aire.

2.- Colocar una gota de colorante en un cubreobjetos.

3.- Cubrir el frotis con el cubreobjetos que contiene el colorante.

4.- Evitar la formación de burbujas.

5.- Observar al microscopio.

Nota: No es una tinción permanente y solo se podrá observar mientras el colorante no se evapora (7).

III.- Exámenes microscópicos de líquidos o soluciones con nuevo azul de metileno.

1.- Se coloca una gota de cualquier líquido o solución que se quiera observar en fresco en un portaobjetos.

2.- Se añade una gota de colorante de nuevo azul de metileno, se coloca encima un cubreobjetos, se observa al microscopio en fresco (7,26,51).

G) Tinción para reticulocitos.

I.- Preparación del colorante.

1.- Disolver 0.5 g de nuevo azul de metileno (azul básico 24), y 1.6 g de oxalato de potasio en 100 ml de agua destilada.

O bien:

2.- Azul de cresilo brillante 1 g en 100 ml de solución salina

fisiológica con un agregado de 0.4 g de citrato de sodio.

II.- Método de tinción.

- 1.- Se colocan partes iguales de sangre y colorante en un tubo de ensaye, se deja reposar durante 10 a 15 minutos.
- 2.- Hacer el frotis con la sangre teñida parcialmente por el colorante.
- 3.- Se hace alguna tinción de rutina para sangre.
- 4.- Observar al microscopio (7,51).

H) Agua destilada amortiguada.

I.- Preparación del agua destilada amortiguada.

pH	Fosfato sódico dibásico (g).	Fosfato potásico monobásico (g).	Agua destilada c.b.p. (ml).
6.5	2.723	8.316	100
6.8	4.539	5.940	100
7.0	5.447	4.752	100
7.2	6.555	3.564	100

Se mezclan bien las dos sales para obtener el pH deseado, como se indicó anteriormente, en un mortero, usando 1 g para 2000 ml de agua destilada (7).

Nota: Para poder utilizar los colorantes que se dejan madurar forzosamente, puede acelerarse su maduración de la siguiente manera:

Después de preparar el colorante en el mortero (Wright, Leishman, Giemsa), pasarlo a un matraz Erlenmeyer, ponerlo a calentar, retirarlo en el punto anterior inmediato a la ebullición, y agitando esperar un momento y volverlo a calentar, repetir el paso de 3 a 5 veces, filtrar, pasar a un frasco ámbar, dejar enfriar y puede utilizarse inmediatamente según el método de tinción correspondiente a cada uno de ellos (6).

ANEXO: FARMACOS QUE ALTERAN LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO.

Una correcta interpretación de las pruebas de laboratorio requiere que el médico esté al corriente de todos los fármacos que le son aplicados al paciente. Es importante recordar que en ocasiones el dueño o encargado de los animales no le informan al médico veterinario las medicaciones que empíricamente han aplicado a sus animales y que algunas veces hacen mas daño al animal y no le favorecen (35).

El siguiente resumen de resultados de las pruebas de laboratorio, que se realizan con más frecuencia y que pueden ser alteradas por los fármacos de uso frecuente, constituyen tan solo una orientación general respecto al sentido de aumento o disminución y no a una recopilación exhaustiva de esta información. Tan solo se utilizan los nombres genéricos de los fármacos. No debe utilizarse este resumen para descartar algún efecto causado por un fármaco en una prueba de laboratorio si no aparece éste en el resumen. Debemos recordar que en ocasiones las anomalías en los resultados de laboratorio pueden ser debidas a los fármacos en igual medida que a la enfermedad (128).

Anexo 1.- Fármacos que pueden alterar el color de la orina (21,53,128).

Hierro dextran - Color rojo intenso o pardo.

Anticoagulantes - De rosa a rojo o pardo.

Azul de metileno - Amarillo-verdoso, azul.

Fenotiacinas - Rosa, rojo, púrpura, naranja.

Furazolidona - Pardo.

Metocarbamol - Pardo obscuro, negro, azul o verde.

Riboflavina - Amarillo intenso.

Rifampicina - Naranja-rojo.

Salicilatos - De rosa a rojo pardo.

Sulfonamidas - Amarillo marrón.

nexo 2.- Fármacos que pueden producir aumento en la densidad específica de la orina (35,128).

Ampicilina.

Sacarosa.

Medio de contraste radiopaco.

Dextran.

Anexo 3.- Fármacos que pueden producir resultados falsospositivos en la prueba de proteínas en la orina (64,128).

Cefalotina.

Acetaminofen.

Sulfametoxamol.

Aminofilina.

Clorpromacina.

Promacina.

Anfotericina B.

Ampicilina.

Penicilina.

Griseofulvina.

Bacitracina.

Sulfisoxazol.

Hierro dextran.

Cefaloridina.

Timol.

Polimixina.

Kanamicina.

Gentamicina.

Bicarbonato sódico.

Neomicina.

Medio de contraste radiopaco.

Furazolidona.

Anexo 4.- Fármacos que pueden producir resultados falsospositivos en la prueba de glucosa en orina (128).

Corticosteroides.

Hidrato de cloral.

Acido acetil salicílico.

Tetraciclina degradada.

Cefaloridina.

Cloramfenicol.

Cefalexina.

Clorpromacina.

Furazolidona.

Fenotiacina.

Anexo 5.- Fármacos que pueden alterar los resultados en la prueba de sangre en orina (86,110).

Falsopositivo:

Bromuros.

Cobre.

Permanganato.

Yoduros.

Ampicilina.

Bacitracina.

Hierro dextran.

Kanamicina.

Falsonegativo:

Acido ascórbico (dosis elevadas).

