

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE HEMATOLOGÍA

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA:

MA. GUADALUPE CHAPARRO HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

MEXICO, D.F. 06 DE SEPTIEMBRE DE 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS A:

JEHOVA DIOS, CREADOR DE MI EXISTENCIA Y A **JESUCRISTO** QUE ME HAN APOYADO EN TODO MOMENTO DE MI VIDA Y AL RECORDAR LOS DIFICILES MOMENTOS DE MI FORMACION ACADEMICA SE QUE ESTUVIERON CONMIGO Y ME PERMITIERON CONCLUIR ESTA TAN ANHELADA META EN MI VIDA..... GRACIAS

Para que vuestra Fe no esté fundada en la sabiduría de los hombres, sino en el poder de Dios. (Corintios 2:5)

A MI MADRE... POR SER EJEMPLO Y GUIA DE TODOS SUS HIJOS POR LOS CAMINOS DE LA INQUIETUD INTELECTUAL.

A MI PADRE... POR SUS PRINCIPIOS INFLEXIBLES QUE GUIARON MI VIDA.

A MIS HIJOS...CLAUDIA, MARY, MARTIN Y FANNY POR DAR SABOR, VALOR Y SENTIDO A MI VIDA.

A MIS HERMANOS...ENRIQUE, LUIS, MARTIN. TERE, LUCERO, JUAN, CARMEN Y PILAR POR TODO SU AMOR Y APOYO INCONDICIONAL.

A TODOS MIS PROFESORES...DE FES-ZARAGOZA MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO POR SUS CONOCIMIENTOS ADQUIRIDOS PARA MI FORMACION PROFESIONAL Y MUY EN ESPECIAL A LA **DRA. MARTHA A. SANCHEZ RODRIGUEZ** POR SU VALIOSISIMA CONTRIBUCION QUE HIZO POSIBLE LA REAIZACION DE LA PRESENTE TESIS..... GRACIAS

CONTENIDO

1.- Resumen.....	1
2.- Introducción.....	2
3.- Marco teórico.....	5
3.1 Normatividad.....	6
3.2 Certificación.....	7
3.3.- Hematología.....	8
3.4.-Contro de Calidad en Hematología.....	13
4.- Planteamiento del problema.....	17
5.- Objetivos.....	18
6.- Metodologia.....	19
7.-Diagrama de flujo.....	28
8.-Resultados.....	28
9.- Discusión.....	33
10.- Conclusión.....	36
11.- Referencias.....	37

1. RESUMEN

El análisis de la sangre compete exclusivamente al laboratorio y es una de las áreas más importante de análisis de rutina y de urgencia, que proporciona al médico información con fines de diagnóstico y terapéuticos.

Debido a la relevancia que tiene la hematología en el laboratorio clínico, se elaboró un manual para el área de hematología de la Clínica MEXFAM Nezahualcóyotl realizando una revisión bibliohemerográfica de esta área en donde se recabó la información existente en la literatura documentando tanto en libros, revistas, normas SSA, artículos, así como la experiencia profesional, siguiendo lo estipulado en la NOM-166-SSA1-1997, en su apartado 4 punto 4.5, que indica que el laboratorio debe contar con un manual de todos los métodos analíticos en idioma español que deberá contener: nombre de los métodos utilizados, fundamentos, preparación, procedimientos, resultados, valores de referencias y bibliografía; y también cumplir con la Organización Internacional de Normalización (ISO) 9001-2000 en donde fundamentalmente el objetivo es demostrar que se tiene la documentación y se ha implementado un sistema de Gestión de la Calidad.

En el presente manual se establecen las metodologías para el análisis de rutina tanto manual como automatizado y está subdividido en los capítulos: biometría hemática, coagulación y pruebas cruzadas, además incluye un apartado de preparación de reactivos, ilustraciones de células eritrocitarias y leucocitos tanto normales como anormales, además de hace una propuesta de métodos simplificados para la cuantificación manual de leucocitos y plaquetas. En cada prueba de laboratorio se agregó la interpretación de resultados cuando los valores son altos o bajos.

2. INTRODUCCIÓN

La Hematología, del griego *hema*=sangre, *logo*=estudio, es el estudio de la sangre. Es una rama de la ciencia médica que se encarga del estudio de los elementos formes de la sangre y sus precursores, así como de los trastornos estructurales y bioquímicos de estos elementos, que puedan conducir a una enfermedad; comprende el estudio de la etiología, diagnóstico, tratamiento, pronóstico y prevención de las enfermedades de la sangre y órganos hematopoyéticos (médula ósea, ganglios linfáticos, bazo, etc) tanto sanos como enfermos.

El estudio de la sangre y su análisis compete exclusivamente al laboratorio clínico y es una de las áreas más importante de análisis de rutina y de urgencia, que proporciona al médico información del estado general del paciente con fines diagnósticos y terapéuticos.

Debido a la relevancia que tiene la hematología en el laboratorio clínico, se deben proporcionar al médico resultados analíticos confiables que sean útiles para establecer un diagnóstico del paciente, y su médico tratante pueda darle la terapia adecuada a sus patologías identificadas.

El profesional a cargo del área de hematología debe asegurarse que las pruebas se realizan tan pronto como sea posible después que los especímenes han llegado al laboratorio, con habilidad técnica con los controles apropiados y materiales de referencia para que sea asegurada su confiabilidad de la técnica. Pero se debe recordar y estar conscientes de las variables administrativas como es equivocación de muestra del paciente, la variabilidad biológica que

generalmente se debe a la preparación del paciente previo a la obtención de la **muestra** y la variabilidad analítica que se debe en la mayoría de las veces a condiciones de **trabajo** y al manejo de las muestras en el laboratorio, las cuales no siempre están bajo control inmediato, pero que pueden tener influencia significativa en los resultados de las pruebas.

Existen dos aspectos separados de un programa tal, denominados, control interno de la calidad, y evaluación externa de la calidad.

El control interno de calidad pretende monitorear varios aspectos como procedimientos de pruebas los cuales se realizan en el laboratorio. Incluye la medición de materiales específicamente preparados, mediciones repetidas sobre especímenes de urgencias así como análisis de datos estadísticos, día, a día, de los laboratorios, estas mediciones se proporcionan una forma de lograr la precisión (es decir reproducibilidad).

La evaluación externa de la calidad es la evaluación objetiva por una oficina externa del comportamiento de varios laboratorios sobre el material el cual es proporcionado especialmente sobre una base regional o nacional para este propósito. El objetivo es lograr la comparabilidad y posiblemente también la exactitud si el material, proporcionado para la prueba ha sido ensayado por un laboratorio de referencia de valor conocido.

La sobrevigilancia de la habilidad implica la supervisión crítica de todos los aspectos tomando en consideración la organización general del servicio de laboratorio incluyendo la recolección del espécimen, la identificación, el despacho y el almacenamiento antes de que la pruebas sean realizadas, eficiencia del

registro e información de los resultados, mantenimiento y control de equipos y aparatos, protección del personal del laboratorio contra riesgos y peligros cuando manejan los especímenes y el equipo.

En este manual se describen los métodos a seguir para cada determinación de las pruebas rutinarias que realiza el laboratorio MEX-FAM en el área de hematología, pretende que su personal que labora en esta área siga sus métodos y así establecer una unificación de trabajo, con el propósito de lograr resultados reproducibles y confiables para un buen diagnóstico, pronóstico y tratamiento del paciente, y evitar una mala interpretación de las pruebas de laboratorio que puede causar daño irreversible al paciente.

1. MARCO TEÓRICO

3.1 NORMATIVIDAD

En nuestro país, los laboratorios clínicos deben seguir la NOM-166-SSA1-1997 que tiene por objeto establecer los requisitos que deben satisfacerse para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos, es obligatoria en el territorio nacional para los profesionales, técnicos y auxiliares para la salud de los sectores público, social y privado que intervengan en la organización y funcionamiento de laboratorios clínicos.¹

En esta norma se define como laboratorios clínicos, a los establecimientos públicos, sociales y privados, independientes o ligados a algún servicio de atención médica, que tengan como fin realizar análisis clínicos y así coadyuvar en el estudio, prevención, diagnóstico, resolución y tratamiento de los problemas de salud y especifica que estos establecimientos deben contar con una serie de manuales dentro de los cuáles se encuentra el de métodos analíticos en idioma español.¹

3.2 CERTIFICACION

Por otro lado, existe una normatividad internacional que rige los sistemas de calidad, la norma ISO 9001-2000 o su equivalencia mexicana CNMX-CC-9001-IMNC-2000 de Sistemas de Gestión de Calidad. dentro de ésta se establece como uno de los requisitos para obtener la certificación ISO 9001-2000, contar con el Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) de cada una de las pruebas analíticas, en donde se describa la utilidad de la prueba, se expliquen los procesos químicos o biológicos que son la base de la prueba y la interpretación de los resultados, con miras a obtener la certificación por esta vía que garantiza que el laboratorio tiene implantado un Sistema de Gestión de la Calidad (SGC), siendo un reconocimiento nacional e internacional.^{2,3}

La Organización Internacional para la Normalización (ISO) publicó el 13 de noviembre del 2008 la norma ISO 9001- 2008, cuyo equivalente mexicano es la NMC-CC-9001-IMNC-2008 publicada en el Diario Oficial de la Federación el 12 de diciembre de 2008.⁴

La Organización Internacional de Normalización (ISO) y el Foro Internacional de Acreditación (IAF) han acordado un plan de implementación para asegurar la transición de las certificaciones acreditadas en la ISO 9001:2008, que es la última versión mundialmente usada para sistemas de gestión de calidad. ISO 9001:2008, fue publicada el 13 de noviembre de 2008, remplazando la versión 2000 de la norma, la cual esta implementada por organizaciones del sector público y privado en 170 países. Aunque la certificación no es un requisito de la norma, los sistemas de gestión de calidad en casi un millón de organizaciones han sido auditados y certificados por un organismo de certificación independiente con ISO

9001:2000.ISO e IAF y han reconocido que la ISO 9001:2008 no incluye nuevos requisitos y que solo introdujo aclaraciones a requisitos existentes de la ISO 9001:2000, basados en 8 años de experiencia de implementación de la norma a nivel mundial. También introdujo cambios que intentan implementar consistencia con la norma ISO 14001:2004.

El plan de implementación acordado con relación a las certificaciones acreditadas es el siguiente:

- La certificación obtenida con la norma ISO 9001:2008 no debió haber sido otorgada hasta que la norma fuera publicada como norma internacional.