Anexo 6.- Fármacos que pueden producir resultados positivos en la prueba de bilirrubina en orina (128).

Acriflavina.

Clorpromacina.

Fenotiacina.

Timol.

Cloramfenicol.

Clortetraciclina.

Lincomicina.

Riboflavina.

Anexo 7.- Fármacos que pueden producir resultados aumentados o disminuidos en la prueba de urobilinógeno en orina (64,86).

Aumentados:

Bromosulfaleína.

Clorpromacina.

Vitamina K.

Fenotiacina.

Sulfamidas.

Disminuidos:

Cloramfenicol.

Neomicina.

Eritromicina.

Anexo 8.- Fármacos que pueden producir resultados aumentados o disminuidos en la prueba de calcio en orina (35,86,128).

Aumentados:

Esteroides anabólicos.

Vitamina D.

Corticosteroides.

Disminuídos:

Neomicina.

Bicarbonatos.

Anexo 9.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de la velocidad de sedimentación globular (2,21).

Aumento:

Dextrano.

Vitamina A.

Disminución:

Salicilatos (dosis terapéuticas).

Anexo 10.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución en el tiempo de coagulación (128).

Aumento:

Adrenalina.

Anticoagulantes.

Disminución:

Corticosteroides.

Tetraciclinas.

Anexo 11.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución en el tiempo de protrombina (128).

Aumento:

Acetaminofen.

Cloramfenicol.

Esteroides anabólicos.

Fenilbutazona.

Glucagón.

Hidrato de cloral.

Neomicina.

Salicilatos.

Sulfamidas (larga acción).

Heparina.

Disminución:

Barbitúricos.

Griseofulvina.

Rifampicina.

Anexo 12.- Fármacos que pueden inhibir la heparina (126,128).

Antihistamínicos.

Penicilina.

Tetraciclina.

Fenotiacina.

Anexo 13.- Fármacos que pueden producir trombocitopenia (21, 35,128).

Anfotericina B.	Clorpromacina.
Ampicilina.	Clortetraciclina.
Cefalotina.	Furosemida.
Cloramfenicol.	Lincomicina.
Nistatina.	Penicilinas.
Oxitocina.	Tetraciclinas.
Vitamina K.	

Anexo 14.- Fármacos que pueden producir variaciones en el color de las heces (64,128).

Antiácidos alcalinos - Coloración blanca.  
Anticoagulantes (exceso) - Negro (hemorragia).  
Fenilbutazona - Negro (hemorragia).  
Salicilatos - Negro (hemorragia).

Anexo 15.- Fármacos que pueden producir resultados falsosnegativos en la prueba de sangre oculta en heces (128).

Vitamina C - Generalmente más de 500 mg/día.

Anexo 16.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución del nitrógeno ureico sanguíneo (21,35,86).

Aumento:

Hidrato de cloral.	Gentamicina.
Acetaminofen.	Kanamicina.
Acetazolamida.	Neomicina.
Anfotericina B.	Penicilinas.
Bacitracina.	Polimixina.
Cefalotina.	Tetraciclinas.
Clorpromacina.	Furosemida.
Clortetraciclina.	Griseofulvina.
Vancomicina.	Vitamina D.

Disminución:

Cloramfenicol.  
Estreptomina.  
Fenotiacina.

Anexo 17.- Fármacos que pueden producir aumento de bilirrubina en suero (35,86).

Estreptomina.	Cloramfenicol.
Adrenalina.	Clorpromacina.
Acetaminofen.	Eritromicina.
Acetazolamida.	Estrógenos.
Anfotericina B.	Fenotiacina.
Cefalotina.	

Anexo 18.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de colesterol en suero (21).

Aumento:

Esteroides anabólicos.	Lincomicina.
Clorpromacina.	Vitamina D.
Corticosteroides.	Vitamina A.

Disminución:

Tetraciclinas.	Neomicina.
Eritromicina.	Estrógenos.
Kanamicina.	Progesterona.

Anexo 19.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de sodio en suero (21,64).

Aumento:

Corticosteroides.	Andrógenos.
Fenilbutazona.	Prednizolona.
Bicarbonatos.	Tetraciclinas.

Disminución:

Furosemida.	Anfotericina B.
Progesterona.	

Anexo 20.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de cloro en suero (21,110,128).

Aumento:

Mineralocorticoides (retención de agua).  
Fenilbutazona.

Disminución:

Bicarbonatos.

Corticosteroides (alcalosis).

Laxantes (exceso).

Anexo 21.- Fármacos que pueden producir aumento de amilasa en suero (110,126).

Colinérgicos.

Furosemda.

Corticosteroides.

Prednizolona.

Dexametazona.

Anexo 22.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución del hematocrito, hemoglobina y eritrocitos (2,110,128).

Aumento:

HEMATOCRITO

HEMOGLOBINA

ERITROCITOS

Andrógenos.

Bacitracina.

Andrógenos.

Atropina.

Disminución:

Anfetaminas.

Anfotericina B.

Cefaloglicina.

Clorpromacina.

Estrógenos.

Estreptomina.

Fenotiacina.

Furosemda.

Furazolidona.

Neomicina.

Penicilinas.

Piperacina.

Tetraciclina.

Vitamina K.

Trimetropin.

Anexo 23.- Fármacos que producen aumento o disminución de leucocitos en sangre (2,110,128).

Aumento:

Anfetaminas.

Atropina.

Eritromicina.

Hierro dextran.

Vancomicina.

Tetraciclina.

Disminución:

Acetaminofen.

Ampicilina.

Analgésicos.

Barbitúricos.

Cloramfenicol.

Cefaloridina.

Clorpromacina.

Fenotiacina.

Furosemda.

Griseofulvina.

Penicilina.

Prednizolona.

Vitamina A.

Vitamina K.

Anexo 24.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución en el fibrinógeno (2,128).

Aumento:

Cloramfenicol.

Estrógenos.

Disminución:

Kanamicina.

Oxitocina.

Testosterona.

Anexo 25.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de reticulocitos en el frotis sanguíneo (64,128).

Aumento:

Furazolidona.

Penicilina.

Disminución:

Cloramfenicol.

Anexo 26.- Fármacos que pueden producir aumento en el conteo diferencial leucocitario (128).

LINFOCITOS	MONOCITOS	EOSINOFILOS	NEUTROFILOS
Griseofulvina	Clorpromacina Ampicilina Griseofulvina	Cefalexina Cefaloglicina Cefaloridina Cefalotina Cloramfenicol Clorpromacina Tetraciclina Estreptomina Fenotiacina Kanamicina Nistatina Penicilinas Vancomicina	

Anexo 27.- Fármacos que pueden producir disminución en el conteo diferencial leucocitario (128).

LINFOCITOS	MONOCITOS	EOSINOFILOS	NEUTROFILOS
		Anfotericina B Ampicilina	Acetaminofen Ampicilina Cefaloglicina Cefalotina Cloramfenicol Clorpromacina Penicilina Tetraciclina Vitamina A

Anexo 28.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de glucosa sérica (128).

Aumento:

Clorpromacina.  
Estrógenos.  
Furosemida.  
Isoproterenol.

Eritromicina.  
Fenotiacina.  
Hierro dextran.

Disminución:

Acetaminofen.  
Anfetaminas.  
Barbitúricos.  
Lincomicina.  
Oxitocina.  
Testosterona.

Acetazolamida.  
Atropina.  
Cloramfenicol.  
Oxitetraciclina.  
Progesterona.  
Tetraciclina.

Anexo 29.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de albúminas (53,158).

Aumento:

Ampicilina.

Disminución:

Acetaminofen.  
Estrógenos.  
Penicilina.

Anexo 30.- Fármacos que pueden producir aumento o disminución de globulinas (128).

Aumento:

Progesterona.

Disminución:

Estrógenos.

**VALORES DE REFERENCIA.**

Cuadro 2. - VALORES NORMALES DE ELECTROLITOS EN SANGRE RECOPIADOS DE DIFERENTES AUTORES.

	UNIDADES	BOVINO	BOVINO	OVINO	PORCINO	CANINO	FELINO	CAPRINO
SODIO	mEq/l	132-152	132-152	132-161	135-160	137-154	143-158	130-156
POTASIO	mEq/l	2.7-4.7	3.9-5.8	3.5-5.4	4.9-7.1	3.6-5.8	4-4.5	3.5-6.7
CLORO	mEq/l	98-109	97-111	95-115	100-105	99-119	117-123	99-110
BICARBONATO	mEq/l	18-30	17-30	17-25	17-29	17-24	17-24	17-29
CALCIO	mg/dl	9-13.6	9.4-12.4	11.5-12.8	7.1-11.6	6.1-14.2	6.2-10.8	8.8-11.7
FOSFORO	mg/dl	3.1-5.6	5.6-6.5	5-7.3	5.3-9.6	4-9	4.5-8.1	6.0-6.7
RECOPIADO DE: 7,24,26,43,99,116.								

Cuadro 3.- VALORES HEMATOLOGICOS NORMALES RECOPIADOS DE DIFERENTES AUTORES.

	EQUINO P SANGRE	EQUINO CRIOLLO	BOVINO	OVINO	POPCINO	CANINO	FELINO	CAPRINO
HEMATOCRITO %	30-58	24-44	24-50	22-50	32-50	34-55	24-46	24-48
HEMOGLOBINA g/dl	10-18	8-14	8-15	8.5-16	9-17	12-17	8-16	8-14
G. ROJOS X 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	7-13	5.5-9.5	5-10	8-16	5-9	5-9	5-10	8-22
V S G mm X 10 min.	2-12	2-12	-	-	-	-	-	-
mm X 1 hr.	51-63	51-63	0	0	1-14	8-26	7-23	0
mm X 24 hrs.	-	-	1-8	3-8	-	-	-	2-3
V G M fl	40-49	37-52	30-60	23-50	32-68	60-77	40-55	18-37
H G M pg	13-23	15-18	11-18.6	9-13	16.6-23	19-25	13-17	4.5-7.4
C H G M g/dl	30-37	31-38	26-36	29-38	30-35	29-36	30-36	30-40
G. BLANCOS X 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	8-15	5-12	4-13	4-13	7-22	6-20	5.5-19	5-16
NEUTROFILOS SEG %	30-70	35-75	15-55	10-55	28-50	60-77	35-75	30-48
N. EN BANDA %	0-2	0-2	0-2	0-2	0-5	0-3	0-3	0-2
LINFOCITOS %	25-70	15-50	45-75	40-75	39-62	12-30	20-45	50-70
MONOCITOS %	5-8	2-12	2-7	1-6	2-10	2-12	1-4	1-4
EOSINOFILOS %	.5-15	1-12	2-10	1-10	.5-11	2-10	2-12	3-8
BASOFILOS %	0-3	0-3	0-2	0-3	0-3	RAROS	RAROS	0-2
RETICULOCITOS %	-	-	RAROS	RAROS	0-2	0-1.5	0-2.5	RAROS

RECOPIADO DE: 7,24,26,43,99,116.