Esto quiere decir que ninguna certificación debió haber sido otorgada antes del 4 de noviembre de 2008 con esta norma o alguna norma nacional equivalente.

- Con relación a la validez de las certificaciones otorgadas con ISO 9001:2000 o su equivalente nacional, un año después de la publicación de la norma ISO 9001:2008, todas las certificaciones otorgadas bajo una acreditación (certificaciones iniciales o re certificaciones) deben ser con ISO 9001:2008 Veinticuatro meses posteriores a la publicación de la ISO 9001:2008, ninguna certificación otorgada con ISO 9001:2000 será válida.

Todos los organismos de certificación acreditados por la entidad deberán presentar a más tardar el día 28 de febrero de 2009, su plan de transición para actualizar los certificados de sus clientes y la Entidad Mexicana de Acreditación (ema) deberá evaluar durante las evaluaciones de vigilancia y renovación que el organismo y su personal conocen y operan con la norma internacional ISO 9001:2008 o su equivalente a nivel nacional. ⁵

La Organización Internacional de Normalización (ISO) publicó en 2003, la ISO 15189: " Los laboratorios clínicos. Particular requisitos de calidad y competencia". Hacia el año 2004 se propuso como un estándar voluntario por el gobierno mexicano bajo norma NMX-CE-15189- IMNC-2006. ⁶

La norma ISO 15189, está basada en las normas ISO 17025:1999 e ISO 9001:2000, y establece los requisitos para la competencia y la calidad de laboratorios clínicos, acreditando a los laboratorios para mejorar la credibilidad y la competencia de sus servicios de pruebas. La palabra acreditación significa que los laboratorios han seguido las normas internacionalmente reconocidas para demostrar las estrategias de su competencia, imparcialidad y capacidad de rendimiento.⁷

En la aplicación de la norma ISO 15189:2003 se exige que los laboratorios demuestren su competencia a un asesor de terceros, que es por lo general un organismo nacional de acreditación. En México, el gobierno ha autorizado a la Entidad Mexicana de Acreditación (ema) como el organismo acreditador bajo la norma mexicana (NMX) y otorga la acreditación de los laboratorios clínicos. ^{6,8}

3.3 HEMATOLOGIA

Una de las áreas fundamentales en un laboratorio clínico es la de Hematología, cuya finalidad es proporcionar a los médicos resultados de pruebas analíticas solicitadas con la mayor exactitud posible. Así mismo, un objetivo importante de los mismos es que los resultados se obtengan en un tiempo razonablemente rápido, que tenga utilidad con fines de diagnóstico y terapéuticos del paciente.⁹

La hematología es una ciencia que comprende el estudio de la etiología, diagnóstico, tratamiento, pronóstico y prevención de las enfermedades de la sangre y órganos hemolinfoprodutores. Los médicos especialistas en este dominio son llamados hematólogos.

Las enfermedades hematológicas afectan la producción de sangre y sus componentes, como los glóbulos rojos, la hemoglobina, las proteínas plasmáticas, el mecanismo de coagulación (hemostasia), etc.

Esta área, para su organización puede dividirse en tres secciones fundamentales: biometría hemática, coagulación, y pruebas cruzadas.¹⁰

La biometría hemática comprende el estudio del paquete celular que se encuentra en la sangre la cual es una suspensión de células en un líquido llamado plasma que circula por el sistema vascular, formado por vasos sanguíneos de diverso calibre.

El plasma constituye aproximadamente un 50% del volumen total de la sangre, está formado por un 90% de agua, en la que se hallan disueltas diversas sustancias nutritivas, de recambio metabólico o de desecho celular. Entre ellas

destacan principios inmediatos, enzimas, electrolitos, gases y derivados del catabolismo celular. El componente plasmático más abundante está formado por proteínas que, sintetizadas en las células de los tejidos, son vertidas al plasma a través de mecanismos diversos (excreción, exocitosis o recambio celular). La mayoría de las proteínas tienen funciones concretas o específicas: catalisis (enzimas), defensa (inmunoglobulinas y complemento), transporte (transcobalamina, ceruloplasmina, transferrina), endocrina (hormonas) y hemostasia (factores de la coagulación), entre otras.

El 50% restante del volumen sanguíneo está constituido por células que, al igual que los componentes plasmáticos, se hallan sometidas a un continuo proceso de recambio o renovación. Estas células son de tres tipos: eritrocitos, leucocitos y plaquetas, y todas ellas tienen su origen en una única célula pluripotente (célula madre) situada en el tejido hematopoyético de la médula ósea. Una vez en la circulación sanguínea y después de cierto tiempo, las células son eliminadas por los (SMF) Macrófagos del Sistema Mononuclear, fagocitos de la propia médula ósea, el bazo y el hígado. El recambio celular sanguíneo se mantiene gracias al equilibrio entre la formación de células por la médula ósea (hematopoyesis) y su eliminación a nivel del SMF (muerte celular).¹¹

Los eritrocitos carecen de núcleo y organelos citoplasmáticos, y su única misión es el transporte de la hemoglobina a lo largo del sistema vascular con el fin de garantizar la oxigenación de los tejidos. Los leucocitos se clasifican en tres subpoblaciones: poliformonucleares (Neutrófilos, eosinófilos, basófilos), linfocitos y

monocitos. Todos ellos tienen una función defensiva los poliformonucleares la realizan mediante la fagocitosis o ingestión de las sustancias extrañas al organismo (formación de pus), los linfocitos B mediante la inmunidad produciendo anticuerpos contra las sustancias extrañas (inmunidad humoral) o linfocitos T actuando directamente sobre las mismas (inmunidad celular). Los monocitos tienen esencialmente la función fagocítica (macrófagos), pero intervienen también en el proceso de la inmunidad modulando algunas de sus etapas. Finalmente, las plaquetas tienen como misión prevenir la extravasación de sangre a nivel del sistema capilar y contribuir a la coagulación sanguínea en caso de hemorragia. ¹²

La sangre fluye continuamente a lo largo del sistema vascular gracias a las contracciones del corazón, la retracción de los grandes vasos, el movimiento muscular y la fuerza de la gravedad. Gracias a ello las células sanguíneas pueden realizar las importantes funciones mencionadas anteriormente y el plasma puede contribuir al metabolismo de los tejidos mediante la adecuada distribución de sustancias nutritivas a las células, la recogida de los productos de desecho resultado del metabolismo celular, la regulación del pH y el transporte de los gases respiratorios (oxígeno y bióxido de carbono). ¹⁰

El análisis clínico de la sangre recibe el nombre de biometría hemática y comprende el estudio del paquete celular el perfil o el estado sanguíneo, los cuales son:

- Recuento de eritrocitos (valor hematocrito) y sus precursores,
- Recuento de leucocitos
- Determinación de hemoglobina
- Velocidad de sedimentación globular (VSG)
- Fórmula leucocitaria (recuento diferencial de leucocitos)
- Cálculo de los índices eritrocitarios ¹³

El análisis de estas células, sus resultados y su correlación con otros análisis son una información de suma importancia que proporcionan al médico una visión global del estado del paciente, permiten establecer el diagnóstico clínico y darle la terapia adecuada de acuerdo con las patologías identificadas. ¹⁴

En el área de coagulación se lleva a cabo un examen básico de los trastornos de la coagulación sanguínea, en donde se exploran los fallos en la vía extrínseca (tiempo de protrombina [TP]), de la vía intrínseca (tiempo parcial de tromboplastina [TPT]), el fibrinógeno y la presencia de inhibidores de su formación. Todas ellas se basan en la medición cronométrica del tiempo que tarda en coagular una mezcla de todos los factores sanguíneos de la coagulación, excepto aquel o aquellos cuya deficiencia se investiga. ⁵

Finalmente, el establecimiento de pruebas cruzadas, que se encarga de la recolección de la sangre con fines terapéuticos, siguiendo las Normas Oficiales Mexicanas NOM-003-SSA2-1993, "Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos" ⁶ ; NOM-019-SSA1-93, que establece las especificaciones sanitarias del reactivo antiglobulina humana para la prueba de Coombs; ⁷; NOM-018-SSA1-1993, que establece las especificaciones sanitarias del reactivo Anti Rh para identificar el antígeno D,⁸ ; NOM-017-SSA1-1993, que establece las especificaciones sanitarias de los reactivos hemoclasificadores para determinar grupos del sistema ABO ⁹ ; se encarga de realizar la determinación del grupo sanguíneo y las pruebas cruzadas de compatibilidad. ¹⁰

3.4 CONTROL DE CALIDAD EN HEMATOLOGÍA

Con fines de control de calidad, el trabajo del laboratorio clínico puede dividirse en tres etapas: pret-analítica, analítica y post-analítica. Los manuales deben abarcar los procedimientos en estas tres etapas para lograr resultados que garanticen un buen diagnóstico, pronóstico y tratamiento del paciente, así como el reconocimiento de la sociedad de un laboratorio que trabaja con calidad. ¹¹

La etapa preanalítica es importante, y de ella depende en gran medida el resultado final. Los objetivos de las normas de control de la calidad en la fase preanalítica son:

1. Recepción de solicitudes de laboratorio.
2. Indicaciones para preparación del paciente previo a la toma de muestra.
3. Adecuada toma de muestra.
4. La correcta identificación del paciente, del solicitante y de la prueba solicitada
5. Criterios para rechazo de muestras.
6. Evitar el deterioro de la muestra mediante los procesos de obtención, manipulación transporte y conservación.

De aquí que en la etapa preanalítica se establecen las condiciones del paciente para una buena toma de muestra, se recaba información como datos personales y clínicos necesarios para la variabilidad fisiopatológica, obtención de la muestra con la mejor calidad que preserve la integridad cualitativa y cuantitativa de las células y de la hemoglobina en el caso de hematología.¹² En la etapa analítica se describe la correcta ejecución de las pruebas o exámenes. Esta etapa exige técnicas estandarizadas, equipos adecuados bien calibrados o verificados, reactivos y consumibles de calidad garantizada. El control de estos sistemas se establece en el manual que describe las especificaciones y características de los instrumentos, sus normas de funcionamiento, calibración o verificación, o bien hace referencia al manual de instrucciones del fabricante, se describen en forma sencilla y completa las técnicas manuales que verifican y validan resultados de hematología.¹³

En la etapa post-analítica se asegura la calidad de las fases preanalítica y analítica.

La fase postanalítica incluye:

- Confirmación de resultados
- Intervalos de referencia
- Puntualidad
- Confiabilidad
- Informe
- Bitacoras

Cada uno de estos pasos requiere de procedimientos y decisiones cuidadosas para incrementar la calidad de los resultados y deben ser realizados con el rigor técnico y científico exigido por un sistema de gestión de la calidad.¹⁴

Para el laboratorio clínico MEX-FAM es de vital interés, la implementación de un sistema de la gestión de la calidad en el laboratorio para beneficio de los pacientes, la sociedad, y lograr que funcione con el mayor nivel de capacidad profesional y técnica posible, debido a que tanto el diagnóstico, el pronóstico y como el tratamiento se basan con frecuencia en los resultados, y una mala interpretación de las pruebas de laboratorio puede causar daño irreversible a un paciente, por tanto en este manual se describe el sistema de calidad en hematología que quedará como un respaldo escrito del trabajo, apegado a la NOM-166-SS1-1997 y la ISO 9001-2000; describiendo detalladamente en forma

sencilla y completa las técnicas de Hematología semi-automatizadas y manuales, que pueden servir de guía para resolver dudas sobre las técnicas de esta área y unificando los criterios de trabajo para obtener resultados con calidad, confiables y reproducibles.^{1,2}

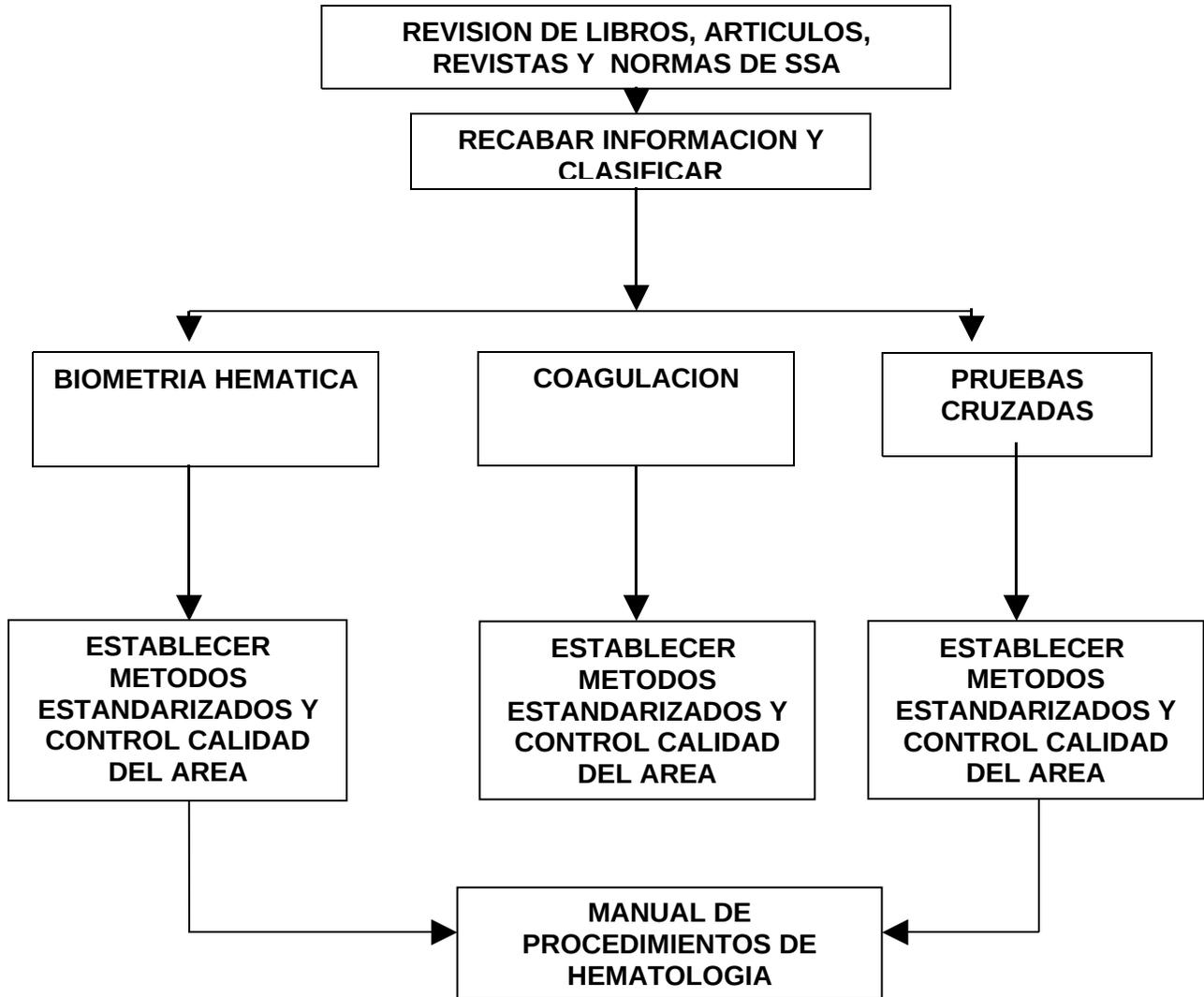
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La normatividad tanto nacional como internacional, marca que todo laboratorio clínico debe tener su propio manual de procedimientos. Para cumplir con este punto tan importante en el laboratorio MEX-FAM, se pretende elaborar un manual que estandariza los métodos a seguir en hematología, cumpliendo con la NOM-166-SSA1-1997 y la ISO 9001-2000, que a la vez unifique la forma de trabajo en el área para obtener resultados reproducibles y confiables, tanto en métodos semiautomatizados como manuales

5. OBJETIVOS

1. Elaborar un manual de procedimientos del área de hematología que describa detalladamente en forma sencilla y completa las técnicas semi-automatizadas y manuales, que resuelva dudas sobre las técnicas y unifique criterios de trabajo para obtener resultados con calidad y confiables.
2. Dar cumplimiento a la NOM-166-SSA1-1997 y a la vez cumplir con la norma internacional ISO (Sistema de Gestión de la Calidad) 9001-2000.

5. DIAGRAMA DE FLUJO:



5. RESULTADOS

Se realizó el Manual de Procedimientos de Hematología, en este manual se describieron los métodos a seguir para cada determinación de las pruebas semi automatizadas y rutinarias que se realizan en el laboratorio MEX-FAM en el área de hematología, dividiéndolo en tres secciones fundamentales: biometría hemática, coagulación, y pruebas cruzadas.

Con relación al control de calidad, el manual se dividió en sus tres etapas: pre-analítica, analítica y post-analítica.

De la etapa preanalítica se hicieron las especificaciones de recepción de solicitudes de laboratorio, indicaciones para la preparación del paciente a la toma de muestra, adecuada toma de muestra, errores en la toma de muestra, correcta identificación del paciente, solicitud y muestras recibidas, conservación y manipulación de la muestra.

En la etapa analítica se describen las técnicas de laboratorio especificando tanto de forma semi-automatizada como manual. Éstas son explicadas de manera clara, precisa y sencilla para ser llevadas a cabo por el personal del área que lo consulte y lograr la correcta ejecución de las pruebas ya que en esta etapa se exigen técnicas estandarizadas, equipos adecuados bien calibrados, reactivos y consumibles de calidad garantizada. El control de estos sistemas se establece, y se describen las especificaciones y características de los instrumentos, sus normas de funcionamiento, calibración, o bien hace referencia al manual de instrucciones del fabricante.

En la etapa posanalítica se asegura la calidad de las fases preanalítica y analítica.

La fase postanalítica incluye, confirmación de resultados, intervalos de referencia, puntualidad, confiabilidad, informe, bitácoras.

Asimismo, en este manual se ilustran los diferentes tipos de células normales encontrados en la sangre así como las anomalías más frecuentes y una explicación de las posibles alteraciones cuando los valores son altos o bajos con relación a los de referencia.

Evaluación de un método para cuantificación de leucocitos

Con relación a la cuantificación por los tres métodos después de aplicar la prueba de ANOVA, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los métodos (cuadro A) y se encontró una buena correlación entre ellos (cuadro B).

Cuadro A. Promedio y desviación estándar de las mediciones de leucocitos por diferentes métodos.

Systemex	Tradicional con pipeta de Thoma	Tradicional con pipeta de Sahli
(cél/mm³)	(cél/mm³)	(cél/mm³)
10,610 ± 4,697	10,588 ± 4,773	10,581 ± 4,671

Cuadro B. Coeficientes de regresión y determinación al comparar las cuentas de leucocitos de los métodos manuales vs. el automatizado.

Método	R	r ²
Tradicional con pipeta de Thoma	0.998	0.995
Modificado con pipeta de Sahli	0.998	0.995

Evaluación de un método analítico modificado para cuantificación de plaquetas

Para esta cuantificación, tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los tres métodos después de aplicar la prueba de ANOVA, (cuadro C) y se encontró una buena correlación entre ellos (cuadro D).

Cuadro C. Promedio y desviación estándar de las mediciones de plaquetas por diferentes métodos.

Systemex	Tradicional con pipeta de Thoma	Propuesta con pipeta de Sahli
(cél/mm ³)	(cél/mm ³)	(cél/mm ³)
245,993 ± 129,283	245,960 ± 129,297	246,266 ± 129,015

Cuadro D. Coeficientes de regresión y determinación al comparar las cuentas de plaquetas de los métodos manuales vs. el automatizado.

Método	R	r²
Tradicional con pipeta de Thoma	1.000	1.000
Modificado con pipeta de Sahli	1.000	1.000

Debido a la extensión del manual, se anexa en formato electrónico.

5. DISCUSION

Con el propósito de cumplir con la norma NOM-166-SSA1-1997, se elaboró el presente manual. Para ello se realizó una revisión bibliohemerográfica del área de hematología y se describió detalladamente en forma sencilla y completa las técnicas semi-automatizadas y manuales, ilustrando los diferentes tipos de células normales encontradas en la sangre así como las anormalidades más frecuentes y una explicación de sus posibles alteraciones, se indico posibles alteraciones fisiológicas cuando los valores son altos o bajos con relación a los de referencia, también se incluyo un anexo de preparación adecuadas de reactivos y posibles alteraciones cuando hay error en preparación.