Cuadro 4.- VALORES NORMALES DE LAS PRUEBAS DE COAGULACION RECOPIADOS DE DIFERENTES AUTORES

	UNIDADES	EQUINO	BOVINO	OVINO	PORCINO	CANINO	FELINO	CAPRINO
PLAQUETAS	$\times 10^5/\text{mm}^3$	1-8	1-8	2.5-7.5	1.9-5.2	2-9	1.5-7	2.5-7.5
TIEMPO DE SANGRADO	minutos	1-5	1-5	1-5	1-5	1-5	1-5	1-5
TIEMPO DE COAGULACION LEE Y WHITE	minutos	4-15	4-15	3-12	3-12	3-13	3-8	3-12
TIEMPO DE COAGULACION CAPILAR	minutos	3-15	3-15	1-5	1-5	1-5	1-5	1-5
T P T	segundos	42-70	44-64	44-64	18-25	18-25	18-25	44-64
T P	segundos	22-30	18-28	18-28	8-13	8-13	8-13	18-28
T T	segundos	7.7-11.7	15-20	15-20	15-20	7-12	15-20	15-20

RECOPIADO DE: 7,24,26,43,99,116.

Cuadro 5.- VALORES NORMALES DE QUIMICA SANGUINEA RECOPIADOS DE DIFERENTES AUTORES.

	UNIDADES	EQUINO	BOVINO	OVINO	POPCINO	CANINO	FELINO	CAPRINO
GLUCOSA	mg/dl	60-100	35-60	35-60	65-95	60-75	53-120	45-60
N U S	mg/dl	15-30	20-30	8-20	8-24	10-20	20-30	10-20
CREATININA	mg/dl	0.5-2	0.5-2	1-2	1-2.7	1-2	0.8-2	1-1.8
ACIDO URICO	mg/dl	0.9-1.1	0.5-2	0.5-1.9	0.5-1.9	0.1-1	0.1-1	0.3-1
PROTEINAS TOTALES	g/dl	5.7-7.9	6-8	5.5-7.5	6.8-7.9	5.5-7.5	5.4-7.5	6-7.5
ALBUMINA	g/dl	2.8-3.5	3.4-4	2.5-4	1.8-3.4	2-4	2.7-3.8	3.7-4.2
GLOBULINA	g/dl	2.6-5.5	3.7-5	2-5	4-6	2.7-4.4	2-5	2.6-4.1
COLESTEROL TOTAL	mg/dl	75-150	80-120	52-76	36-54	125-250	95-130	80-130
BILIRRUBINA TOTAL	mg/dl	0.2-2	0.1-.47	0.1-.42	0.1-0.6	0.1-0.6	0.1-0.2	0-0.1
DIRECTA	mg/dl	0-0.4	0.4-.44	0-.27	0-0.3	.06-.12	.06-.12	0-0.3
INDIRECTA	mg/dl	0.2-2	0-0.3	0-.12	0-0.3	.01-.49	.01-.49	0-.15

RECOPIADO: 7,24,26,43,99,116.

Cuadro 6.- VALORES DE ENZIMAS SERICAS RECOPIADOS DE DIFERENTES AUTORES.

	UNIDADES	EQUINO	BOVINO	OVINO	PORCINO	CANINO	FELINO	CAPRINO
T G O	UI/1	58-94	20-34	79+11	8.2-21.6	6.2+13	6.7-11	43-132
T G P	UI/1	1-6.7	4-11	11+1	9-17	4.8-24	1.7-14	7-24
D H L	UI/1	41-104	176-365	60-111	96-160	10-36	16-69	31-99
F A S	UI/1	11-31	0-38	5-30	9-31	3-16	2-7	7-30
C P K	UI/1	2.4-23.4	4.8-12.1	8-12.9	2.4-22.5	1.1-28.4	7.2-28.2	.8-8.9
AMILASA	UI/1	75-150				185-700		
	U Caraway	12-80	20-60	20-40	-	hasta 1000	100-150	20-40
LIPASA	UI/1					13-200	0-83	
	mU/ml	1.5	1.0	1.0	-	0-1	1.0	-

RECOPIADO DE: 7,24,26,43,99,116.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Ackroyd, J.F.: A Simple Method of Estimating Clot Retrac-  
tion with a Survey of Normal Values and the Changes that  
occur with Menstruation. Clin. Sci. Lond. 7:231. (1949).
- 2.- Alexander, F.: An Introduction to Veterinary Medicine.  
Ed. Churchill & Livingston. 2a. ed. London, England.  
(1973).
- 3.- Anderson, N.V.: The Pancreas. J. Am. Med. Assoc. 9:89-100.  
(1973).
- 4.- Anderson, R.R., y Mixner, J.P.: Improved Photometric  
Method for Assaying Phenolsulfonphthalein in the Blood  
of Cattle in Test for Renal Function. J. Dairy Sci.  
43:1471-1475. (1960).
- 5.- Balcells, G.A.: La Clínica y el Laboratorio. Ed. Marín.  
10a. ed. Barcelona, España. (1974).
- 6.- Benitez, S.V.: Manual de Química Clínica para el Labora-  
torio de A.B.C. I. Tesis de Licenciatura. FES-C. UNAM.  
(1985).
- 7.- Benjamin, M.M.: Manual de Patología Clínica en Veterina-  
ria. Ed. LIMUSA. 1a. ed. México, D.F. (1984).
- 8.- Bennington, R.A.: El Laboratorio en el Diagnóstico Clí-  
nico. Ed. La Prensa Médica Mexicana. 3a. ed. México, D.  
F. (1976).
- 9.- Berger, L., y Rudolph, G.N.: Alceline and Phosphatase  
in Standar Methods of Clinical Chemistry S. Meltes, Ed.  
New York Academic Press. (1963).
- 10.- Bessey, O.A., Lowry, O.H., y Brock, M.J.: A Method for  
Rapid Determination of Alkaline with five cubic Milime-  
ters of Serum. J. Biol. Chem. 164:321. (1946).
- 11.- Bijster, P., Vader, H.L. y Vink, C.L.: On the Standar  
Disation of the Direct Spectrophotometric Bilirubin De-  
termination. Ann. Clin. Biochem. 18:102-105. (1981).
- 12.- Bloom, F.: Diagnóstico y Tratamiento de los Desordenes  
Hepáticos en el perro. The North American Veterinarian.  
1:177-191. (1957).

- 13.- Bonsnes, R.W. y Taussky, H.J.: On the Colorimetric Determination of Creatine by the Jaffe Reaction. J. Biol. Chem. 158:581-584. (1945).
- 14.- Borow Manual.: Respuestas Fisiológicas en la Salud, en la Enfermedad. Ed. El Manual Moderno. 1a. ed. México D. F. (1976).
- 15.- Butrón, A.R., y Ucampo, C.L.: Evaluación de la Interferencia Provocada por el Levamisol y el Refoxanide en los resultados de Pruebas de Laboratorio Clínico en Bovinos. Vet. Mex. 12:223-228. (1981).
- 16.- Byrd, S.L.: Hematología. Ed. Interamericana. 4a. ed. México, D.F. (1978).
- 17.- Cabaud, P.G., y Wroblewsky, F.: Colorimetric Measurement of Lactic Dehydrogenase Activity of Body Fluids. Am. J. Clin. Path. 30:234. (1958).
- 18.- Campbell, M.F.: Significado Clínico de la Hematuria. RASSEGNA. 1:43-53. (1980).
- 19.- Cantarow, A.: Química Clínica. Ed. Interamericana. 4a. ed. México, D.F. (1969).
- 20.- Careway, W.T.: Uric Acid in Standard Methods of Clinical Chemistry. New York Academic Press. 4:239. (1963).
- 21.- Casarett, L., y Doull, J.: Toxicology, the Basic Science of Poisons. Ed. Macmillan Publishing Co. 5a. ed. New York, USA. (1975).
- 22.- Castellanos, R.I.: Hematología Práctica. Ed. Panamericana. 2a. ed. Buenos Aires, Argentina. (1965).
- 23.- Center, S.A., y Baldwin H.: Evaluation of Serum Bile Acid Concentrations for the Diagnosis of Portosystemic Venous Anomalies in the Dog and Cat. J. Am. Vet. Med. Assoc. 10:122. (1985).
- 24.- Coffin, D.L.: Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria. Ed. La Prensa Médica Mexicana. 3a. ed. México, D.F. (1959).
- 25.- Coleman, A.: Manual de Coleman Instruments. (1960).

- 26.- Coles, E.H.: *Petología y Diagnóstico Veterinarios*. Ed. Interamericana. 1a. ed. México, D.F. (1968).
- 27.- Cornelius, C.E.: *Urinalysis: The Microscopic Sediment*. Calif. Vet. 10:30-31. (1957).
- 28.- Cronin, R.E., y Schrier, R.W.: *Insuficiencia Renal Aguda: Diagnóstico, Patogénesis y Tratamiento*. Tribuna Med. 1:1-8. (1974).
- 29.- Crosby, W.H., y Furth, F.N.: *Standardizing a Method for Clinical Hemoglobinometry*. Armed Forces Med. J. 5:693. (1954).
- 30.- Cheesbroughtm, M.J.: *Manual de Laboratorio para Hospitales Rurales en zonas Tropicales*. Ed. CECOSA. 1a. ed. México, D.F. (1979).
- 31.- Church, D.B.: *A Comparison of Intravenous and Oral Glucose Tolerance Test in the Dog*. Research in Vet. Sci. 29:353-359. (1980).
- 32.- Davidsohn, I.: *Diagnóstico Clínico para el Laboratorio*. Ed. Salvat. 6a. ed. Barcelona, España. (1978).
- 33.- Davie, E.W., y Ratnoff, O.D.: *Mecanismo en Cascada para el Proceso Intrínseco de la Coagulación Sanguínea*. Vet. Sci. 145:1310. (1964).
- 34.- De Buen de A.N.: *Citología Vaginal. Memorias sobre el curso de Actualización de Laboratorio Clínico*. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM. (1986).
- 35.- Dendi, J.A.: *Temas de Farmacología Veterinaria*. Ed. Hemisferio Sur. 1a. ed. México, D.F. (1978).
- 36.- Deppe, G.R., y Vives, M.V.: *Test Renal de la Fenolsulfonftaleína (FSF) en Vacas*. J. Dairy Sci. 20:33-36. (1972).
- 37.- DiBartola, S.P., Chew, D.J., y Jacobs, G.: *Quantitative Urinalysis Including 24 Hour Protein Excretion in the Dog*. J. of the Am. An. Hosp. Assoc. 16:537-547. (1980).
- 38.- Diéguez, S.R.: *Valor Pronóstico de las Alteraciones en las Pruebas de la Tercera Fase de la Coagulación de los Pacientes Sépticos*. Tesis de Licenciatura. FES-C. UNAM.