Con relación al control de calidad, el manual se dividió en sus tres etapas:

1. La etapa pre-analítica se detalló la preparación cuidadosa de paciente, la toma de muestra y el manejo adecuado de las muestra son los primeros pasos que garantizan resultados válidos, aunque frecuentemente se descuidan, el buen cuidado de estos influirán en el resultado de la medición de resultado.¹⁶
2. La etapa analítica se realiza la medición de las muestras el objetivo del trabajo analítico es proporcionar resultados de análisis con alto nivel de exactitud, reproducible y un alto nivel de precisión.¹⁶
3. La etapa post-analítica se asegura la calidad de las fases preanalítica y analítica. Se confirman los resultados, Intervalos de referencia, puntualidad, Informe y bitácoras.¹⁷

Para facilitar el procedimiento manual, se propuso un método para la cuantificación total de leucocitos y otro para plaquetas. La variación en las

cuantificaciones cuando son realizadas en un equipo automatizado, oscila en un rango entre 2 – 4% de coeficiente de variación, a diferencia de los métodos manuales que va de 8 – 20%.¹⁴ En este sentido, la cuantificación por métodos manuales se reserva para el conteo de células en los líquidos biológicos (sinovial, pleural, cefalorraquídeo, etc.) ya que éstos no se cuantifican en contadores electrónicos por que puedan dar recuentos falsamente elevados;¹⁵ pero son métodos alternativos en caso necesario, como cuando las cuentas obtenidas en una muestra sanguínea es elevada, disminuida o el equipo no funciona.

El método propuesto, para la cuenta total de leucocitos se usa pipetas de Sahli en lugar de pipetas de Thoma, la dilución de la muestra es de 1:26 y se controla que se midan volúmenes exactos, al medir con pipeta automatizada calibrada 0.5 mL diluyente de Turk y 0.02 mL de sangre medida con pipeta de Sahli; esta dilución es muy cercana a la tradicional obtenida con la pipeta Thoma, que es de 1:20. El factor de multiplicación se calculó con la formula general para factor de dilución siendo de 65 en lugar de 50.¹⁸

Al respecto, aunque se considera que el método de referencia es el de la pipeta de Thoma, algunos autores mencionan métodos alternativos con dilución sin emplear esta pipeta, como Muñoz-Zambrano y Morón-Cotijo (2005)¹⁹ que mencionan un método en donde se usan 0.380 mL de diluyente y 0.020 mL de sangre, obteniendo una dilución de 1:20. Este método se podría implementar, pero a nosotros nos resultó más factible medir 0.5 mL con pipeta automatizada y 0.02 mL con pipeta de Salhi. Estas mismas autoras indican la misma dilución utilizada para leucocitos para la cuenta total de plaquetas; nosotros empleamos el ya

descrito para leucocitos, con un factor de dilución 1:26 y un factor multiplicación de 1300 en lugar de 1000.

Las ventajas que tienen estos métodos alternativos es que controlan la dilución, realizan la cuantificación con facilidad y rapidez, se evita errores frecuentes que se comete con la pipeta de Thoma la cual es pequeña y al tratar de llenar con un bulbo o con una boquilla se corre el riesgo de un llenado con burbujas, no llenar adecuadamente la pipeta, una inadecuada mezcla de la muestra en la pipeta de Thoma, repetir el procedimiento y emplear más tiempo en una cuantificación, usar mas material, es complejo el lavado de la pipeta requiere de bomba de succión y no contamos con ella, se corre el riesgo de una limpieza no adecuada.

Este método modificado fue valorado con 30 muestras de pacientes tomadas al azar y se les cuantifico plaquetas, leucocitos totales, por el método de pipeta de Thoma, Sysmes KX-21N, y por el método propuesto, se realizo con los resultados obtenidos un análisis de varianza y no se observaron variaciones significativa de comparación que indicaran un grado de error de rechazo por lo tanto, de acuerdo a valoración realizada se queda aceptado como un método de calidad y confiable.²⁰

Finalmente, se logró realizar el Manual de Procedimientos Hematología que servirá de guía para resolver dudas sobre las técnicas de esta área y unificará los criterios de trabajo para obtener resultados con calidad, confiables y reproducibles, lo que a la vez permite cumplir con la NOM-166-SS1-1997 y la ISO 9001-2000.

5. CONCLUSION

Se elaboró el Manual de Procedimientos de Hematología que cumple con la NOM-166-SS1-1997 y la ISO 9001-2000. Con fines para un mejor control de calidad se dividió en tres etapas pret-analítica, analítica y post-analítica, en el se describe los procedimientos adecuados de estas tres etapas, para que sean realizadas con el rigor técnico y científico exigido por un sistema de gestión de la calidad; se planteó una propuesta de métodos simplificados para cuantificación manual de leucocitos y plaquetas, en el caso de que el equipo automatizado no funcione, se realizó una valoración y análisis de varianza a estos métodos y no se observó una diferencia estadísticamente significativa con el método automatizado y de pipeta de Thoma, por tanto quedan aceptados como métodos de calidad y confiable.

Con el manual se unifican criterios de trabajo, estandariza los métodos a seguir en hematología para obtener resultados con calidad y exactitud.

REFERENCIAS

1. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-166-SSA1-1997, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. Jueves 13 de enero del 2000.
2. Norma ISO 9001:2000. Sistema de Gestión de la calidad.
3. Gouget, B. 2008. Organization and evolution of the regulation and standards in France for the clinical laboratorie. Conseiller Santé Publique, Fédération Hospitalière de France, 1 bis rue.
4. Mazziotta, D. 2008. Accreditation of clinical laboratories in the Latin-American region. Fundación Bioquímica Argentina, Argentina.
5. Laboratorios clínicos. Entidad mexicana de acreditación. Disponible en: <http://www.ema.org.mx>.
6. Sierra, RI. 2008. Mexican experience on laboratory accreditation according to ISO 15189:2003. Mexican Association of Clinical Biochemistry, Mexico City, Mexico.
7. Guzel O, Ilhan EG. 2008. ISO 15189 Accreditation: Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory I. Clin Biochem 42 (2009) 274–278.
- 5.
8. González JM. Técnicas y métodos de laboratorio clínico. 2ª ed. España: Masson; 2005. p. 3-4.
9. Hillman RO. Manual de hematología. 2ª ed. México: El Manual Moderno; 1997. p. 39,42.
10. Ruiz-Argüelles G. Fundamentos de hematología 3ª ed. México: Panamericana; 2003. p. 46, 59.
11. Henry JB. Todd- Sanford-Davidshon. Diagnóstico y tratamiento clínico para el laboratorio. 7ª ed. México: Salvat; 1984. p. 874-875.
12. Miale JB. Hematología. 16ª Ed. España: Reverte; 1985. p. 230, 233, 235.
13. John D, Bauer MD. Análisis clínicos. Métodos e interpretación. 2ª Ed. España: Reverte; 1986. p. 193-195.
14. Wintrobe MM. Hematológica clínica. 4ª ed. Buenos Aires: Inter-medica; 1979. p. 14-18.

15. Muralli D. Control de calidad en los laboratorios clínicos. Barcelona: Reverté; 2002. p. 140- 142.
16. Fernández C, Mazziotta D. Gestión de la calidad en el laboratorio clínico. Buenos Aires: Panamericana; 2005. p. 410-425, 428-432.
17. Lynch M, Stanley R, Mellor LD, Spare P, Inwood MJ. Métodos de laboratorio. 2ª ed. México: Interamericana; 1994. p. 752-758.
18. Muñoz MZ, Moran CC. Manual de procedimientos en técnicas básicas de hematología. Lima-Perú: Instituto Nacional de Salud; 2005. p. 25, 72-73.
19. Barnett RN. Estadística en el laboratorio clínico. 2ª ed. Barcelona: Reverté; 1983. Páginas 67,90-93.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE HEMATOLOGÍA

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA:

MA. GUADALUPE CHAPARRO HERNÁNDEZ

DIRECTO DE TESIS:

DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

MEXICO, D.F.

2010

INDICE

	Página
Prologo.....	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	3
Fase preanalitica.....	4
Punción de sangre venosa.....	5
Punción de sangre capilar	8
Criterios para rechazo de muestras.....	9
Fase analítica.....	11
Método automatizado Equipo Sysmex KX- 21N.....	11
..... <i>Funcionamiento del</i> <i>equipo</i>	12
Mantenimiento y paso de controles.....	13
Grafico de Levey-Jennings Normal.....	14
Reglas de Westgard.....	14
Gráfica de Levey-Jennings, aumento de precisión.....	15
Procedimiento para el análisis de muestras problema en el analizador KX-21N..	16
Alarmas del equipo.....	17

Procedimientos a seguir para cuentas muy altas o baja de leucocitos con el equipo.....	18
Valores de referencia programados en el equipo.....	18
Cuantificación de hemoglobina manual.....	19
Curva estándar de hemoglobina.....	22
Cuantificación de hematocrito manual.....	27
Cuantificación de cuenta total de leucocitos.....	30
Medidas de la cámara de Neubauer.....	30
Formula general para cuantificar células en cámara de Neubauer.....	31
Corrección de cuenta total de leucocito cuando la muestra presenta eritroblastos.....	35
Cuantificación de plaquetas manual método directo modificado.....	38
Cuantificación de plaquetas manual método indirecto.....	40
Cuantificar plaquetas por método indirecto.....	41
Cuenta de reticulocitos manual.....	43
Velocidad de sedimentación globular (VSG).....	46
Formulas para calcular manual los índices eritrocitarios.....	48
Cuenta diferencial de leucocitos.....	51
Estructuras normales de leucocitos.....	54
Estructuras normales de glóbulos rojos y plaquetas.....	55
Anomalías en glóbulos rojos en cuanto al tamaño.....	58
Anomalías en glóbulos rojos en su forma.....	60

Anomalías en glóbulos rojos en cuanto a su concentración de hemoglobina.....	70
Anomalía glóbulos rojos en cuanto a inclusiones.....	72
Anomalías en neutrófilos.....	77
Anomalías neutrófilos en su citoplasma.....	78
Células leucocitarias infectadas.....	82
Métodos de coagulación.....	83
Tiempo de protrombina(TP).....	83
Procedimiento para llevar a cabo curva de TP en el equipo STAR4.....	84
Procedimiento para tiempo de protrombina.....	85
Cociente Normalizado Internacional.....	86
TPT (tiempo parcial de promboplastina).....	87
Métodos de transfusiones.....	88
• Grupo sanguíneo.....	89
• Grupo a la inversa.....	91
• Coombs directo.....	93
• Coombs indirecto.....	95
• Pruebas cruzadas para CE.....	97
• .Alternativas de transfusion en orden de preferencia.....	97
• Pruebas cruzadas para PFC.....	102
• Transfusión de plaquetas.....	102
• Transfusión de creoprecipitados.....	103
Etapa posanalitica.....	104
Anexo 1. Validación del método modificado para cuantificación de leucocitos.....	105
Anexo 2. Validación del método modificado para cuantificación de plaquetas.....	108

Preparación de reactivos.....	110
Unidades de conversión mas utilizadas en hematología.....	112
Figuras que se muestra en el manual.....	113
Cuadros que se muestran en el manual.....	115
Lista de referencias bibliográficas.....	117

Prólogo:

La elaboración del presente manual de hematología del laboratorio clínico de la clínica MEXFAM Nezahualcóyotl tiene el propósito de cumplir con lo establecido en la NOM-166-SSA-1-1997 en su apartado 4, punto 4.5, que indica que el laboratorio clínico debe contar con un manual de todos los métodos analíticos en idioma español que deberá contener: nombre de los métodos utilizados, fundamentos, preparación, procedimientos, resultados, valores de referencias y bibliografía; y a la vez cumplir con la norma internacional ISO (Sistema de Gestión de la Calidad [SGC]) 9001-2000 que consiste fundamentalmente en demostrar la documentación e implantación de un sistema de Gestión de la Calidad que puede ser llevado a cabo en cualquier empresa de productos o servicios de la salud. La Norma Internacional ISO-9001-2000 es una norma general, aplicable a todo tipo de organizaciones y por tanto al laboratorio clínico, además de norma de calidad, su valor está en que es fundamentalmente una estupenda herramienta de organización, gestión y también es el primer paso obligado para la implantación y organización de cualquier tipo de SGC.