- (1987).
- 39.- Dobowski, K.M.: Anortotoluidina Method for Body-Fluid Glucose Determination. Clin. Chem. 8:215-220. (1962).
  - 40.- Drabkin, D.L., y Austin, J.H.: Spectrophotometric Studies: Preparations from Washed Blood Cells Nitric Oxide Hemoglobin and Sulf Hemoglobin. J. Biol. Chem. 112:51. (1936).
  - 41.- Duke, W.W.: The Relation of Blood Platelets to Hemorrhagic Disease. J. Am. Med. Assoc. 55:1195-1910. (1970).
  - 42.- Dukas, H.H.: Fisiología de los Animales Domésticos. Ed. Aguilar. 3a. ed. México, D.F. (1970).
  - 43.- Duncan, J.R.: Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology. Ed. The Iowa State. University Press. Ames, Iowa. (1977).
  - 44.- Enmerich, V.H.: Cytology of Transudates and Exudates Vol. 5. Ed. Skarger, USA. (1977).
  - 45.- Feldman, B.F.: Bilirubin Measurement: How Useful is it ? California Veterinarian. 9:11-13. (1978).
  - 46.- Fenantes, T.E., y Guevera, C.E.: Citología Clínica. Ed. La Prensa Médica Mexicana. 1a. ed. México, D.F. (1980).
  - 47.- Feigenbaum, A.V.: Control Total de la Calidad. Ed. El Ateneo, 3a. ed. México, D.F. (1963).
  - 48.- Ferris, J.A.: Comparison and Standardization of the Urine Microscopic Examination. Lab. Med. 10:659-662. (1963).
  - 49.- Ferro, P.V., y Ham, A.B.: Rapid Determination of Total and Free Cholesterol in Serum. Am. J. Clin. Path. 33:545-550. (1960).
  - 50.- Fetter, R.: Sistema de Control de Calidad. Ed. El Ateneo. 12a. ed. México, D.F. (1971).
  - 51.- Freeman, J.A., y Beeler, M.: Laboratory Medicine & Clinical Microscopy. Ed. Lea & Febiger, 2a. ed. Philadelphia, USA. (1974).
  - 52.- Frey, R., Sehhati, G., y Theiss, D.: Transtornos del

- Equilibrio Acido-Básico: Su Reconocimiento y Tratamiento. Münchener Med. Wochens. 4:205-210. (1978).
- 53.- Frimmer, M.: Farmacología y Toxicología Veterinarias. Ed. Acribia. 1a. ed. Zaragoza, España. (1974).
- 54.- Ganong, F.W.: Manual de Fisiología Médica. Ed. El Manual Moderno. 7a. ed. México, D.F. (1980).
- 55.- Giese, A.: Fisiología Celular y General. Ed. Interamericana. 3a. ed. México, D.F. (1975).
- 56.- Glasser, L.: Líquidos Orgánicos: Signos de Sinovia. Reumatología Práctica. 3:19-25. (1980).
- 57.- Goldston, R.T., Seybold, I.M. y Wilkes, R.D.: Urianálisis: Examination of the Urine Sediment. Vet. Med. Small An. Clin. 12:1816-1819. (1980).
- 58.- Goldston, R.T., Wilkes, R.D. y Seybold, I.M.: The Basic Clinical Pathology Laboratory-2: Collection and Preservation of Specimens. Vet. Med. Small An. Clin. 2:201-204. (1980).
- 59.- Goldston, R.T., Wilkes, R.D., y Seybold, I.M.: The Basic Clinical Pathology Laboratory-3: Evaluation of the Erythrocytes: Hematocrit and Hemoglobin Determinations. Vet. Med. Small An. Clin. 3:407-410. (1980).
- 60.- Goldston, R.T., Wilkes, R.D., y Seybold, I.M.: The Basic Clinical Pathology Laboratory-4: Evaluation of the Erythrocytes (Total Erythrocyte Count, Erythrocyte Indices and Sedimentation Rate). Vet. Med. Small An. Clin. 4:586-590. (1980).
- 61.- Goldston, R.T., Wilkes, R.D., y Seybold, I.M.: Evaluation of Renal Function: Blood Urea Nitrogen and Creatinine Determinations. Vet. Med. Small An. Clin. 14:157-158. (1981).
- 62.- Goldston, R.T., Wilkes, R.D., y Seybold, I.M.: Hepatic Function Test: Bilirubin Metabolism, Bromosulphalein (BSP) Excretion Test. Vet. Med. Small An. Clin. 18:795-796. (1981).

- 63.- Goldston, R.T., Wilkes, R.D., y Seybold, I.M.: Hepatic Function: Diagnosis, Treatment, and Management of Hepatic Disease. Vet. Med. Small An. Clin. 20:1123-1125. (1981).
- 64.- Goth, A.: Medical Pharmacology. Ed. The C.V. Mosby Co. 7a. ed. Saint Louis, USA. (1974).
- 65.- Gradwohl, R.: Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Ed. Sam Frankel. 7a. ed. Saint Louis, USA. (1970).
- 66.- Gros, K.W.: Test of Kunkel. J. Clin. Invest. 130:1942. (1940).
- 67.- Gundin, A., De Diego, L.G.: Valores Séricos de Algunas Enzimas Hepatoespecíficas en el Perro. Gac. Vet. Buenos Aires. 361:465-466. (1981).
- 68.- Ham, W.A.: Histología. Ed. Interamericana. 7a. ed. México, D.F. (1977).
- 69.- Hardisty, R.M., e Ingram, G.I.: Bleeding Disorders Investigation and Management. F.A. Davis, Co. Philadelphia, USA. (1966).
- 70.- Harper, H.A.: Química Fisiológica. Ed. El Manual Moderno. 6a. ed. México, D.F. (1982).
- 71.- Hellebrekers, L.J., y Slappendel, R.J.: Effect of Sodium Heparin and Antithrombin III Concentration on Activated Partial Thromboplastin Time in the Dog. Am. J. Vet. Res. 7:1460-1462. (1985).
- 72.- Henry, R.J.: Clinical Chemistry. Principles and Technics. New York. Hober Med. Div. Harper and Row Publishers. pp. 559. (1964).
- 73.- Hepler, D.E.: Manual of Clinical Laboratory Methods. 16a. Impresión. Charles C. Thomas. Publisher Springfield. Illinois, USA. (1968).
- 74.- Hill, F.W., y Kidder, D.E.: The Estimation of Daily Faecal Trypsin Levels in Dogs as an Indicator of Gross Pancreatic Exocrine Insufficiency. J. Small An. Pract. 11:191-195. (1970).

- 75.- Hyash, Y., y Kawai, T.: Ilustred Laboratory Techniques. Ed. Nozomu Kosakai. Tokio, Japón. (1969).
- 76.- Iovine, E., y Selva, A.: El Laboratorio en el Diagnóstico de las Enfermedades. Ed. Médica Panamericana. 4a. ed. Buenos Aires, Argentina. (1979).
- 77.- Kaneko, J.J.: Carbohydrate Metabolism, In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals. New York Academic Press. 3:248. (1970).
- 78.- Kaneko, J.J.: Pancreatic Function, In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals. New York Academic Press. 3:256. (1970).
- 79.- Kaplan, A.: Urea Nitrogen and Urinary Ammonia, In: Standard Methods of Clinical Chemistry. New York Academic Press. 8:128. (1965).
- 80.- Kark, R.M., y Lawrence, J.R.: Manual Práctico del Urianálisis. Ed. La Prensa Médica Mexicana. 2a. ed. México, D.F. (1966).
- 81.- Kim, D.H., Ono, K., y Hasegawa, A.: Urinary Amyloids in Bovine Amyloidosis. Jap. J. Vet. Sci. 1:129-132. (1985).
- 82.- Koepf, A.J.: Diagnóstico Clínico del Laboratorio. Ed. Interamericana. 1a. ed. México, D.F. (1971).
- 83.- Kolmer, J.A.: Diagnóstico Clínico por los Análisis de Laboratorio. Ed. Interamericana. 3a. ed. México, D.F. (1963).
- 84.- Koss, L.G.: Diagnostic Cytology and Histopatologic Bases. Ed. Lea & Febiger. 3a. ed. USA. (1979).
- 85.- Lenhinger, L.A.: Bioquímica. Ed. Omega. 6a. ed. México, D.F. (1978).
- 86.- Levine, R.R.: Pharmacology, Drug Actions and Reactions. Ed. Little, Brown & Co. 1a. ed. Boston, USA. (1973).
- 87.- Limman, J.: Hematología. Ed. Mc. Millan Publisher. 3a. ed. (1975).
- 88.- Link, J.A.: Clinical Aspiration Cytology. Ed. J.B. Lippincott Company. 3a. ed. USA. (1983).

- 89.- Loeb, W.F. y Edge, L.I.: A Method for the Determination of Serum Amylase in the Dog. Am. J. Vet. Res. 23:1117-1119. (1962).
- 90.- Lopez, B.C., y Gonzalez, M.S.: Manual de Laboratorio de Bioquímica, ENEP I. UNAM (1975).
- 91.- Lynch, J.S.: Métodos de Laboratorio. Ed. Interamericana. 2a. ed. México, D.F. (1972).
- 92.- MacLagan, N.F.: The Thymol Turbidity Test as an Indicator of Liver Disfunction. Brit. J. Exp. Path. 25:234. (1944).
- 93.- Mackay, N., Gordon, A., y Neilson, J.M.: Observer Error in Dextrostix Estimations of Blood Sugar. Lancet, pp 269-270. (1965).
- 94.- Malloy, H.T. y Evelyn, K.A.: The Determination of Bilirubin with the Photoelectric Colorimeter. J. Biol. Chem. 119-431 (1937).
- 95.- Manual of Clinical Chemistry Procedures.: Date Reagens. Miami, USA. pp 56. (1965).
- 96.- Marcos, E.R.: Determinación de Parámetros Sanguíneos Relacionados con el Funcionamiento Hepático en Ganado Lechero. Colesterol Total y TGO. Gac. Vet. Buenos Aires. 353:537-545. (1980).
- 97.- Marjoire, K.: Standar Methods of Clinical Chemistry. New York, Academic Press. 2:12. (1958).
- 98.- Maxwell, B.: Respuestas Fisiológicas en la Salud y en la enfermedad. Ed. El Manual Moderno. 2a. ed. México, D.F. (1976).
- 99.- Medway, W.: Patología Clínica Veterinaria. Ed. UTHEA. 1a. ed.. México, D.F. (1973).
- 100.- Merck Test. Manual de Técnicas. (1982).
- 101.- Multistix, Ames División.: Laboratorios Miles de México, S.A. (1984).
- 102.- Myron, E.T.: Pruebas de Función Hepática. Tribuna Médica. 1:13-16. (1980).