En el presente manual se describen los métodos a seguir para cada determinación de las pruebas que se realizan en el área de hematología para que todo el personal que trabaja en ella siga las indicaciones y establecer una unificación de métodos de trabajo para lograr un mismo criterio.

En este manual se incluyen procedimientos semi-automatizados de los equipos Sysmex (KX-21N) para biometría hemática y Star (ST-art4) para pruebas de coagulación, pero también se describen metodología manual como un método alternativo cuando el equipo no llegara a funcionar o bien se requiera verificar un resultado de modo manual.

Es de vital interés la implantación de un sistema de la gestión de la calidad en los laboratorios clínicos, para que funcionen con el mayor nivel de capacidad profesional y técnica posible, debido a que tanto el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento se basan con frecuencia en los resultados, y una mala interpretación de las pruebas de laboratorio puede causar daño irreversible a un paciente. De esta manera, con el establecimiento de una gestión de calidad, se asegurará a los pacientes, la sociedad y los gobiernos que los resultados emitidos por el laboratorio tienen la suficiente calidad para ser de utilidad clínicamente.

Introducción:

El estudio de la sangre y su análisis comprende exclusivamente al laboratorio y es una de las áreas más importante de análisis de rutina y de urgencia, que proporciona al médico información con fines diagnósticos y terapéuticos.

En este manual se describen los métodos a seguir para cada determinación de las pruebas rutinarias que realiza el laboratorio MEX-FAM en el área de hematología, se divide en tres secciones fundamentales: biometría hemática, coagulación, y pruebas cruzadas.

Con fines de control de calidad, el manual de hematología se divide en tres etapas: preanalítica, analítica y posanalítica.

La etapa preanalítica es importante, y de ella depende en gran medida el resultado final. Aquí se establecen las condiciones del paciente para una buena toma de muestra, se recaba información del paciente como datos personales y clínicos necesarios para la variabilidad fisiopatología, obtención de la muestra con la mejor calidad que preserve la integridad cualitativa y cuantitativa de las células y de la hemoglobina. Se indica la preparación de los diferentes reactivos empleados en las técnicas de hematología y la preparación del anticoagulante empleado para hematología y su uso correcto.

En la etapa analítica se describen las técnicas de laboratorio en esta área, efectuándose de forma semi-automatizada y manual, son explicadas de manera clara, precisa y sencilla para ser llevadas a cabo por el personal del área que lo consulte y lograr la correcta ejecución de las pruebas ya que en esta etapa se exigen técnicas estandarizadas, equipos adecuados bien calibrados, reactivos y consumibles de calidad garantizada. El control de estos sistemas se establece, y se describen las especificaciones y características de los instrumentos, sus normas de funcionamiento, calibración, o bien hace referencia al manual de instrucciones del fabricante. Se explica ampliamente como efectuar un frotis de manera correcta, así como también el procedimiento de tinción para poder efectuar la cuenta diferencial de leucocitos y la lectura del conteo de ellos, se ilustran los diferentes tipos de células normales encontradas en la sangre así como las anormalidades más frecuentes y una explicación de las posibles alteraciones de la anormalidad encontrada.

En la etapa posanalítica se refieren los resultados obtenidos y se especifican en el informe del laboratorio, al cual se llega partiendo de que las fases preanalítica y analítica son realizadas con el rigor técnico y científico exigido por un sistema de gestión de la calidad.

Sin embargo, aun establecidas estas tres etapas en escrito, el control de calidad es responsabilidad de la persona a cargo del área de hematología, que debe asegurarse de que las pruebas realizadas sean procesadas con calidad y de que los resultados sean confiables, reproducibles y tan exactos como sea posible, siguiendo las técnicas del presente manual. Los resultados se deben entregar sin retardo indebido al médico quien ha solicitado las pruebas, en un informe que sea legible y fácil de comprender.

La persona a cargo debe asegurarse que las pruebas se realizan tan pronto como sea posible después que los especímenes han llegado al laboratorio, con habilidad técnica y valorar el buen funcionamiento del equipo con análisis de materiales de controles apropiados y de referencia para que sea asegurada su confiabilidad de la técnica.

Objetivos

1. Presentar un manual de procedimientos del área de hematología que describa detalladamente en forma sencilla y completa las técnicas semi-automatizadas y manuales, que resuelva dudas sobre las técnicas y unifique criterios de trabajo para obtener resultados con calidad y confiables.
2. Dar cumplimiento a la NOM-166-SSA1-1997 y a la vez cumplir con la norma internacional ISO (Sistema de Gestión de la Calidad) 9001-2000.

La etapa preanalítica es una etapa clave, y de ella depende en gran medida el resultado final. Los objetivos de las normas de control de la calidad en la fase preanalítica son:

1. Recepción de solicitudes de laboratorio.
2. Indicaciones para preparación del paciente previo a la toma de muestra.
3. Adecuada toma de muestra.
4. La correcta identificación del paciente, del solicitante y de la prueba solicitada
5. Criterios para rechazo de muestras.
6. Evitar el deterioro de la muestra mediante los procesos de obtención, manipulación transporte y conservación.

En el proceso preanalítico se debe cuidar cada uno de estos objetivos, por lo que describiremos sugerencias para evitar estos errores.

1. **Recepción de solicitudes de laboratorio.** Se debe hacer la correcta identificación del paciente, ésta debe de concordar con el nombre, edad y sexo de la solicitud recibida.
2. **Indicaciones para preparación del paciente previo a la toma de muestra.**

Para asegurar una buena toma de muestra se deben estandarizar como mínimo los siguientes factores.

- ✓ Ayuno de 12 horas.
- ✓ Suprimir el ejercicio intenso 48 horas antes.
- ✓ Excluir 12 horas antes grasas, tabaco, alcohol, cafeína.

Integridad cuantitativa y cualitativa de las células y de la hemoglobina, y así obtener resultados

3. **Adecuada toma de muestra.** Ésta se debe obtener de la mejor calidad, para obtener resultados confiables del paciente. ¹

Punción de sangre venosa

Se recomienda usar tubos al vacío por sus numerosas ventajas ¹:

- No hay contacto directo con la sangre del paciente.
- Esterilidad.
- Menor riesgo de accidente.
- Llenado rápido.
- Volumen de muestra ajustado a la cantidad de anticoagulante
- Mezclado rápido con el anticoagulante evitando la coagulación o la microcoagulación.

- Procedimiento para la extracción de sangre venosa en sistema al vacío:

Constituye el tipo de extracción sanguínea más comúnmente empleado. El lugar de elección es generalmente la región venosa antecubital la cual posee piel fina, móvil y venas de un grueso calibre y relativamente superficiales. Las

venas indicadas son la cefálica, la cefálica mediana y la basílica mediana (figura 1).²

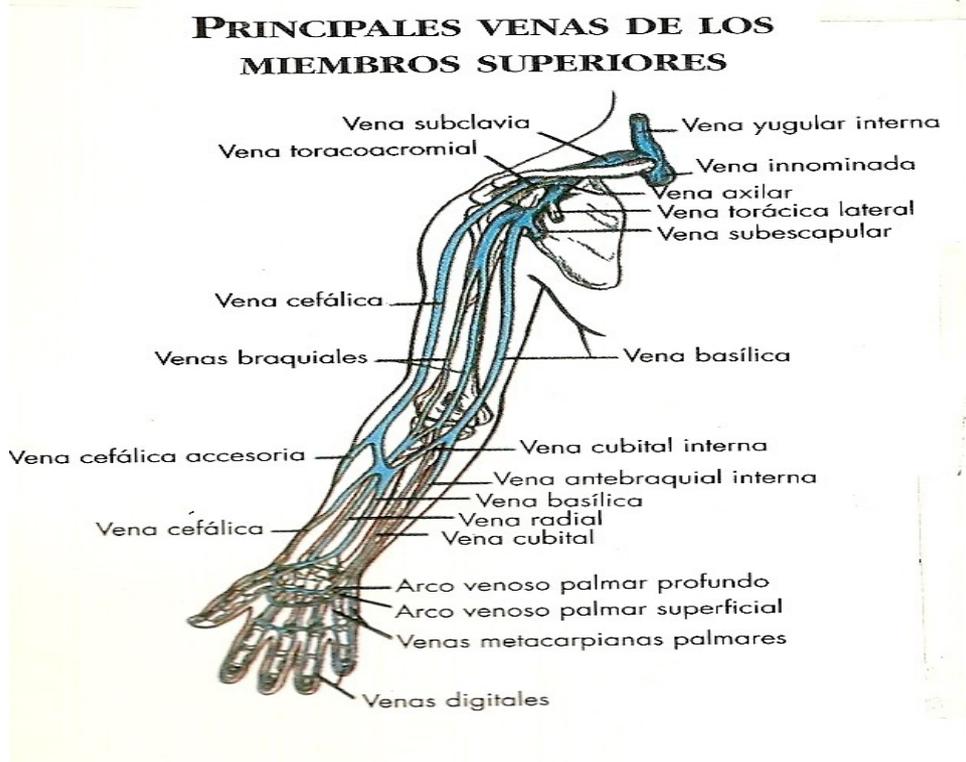


Figura 1. Esquema de las venas superiores del brazo. (Tomada Dr. A.A.Madrid, C.S.SManual de Flebotomía)

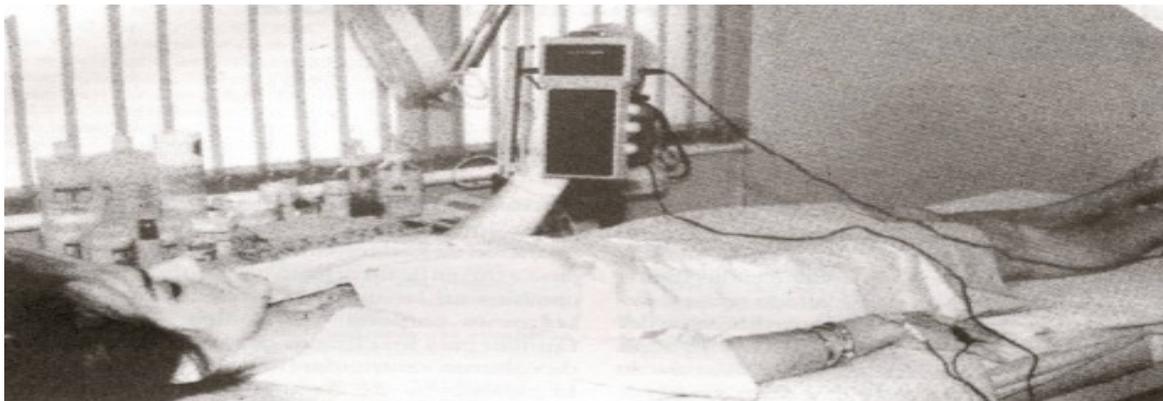


Figura 2. Paciente en postura de cubito dorsal. (Tomada de Ganong William F, Manual de Fisiología Medica, Editorial Manual Moderno, 2002.)



Figura 3. **Paciente para toma de muestra sentado.** (Tomada Dr. A.A.Madrid, C.S.S. Manual de Flebotomía)

En cuanto a la postura para la toma de muestra, la mejor para el paciente es el decúbito dorsal (figura 2) y si está sentado, el paciente su brazo debe tener un buen apoyo (figura 3).

Para llevar a cabo la extracción, deben seguirse los siguientes puntos:

1. Las venas deben inspeccionarse y evaluarse aplicando un torniquete en la parte superior del brazo, unos cuatro centímetros por encima del lugar de la punción. Este debe apretarse sólo lo necesario para impedir la circulación venosa de retorno, su utilidad es aumentar la presión venosa y hacer resaltar las venas para facilitar la punción, y se debe utilizar sólo para la punción, pero no durante la toma de la muestra. En caso que no se resalten las venas, se pide al paciente que abra y cierre el puño varias veces, lo cual distiende las venas y las resalta.
2. Realizar una buena asepsia con una torunda de algodón impregnada de alcohol al 70%, se realizando la limpieza del centro hacia la periferia, y dejar secar.
3. Con el bisel de la aguja hacia arriba y siguiendo el curso de la vena, insertar rápida y firmemente la piel y luego la vena.
4. Liberar el torniquete, abrir el puño del paciente.
5. Esperar que el tubo llene hasta agotar el vacío.
6. Retirar la aguja poco a poco.
7. Colocar el algodón humedecido en el punto de la punción una vez retirada la aguja para evitar dolor y presionar suavemente.
8. Se recomienda presionar suavemente la zona y elevar el brazo por unos dos o tres minutos.

Mezclar por inversión varias veces (mínimo 30 segundos), para obtener una muestra homogénea. Hacerlo con suavidad para evitar la formación de espuma y el daño de las células.

Descartar las agujas inmediatamente en un aparato destructor, con el fin de evitar su reuso.³

En caso de tomar más tubos el orden de llenado para un sistema al vacío es el siguiente:

- a) Tubo seco
- b) Tubo para prueba de coagulación
- c) Tubo para biometría hemática (BH).

Esto debido a que el anticoagulante presente en el tubo puede contaminar el extremo de la aguja que entra al tubo.

En caso de tomar más tubos el orden de llenado si se utiliza jeringa es el siguiente:

- a) Tubo para BH
- b) Tubo para prueba de coagulación
- c) Tubo seco

Se llena primero los tubos con anticoagulante para evitar la microcoagulación.¹

Errores en la toma de muestra a evitar:

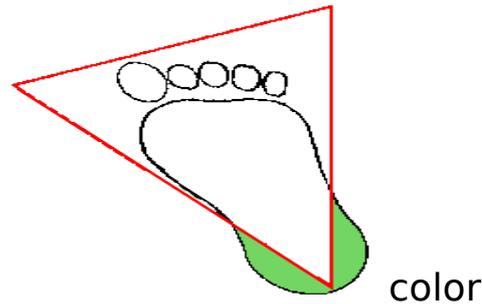
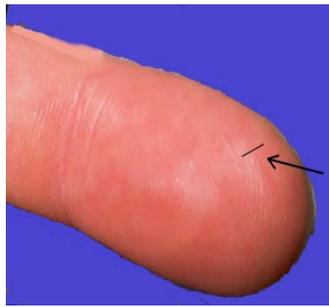
- Empleo de tubos húmedos.
- Empleo de anticoagulantes inadecuados y en una proporción errónea.
- Extracción sanguínea excesivamente lenta con coagulación parcial de la sangre en la jeringa o en el tubo recolector.

- La aplicación del torniquete no debe ser mas de 1 minuto, su uso prolongado produce hemoconcentración y aumentos espurios de macromoléculas, proteínas y péptidos, componentes celulares y enzimas.
- En el estudio de los factores de la coagulación debe evitarse el uso del torniquete.
- Evitar el abrir y cerrar el puño, sólo se realiza en casos necesario que la vena no se resalte, debido a que la contracción puede ocasionar abrir la bomba de sodio y potasio y encontrar altos estos electrolitos por la toma de la muestra.
- Agitación excesiva de la mezcla sangre-anticoagulante con formación de espuma o agitación insuficiente con la aparición de microcoágulos²

Punción de sangre capilar

Se recomienda esta punción en cantidades pequeñas de sangre o cuando no pueda efectuarse la venopunción como en el caso quemaduras extensas, obesidad intensa, recién nacidos, entre otros.³

En la figura 4 se muestra las zonas de punción más frecuentes



verde los
sitios de punción recomendados

figura 4. Zonas de punción capilar más frecuentes. (Tomada Dr.A.A.Madrid, C.S.SManual de Flebotomía)

- Procedimiento para la extracción de sangre capilar :

1. Ejercer una ligera presión longitudinal o unos ligeros golpes en la zona elegida (el dedo, el lóbulo de la oreja o, en niños, la superficie plantar del talón) para conseguir un mayor flujo de sangre.
2. Realizar una buena asepsia con una torunda de algodón impregnada de alcohol, se realizando la limpieza del centro hacia la periferia, dejar secar.
3. Efectuar la punción con una lanceta estéril penetrando a una profundidad suficiente, introduciéndola más o menos de tres mm de profundidad, para asegurar el flujo espontáneo de sangre.
4. Descartar las dos primeras gotas (por contener líquido hístico) mediante el uso de un algodón seco.
5. Realizar el llenado de las pipetas requeridas o tubos capilares.
6. Presionar luego por unos minutos el lugar de la punción con algodón impregnada de alcohol. ²

Errores en la toma de muestra a evitar :

- Empleo de tubos húmedos
- Debe evitarse una presión indebida que provoque la dilución de la sangre por los líquidos tisulares, mientras se recoge la muestra.
- Si se requiere pinchar el talón, se debe calentar primero con compresas calientes, de no hacerlo tal vez se obtengan valores considerablemente más altos que con sangre venosa, sobretodo en los recién nacido.

4. La correcta identificación del paciente, con la solicitud y las muestras recibidas en el laboratorio. Una tecnología de laboratorio altamente controlada y sofisticada no es efectiva si ocurren errores en la identificación

de las muestras. Se debe revisar que las muestras correspondan al nombre de la solicitud, así como el folio que le corresponde.³



Figura 5. Etiquetado de muestras. (Tomada Dr. A.A.Madrid, C.S.SManual de Flebotomía)

Criterios para rechazo de muestras:

- Muestra que no correspondan al nombre de la solicitud, o al folio asignado a la misma.
- Muestra coagulada. Se cuantifica células totales presente en la sangre y la presencia de algún coagulo altera sus valores, siendo menores por que se concentran en el coagulo,
- Muestra que presente hemólisis.
- Muestra no proporcional al anticoagulante indicado.¹

5. Evitar el deterioro de la muestra mediante los procesos de obtención, manipulación transporte y conservación. Realizar una buena obtención y manipulación de muestra siguiendo las indicaciones mencionadas en el número 3 para evitar deterioro de las células hemáticas. Si se tuvieran que trasportar a otro laboratorio, hacerlo lo antes posible, trasladándolas en un termo o refrigerante que mantenga una temperatura de 1 a 6 °C, sin movimientos bruscos y en un tiempo no mayor a 60 minutos para su análisis. Las muestras se deben de procesar después de la obtención de la muestra en un tiempo no mayor a dos horas, de no procesar en este tiempo, conservar de 1 a 6 °C por 24 horas tiempo en que se mantienen estables.⁴

La etapa preanalítica es de vital importancia, y de ella depende en gran medida el resultado final. Por lo tanto, se debe cuidar cumplir con los objetivos de las normas de control de la calidad en esta fase debido a que se ha demostrado que alrededor del 8% de errores en el nombre del paciente, edad, sexo y número de identificación, no se detecta aún con chequeos manuales extensivos. Como medidas generales para evitar errores en la etapa de identificación del paciente, se utilizan las hojas de petición, en las que la identificación del paciente se realiza mediante código de barras, lo cual elimina el error humano de la actividad extraanalítica.²

FASE ANALITICA

Una vez aceptada la muestra que cumple con los objetivos señalados en la etapa analítica se procede a su análisis.