- 103.- Nutall, F.Q., y Wedin, D.S.: A Simple Rapid Colorimetric Method for Determination of Creatine Kinase Activity. J. of Lab. and Chem. Med. 68:324. (1966).
- 104.- Osborne, A.C., y Stevens, J.B.: Manual del Sedimento Urinario en Perros y Gatos. Cuadriservicio, Purina 1:1-10. (1986).
- 105.- Owren, P.A.: Trombotest. A new Method Controlling Anticoagulant Therapy. Lancet. J. Med. Sci. 11:754. (1959).
- 106.- Perez, G.P.: Alteraciones del Volumen y Composición de los Líquidos Corporales. Prensa Med. Mex. 8:268-272. (1972).
- 107.- Porter, W.H.: Calibration and Evaluation of an Enzymatic Procedure for Determination of Total Serum Cholesterol. Lab. Med. 11:7-9. (1980).
- 108.- Protor, R.R., y Rapaport, S.I.: The Partial Thromboplastin Time with Kaolin. A simple Screening Test for First Stage Plasma Clotting Factor Deficiencies. Am. J. Clin. Path. 7:26-30. (1961).
- 109.- Quick, A.J.: Hemorrhagic Disease. Ed. Lea & Febiger. 3a. ed. Philadelphia, USA. (1957).
- 110.- Quick, A.J., y Hussey, C.: Prothrombin and the one Stage Prothrombin Time. Brit. Med. J. 1:934. (1955).
- 111.- Radeleff, R.D.: Veterinary Toxicology. Ed. Lea & Febiger. 2a. ed. Philadelphia, USA. (1970).
- 112.- Reinhold, J.G.: Standar Methods of Clinical Chemistry. New York, Academic Press. 1:88. (1953).
- 113.- Reitman, S., y Frankel, S.: A Colorimetric Method for the Determination of Serum Glútemic Pyruvic Transaminase. Am. J. Clin. Path. 28:36. (1957).
- 114.- Ruiz, F., y Durruty, P.: Estudio Comparativo de Técnicas con Cintas Reactivas para la Determinación de Glucosa en Sangre. Rev. Med. Chile. 110:236-241. (1982).
- 115.- Schales, O., y Schales, S.S.: Simple Method for Determination of Chloride in Biological Fluids. J. Biol. Chem. 140:879. (1941).

- 116.- Schalm, O.W.: Diagnóstico Diferencial de las Anemias en Bovino. Práctica Bovina. 1:16-22. (1980).
- 117.- Schalm, O.W.: Veterinary Hematology. Ed. Internacional. Copyright Union. 3a. ed. USA. (1975).
- 118.- Schoenheimer, R., y Sperry, W.M.: Micromethod for the Determination of Free and Combined Cholesterol. J. Biol. Chem. 106:745. (1954).
- 119.- Seybold, I.M.: The Pancreas: Exocrine Pancreatic Insufficiency. Vet. Med. Small Anim. Clin. 24:1709-1711. (1981).
- 120.- Sirridge, M.S.: Laboratory Evaluation of Hemostasis. Ed. Lea & Febiger. 1a. ed. Philadelphia, USA. (1967).
- 121.- Sniwely, N.: Líquido y Electrolitos. Ed. Panamericana. 2a. ed. Buenos Aires, Argentina. (1973).
- 122.- Stegemann, H., y Noeschke, V.: Microdetermination of Nitrogen as Indophenol blue by Chloramine-T Oxidation. Physiol. Chem. 320:241. (1962).
- 123.- Strombeck, D.R.: New Method for Evaluation of Chymotrypsin Deficiency in Dogs. J. Vet. Med. Assoc. 173:1319-1323. (1978).
- 124.- Strombeck, D.R.: Serum Amylase and Lipase Activities in the Diagnosis of Pancreatitis in Dogs. Am. J. Vet. Res. 42:1966-1970. (1981).
- 125.- Symposium on Electrolytes: Proceedings Oxford Symposium Publication Division Pergamon. (1962).
- 126.- Tood & Sanford.: Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Ed. Salvat. 6a. ed. México, D.F. (1978).
- 127.- Valdecasas, F.G.: Bases Farmacológicas de la Terapéutica Médica. Ed. Salvat. 1a. ed. Barcelona, España. (1959).
- 128.- Velásquez, L.: Interpretación del Examen General de Orina. Biol. Med. Hosp. Infant. Mex. 40:274-282. (1983).
- 129.- Wallech, J.: Interpretación de los Diagnósticos de Laboratorio. Ed. Salvat. 2a. ed. Barcelona, España. (1981).

- 130.- Weiss, L.: The Blood Cells and Hematopoietic. Ed. Mc. Graw Hill. 3a. ed. New York, USA. (1977).
- 131.- Weller, H.: Clinical Importance and Determination of Blood Lipid Especially Critical Observation on Cholesterol Determination. Rontgen as Indophenol blue by Choramine-T Ixidation. Physiol. Chem. 320:241. (1962).
- 132.- White, A.: Principios de Bioquímica. Ed. Mc. Graw Hill. 2a. ed. Madrid, España. (1978).
- 133.- White, W., y Frankel, S.: Chemistry for Medical Technologist. Ed. Iowa State. 2a. ed. Iowa, USA. (1965).
- 134.- Wilkes, R.D.: The Pancreas: Diabetes Mellitus. Vet. Med. Small Anim. Clin. 22:1415-1417. (1981).
- 135.- Wilkes, R.D.: The Pancreas: Evaluating Blood Glucose. Vet. Med. Small Anim. Clin. 21:1275-1277. (1981).
- 136.- Wilkes, R.D.: Protein Metabolism and Blood Ammonia Tests. Vet. Med. Small Anim. Clin. 19:960-964. (1981).
- 137.- Wilkes, R.D., Goldston, R.T. y Seybold.: Urinalysis: The Physical and Chemical Examination. Vet. Med. Small Anim. Clin. 19:1683-1686. (1980).
- 138.- Williams, R.: Tratado de Endocrinología. Ed. Salvat. 3a. ed. México, D.F. (1975).
- 139.- Wintrobe, M.M.: Clinical Hematology. Ed. Lea & Febiger. 7a. ed. Philadelphia, USA. (1974).
- 140.- Zak, R.C., Dickenman, E.E., y White, H.: Rapid Estimation of Free and Total Cholesterol. Am. J. Clin. Path. 33:545. (1954).