Método automatizado

El equipo empleado en el área de hematología es el analizador semi-automático KX-21N (Sysmex)



Figura 6. Equipo Sysmex KX-21N. Tomada del manual de fabricante. Por parte del fabricante, un manual de instrucciones para su manejo que se divide en los siguientes apartados:

1. Introducción.
2. Instrucciones de seguridad
3. Composición y función
4. Reactivos
5. Primera puesta en servicio
6. Paso de muestras
7. Visualización y salida de los resultados de análisis.
8. Control de calidad
9. Calibración
10. Configuración
11. Limpieza y mantenimiento.
12. ¿Qué hacer cuando...? (Fallos generales, errores de aparato, mensajes de error,)
13. Información técnica.

Debido a que se cuenta con este manual sólo describiré la información más sobresaliente para el análisis de muestras problemáticas.

Este equipo para sus análisis utiliza dos reactivos que son:

- Stromatolyser WH. Se utiliza para el recuento de glóbulos blancos y la concentración de hemoglobina. Realiza la lisis de los eritrocitos, posibilitando así el recuento y el análisis de la proporción de leucocitos y el análisis de la proporción de leucocitos mediante el método de impedancia. Durante la lisis se libera hemoglobina y se convierte en

metahemoglobina roja, que se mide se forma fotométrica para determinara la concentración de hemoglobina.

- Cellpack líquido diluyente es un buen conductor eléctrico, es un diluyente utilizable para el análisis de sangre mediante impedancia y procedimientos ópticos.⁵

Para su limpieza utiliza un detergente, el Cellclean. Detergente muy alcalino para eliminar reactivos de lisis, residuos celulares y proteínas sanguíneas de los conductos. De las cámaras de transductor de la válvula de dosificación de las muestras, de los conductos de aspiración de muestras y de la célula de flujo de hemoglobina (Hb).

Cuando algunos de los dos reactivos se terminen en su jornada de trabajo, hay que cambiar el reactivo, pasar un blanco de reactivo, el control de calidad, y si los valores son correctos, se analizan nuevamente muestras de pacientes.

Funcionamiento del equipo:

1. Conectar. Después de la conexión el aparato realiza un autoanálisis. Durante este proceso se verifican los contadores internos. En caso de detectar la necesidad de trabajos de mantenimiento suena una señal acústica y en la pantalla se visualiza el mensaje correspondiente.
2. Control de valor de ensayo. Después del autoanálisis, se realiza un lavado de las tuberías y de las cámaras de transductor y un control de valor de ensayo para detectar posibles impurezas.
3. Aspiración de la muestra. La muestra se encuentra en un tubo de ensayo. Éste se sostiene debajo de la aguja de aspiración. Mediante el accionamiento de la tecla de inicio se aspira la muestra y se inicia el procedimiento de análisis.
4. Análisis. En la válvula de dosificación de muestra se mide una cantidad exacta de la misma y se introduce junto con una cantidad definida del líquido de dilución en la cámara de transductor. Para seguir con el proceso de dilución, se añade lisante para WCB/HGB (leucocitos/hemoglobina) a la cámara de transductor de leucocitos (WBC). La muestra permanece durante 10 segundos en la cámara transductora de WBC. Durante este tiempo de incubación, los eritrocitos se disuelven debido a la influencia de la lisis, se deriva la hemoglobina y se convierte en metahemoglobina. Los leucocitos se mantienen inalterados. En la cámara de transductor WBC se determinan, mediante el método de medición de resistencia, el tamaño y el número de leucocitos. Una parte de la muestra de la cámara de transductor WBC entra en la célula de flujo. Allí se mide de forma fotométrica la concentración de hemoglobina.
En la cámara de transductor de eritrocitos (RBC) se determinan, mediante el método de medición de resistencia, el tamaño y el número de eritrocitos y trombocitos.
5. Cálculos de los parámetros. A partir de los valores medidos, los demás parámetros se calculan en el microprocesador.
6. Visualización. Al terminar el análisis, los datos se guardan y se visualizan en la pantalla. En caso necesario, es posible desplazar los discriminadores de forma manual y de calcularlos de nuevo.

7. Salida. Los resultados de análisis pueden imprimirse en la impresora térmica integrada o en impresoras opcionales, o transmitirse al sistema informático del laboratorio.

- **Preparación de la próxima medición.** Se lava el sistema de paso de muestras. El número de muestras aumenta automáticamente de uno en uno. Entonces el aparato está listo para el próximo análisis.

- **Paso de controles antes de la puesta en servicio**

Antes de empezar el trabajo (antes de analizar muestras) realizar siempre un control de calidad, de acuerdo al siguiente procedimiento:

Los materiales de control se deben de atemperar dejar a temperatura ambiente 15-20 minutos y mezclar por rotación del mismo frasco.

1. Abrir el menú mediante la tecla *Select*.
2. Seleccionar 2:QC.
3. Seleccionar el material de control en la lista o introducir el número de archivo. Confirmar mediante *Enter*.
4. Seleccionar 1: análisis de QC. Se visualizará la pantalla de análisis para el método de control seleccionado.
5. Asegurarse que se visualice *Ready* (listo).
6. Mezclar la sangre control.
7. Sostener el tubo por debajo de la aguja de aspiración de modo que quede sumergida.
8. Pulsar la tecla Inicio. Se aspira la muestra, en la pantalla aparecerá "Aspiración".
9. Cuando suenen dos breves señales acústicas, desplace el flacon? hacia abajo y retire el control.
10. Empieza el análisis en la pantalla se visualizará "Análisis"

Una vez concluido el análisis, se realiza el lavado del sistema de tubos, en la pantalla se visualizará "Lavado".

Al terminar el análisis, los resultados se visualizarán en la pantalla. Mediante las teclas de flechas podrá saltar la página. Los valores de análisis se comparan con el rango deseado. Si los resultados son correctos dentro de los valores esperados y se encuentran dentro de 2 desviaciones estándar, se aceptan; estos valores son graficados por el equipo de acuerdo a los criterios Levey-Jennings.⁵

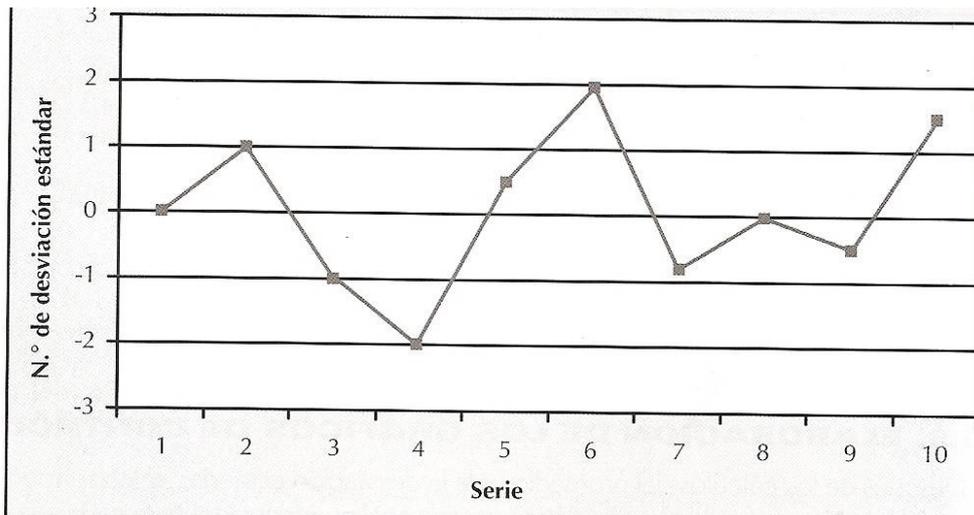


Figura 7. Gráfico de Levey-Jennings Normal. (Tomada de Fernández C, Mazziotta D. Gestión de la Calidad en el laboratorio clínico. 2005)

Gráfica de Levey-Jennings normal. Muestra una gráfica del procedimiento analítico de buena precisión y error sistemático nulo o despreciable, se espera que los valores obtenidos en el material de control se encuentren entre los límites de ± 2 desviaciones estándar (S), distribuyéndose en forma normal.

El equipo KX-21N (Sysmex) cuenta con un programa informático, realiza la elaboración de las gráficas de Levey-Jennings y aplica las reglas de Westgard, lo que posibilita la toma de decisiones del control, aceptable o no.

Las reglas de Westgard indican la existencia de un error aleatorio o sistemático en el sistema analítico utilizado. Estos errores ocurren teniendo en cuenta que estadísticamente, cerca del 5% de los estudios pueden estar fuera de la zona de ± 2 S pero dentro del ± 3 S.⁵

- Reglas de Westgard:

REGLA 1_{2S} . La regla dice que una observación del control excedió los límites de ± 2 S. Como esta posibilidad es del 5%, la señal se considera una alarma y se puede seguir el análisis para verificar si ésta se debe a la aparición de errores excesivos o ha ocurrido por causas puramente estadísticas.

REGLA 1_{3S} . Si el valor de la muestra control además de violar la regla 1_{2S} sobrepasa los $3S$, se considera que ha habido un error tal que no se pueden informar los resultados de los pacientes. El fundamento de esta decisión es que dentro de los límites de ± 3 S están contenidos el 99.7% de los valores posibles y pese a que existe una baja probabilidad estadística de que un valor caiga fuera de los 3 S, desde el punto de vista laboratorio se considera dicha posibilidad como nula. Por tanto el hecho de tener un valor fuera de ± 3 S, es causa de rechazo.

REGLA R_{4S} . Esta regla dice que cuando la diferencia entre los valores de los dos controles diarios exceden el valor máximo de $4S$, entonces se está en presencia de un aumento de error aleatorio y la serie analítica debe ser rechazada. Es necesario buscar entre las causas de imprecisión pertinentes, de acuerdo al sistema analítico utilizado en el laboratorio.

REGLA R_{41S} . Cuando cuatro determinaciones sucesivas del control exceden el mismo nivel de $1S$, pero siempre dentro de la región aceptable de ± 2 S, se está en presencia de error sistemático. Dependiendo del criterio del operador

esta regla puede conducir a rechazo de la serie, o aceptarla ya que todos los puntos se encuentran en la región aceptable.

REGLA 10X. Esta regla se viola cuando 10 o más determinaciones de un mismo nivel de control se ubican en un mismo lado del promedio. Esto indica que el promedio real de estas determinaciones es distinto del promedio establecido en el momento de elaborar las cartas control. Aquí se deben evaluar las causas de error sistemático. No obstante, como los diez valores observados están dentro de la zona de aceptabilidad, se debe aplicar el mismo que para la regla R_{41s} .

Interpretación. Conociendo las reglas, la interpretación se lleva a cabo de acuerdo al cuadro 1. ¹

Cuadro 1. Interpretación de las reglas Westgard.

Tipo de error	Violación de la regla
Aleatorio	1_{3s} , R_{4s}
Sistemático	1_{3s} , 2_{2s} , 4_{1s} , $10 X$

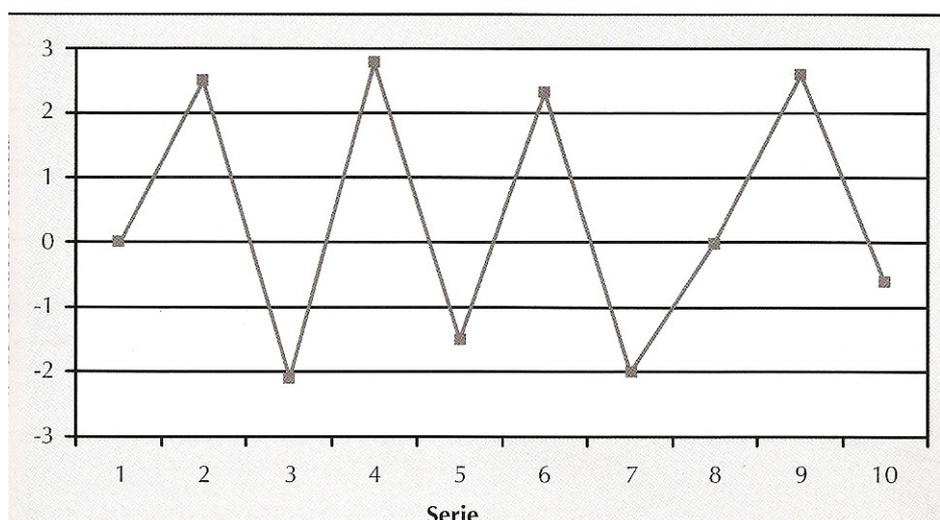


Figura 8. Gráfica de Levey-Jennings. Aumento de precisión. Tomada de Fernández C, Mazziotta D. Gestión de la Calidad en el laboratorio clínico. 2005

Si el equipo identifica como fuera de control el procedimiento anterior, se debe evaluar esta situación y realizar las medidas necesarias para identificar el problema. Mientras tanto, los resultados de las muestras de los pacientes no deben ser validadas hasta que dicha no conformidad sea corregida aplicando las acciones correctivas adecuadas. Si los resultados son aceptables, se procede a aceptar oprimiendo tecla "OK". Estos resultados se guardan en un fólder para control de calidad del equipo. En caso contrario rechazar y cancelar.

Si el control de calidad es aceptado, el equipo está listo para procesarse las muestras de los pacientes, de no ser así deben realizar las acciones necesarias de mantenimiento que el equipo requiere (un lavado general,

limpieza de la cámara de reacción, limpieza del traductor, lavar la válvula SRV, limpieza de aperturas) y se vuelven a pasar los controles.⁵

- Procedimiento para el análisis de muestras problema en el analizador KX-21N:

1. Colocar las muestras en el mezclador por lo mínimo 5 minutos para obtener un mezclado uniforme.
2. Anotar el número de folio de la muestra.
3. Teniendo la muestra bien mezclada, retirar el tapón e introducir el tubo capilar de aspiración aproximadamente hasta la mitad del contenido de la muestra.
4. Presionar la palanca de *Start* y el equipo aspirará 0.2 mL de sangre total.
5. Retirar el tubo y en la pantalla aparecen las acciones: aspirando, analizando, lavando, finalmente listo. Posteriormente, se muestran los resultados en la pantalla del equipo:
 - WBC Recuento total de leucocitos.
 - RBC Recuento total de eritrocitos.
 - HGB Concentración de hemoglobina.
 - Hto hematocrito.
 - MCV Volumen corpuscular medio.
 - MCH Hemoglobina corpuscular media.
 - MCHC Concentración media de hemoglobina corpuscular.
 - PLT Recuento de total de plaquetas.
 - LYM% Porcentaje de linfocitos.
 - LYM* Recuento de absoluto de linfocitos.
 - NEUT% Porcentaje de neutrófilos.
 - NEUT* Recuento absoluto de neutrófilos.
 - MXD % Porcentaje de eosinófilos, monocitos, basófilos, bandas.⁵

- Límites del método:

Leucocitos. El conteo puede resultar erróneamente incrementado, en caso de presencia de:

- Eritrocitos resistentes a lisis.
- Aglutininas frías.
- Agregados plaquetarios.
- Eritrocitos con núcleo.
- Crioglobulinas.

Eritrocitos. El recuento puede resultar erróneamente reducido, en caso de presencia de:

- Aglutininas frías.
- Microcitos.
- Eritrocitos fragmentados.

Se pueden incrementar. En el caso de presencia de más de 100,000 por microlitro.

Hemoglobina. La determinación de hemoglobina puede resultar erróneamente incrementada, en casos de presencia de:

- Leucocitosis más de 100,000/ μ L
- Lipemias.
- Proteínas anormales.

Hematocrito. La determinación de hematocrito puede ser erróneamente reducida en casos de presencia de:

- Aglutininas frías.
- Eritrocitos fragmentados.
- Esferocitosis.

Se puede incrementar con la presencia de leucocitosis mas de 100,000/ μ L.

Plaquetas. El recuento de plaquetas puede resultar erróneamente reducida en caso de presencia de:

- Agregados plaquetarios.
- Megaloblastos.

Se puede incrementar con macrocitosis.⁵

Cuando el equipo detecta alguna de estas limitaciones, envía alguna alarma y se debe seguir las siguientes acciones según la alarma indicada :

1. WL: Lisis Incompleta de los eritrocitos, sospecha de la presencia de hematíes nucleados (eritroblastos), aumento de plaquetas grandes, aglutinación plaquetaria y presencia de fibrina. Hacer revisión por métodos manuales.
2. RL: Presencia de hematíes fragmentados, incremento de plaquetas grandes y aglutinación de plaquetaria. Revisión por métodos manuales.
3. PL: Crioglobulinas, hematíes fragmentados e influencia de citoplasma fragmentados de células leucémicas. Reanalizar la muestra después de incubar a 37 °C (crioglobulinas), o bien revisión por métodos manuales.
4. WU: Lisis incompleta de los eritrocitos, sospecha de leucocitos inmaduros, aglutinación de leucocitos. Revisión por métodos manuales.
5. RU: Presencia de aglutininas frías o interferencia por leucocitos altamente incrementados. Reanalizar la muestra después de incubar a 37 °C (crioglobulinas), o bien revisión por métodos manuales.
6. PU: Incremento de plaquetas grandes, interferencia de hematíes fragmentados y precipitado de crioglobulinas. Reanalizar la muestra después de incubar a 37 °C (crioglobulinas), o bien revisión por métodos manuales.
7. DW (RBC): Se evidencia una variación del tamaño de los eritrocitos. Reanalizar por métodos manuales.
8. DW (PLT): Interferencia de fragmentos de eritrocitos, variación en el tamaño de plaquetas, crioglobulinas, etc. Reanalizar la muestra después de incubar a 37 °C (crioglobulinas), o bien revisión por métodos manuales.
9. MP (RBC): Se da como resultado de las anemias y por transfusiones sanguíneas, etc.; aparecen varios tamaños de grupos celulares eritrocitos. Revisión por métodos manuales.

- 10.MP (PLT): Aparición de alguna patología como trombosis; muestras viejas o sin lisar. Revisión por métodos manuales.
- 11.T!: Lisis incompleta de los eritrocitos y muestra vieja. Solicitar nueva muestra.
- 12.T2: Lisis incompleta de los eritrocitos y muestra vieja. Solicitar nueva muestra.
- F1, F2, F3: Sugestivo monocitosis, eosinofilia, basofilia, lisis de los eritrocitos incompleta y muestra vieja. Solicitar nueva muestra.⁵

- Procedimientos a seguir para cuentas muy altas o baja de leucocitos con el equipo:

Cuando uno de los parámetros reportados por el equipo KX-21N se encuentra fuera de valores de referencia realizar las siguientes acciones:

- Una cuenta total de leucocitos que el equipo no pueda contar y marque ****, hay que realizar una dilución de la muestra con solución salina fisiológica y volver a pasar por el equipo. El resultado obtenido se multiplica por el número de dilución realizada, si existe alguna duda en cuanto al resultado verificar manualmente, este criterio se sigue para cada una de las pruebas cuyo resultado sea elevado.
- En las cuentas muy bajas se debe confirmar manualmente por los métodos ya descritos anteriormente.

Cuando el equipo presenta alguna de las alarmas ya mencionadas realizar las sugerencias indicadas, proceder al reanálisis de la muestra, si el problema de la alarma sigue, proceder a procesar por método manual para confirmar o descartar la alarma indicada.

Valores de referencia programados en el equipo:

- WBC Recuento total de leucocitos 4500-10,000 μ L
- RBC Recuento total de eritrocitos: 4.0-6.2 $\times 10^6 / \mu$ L
- HGB Concentración de hemoglobina: 12-18 g/dL
- Hto hematocrito: 36-52%
- MCV Volumen corpuscular medio : 80-90 fL
- MCH Hemoglobina Corpuscular Medio: 27-32 pg
- MCHC Concentración de hemoglobina Corpuscular: 32-36 g/dL
- PLT Recuento de total de plaquetas: 15000-45000 μ L
- LYM% Porcentaje de linfocitos: 30-40 %
- LYM* Recuento de absoluto de linfocitos : 1350-1800 μ L

- NEUT% Porcentaje de neutrófilos: 60-70 %
- NEUT* Recuento absoluto de neutrófilos: 2700-3150 μ L
- MXD % Porcentaje de eosinófilos, monocitos, basofilos, bandas : 4-8.0 %

Cuando uno de los resultados obtenidos de los pacientes son mayor o menor a los programados, el equipo indica en el resultado emitido una cruz (+) cuando es mayor al valor y un menos (-) si es menor.⁵

Métodos manuales

Cuantificación de hemoglobina

Si el problema de determinación en el equipo KX-21N es la hemoglobina, cuantificar manual por método de la cianometahemoglobina.

El método de la cianometahemoglobina fue recomendado por el Comité Internacional para la Estandarización de Hematología (ICSH) en 1966, modificado en 1977 y sigue siendo hasta hoy el más recomendado.²

Este procedimiento tiene muchas ventajas, tales como la disponibilidad de estándares satisfactorios y la capacidad de cuantificar todas las formas de Hb de importancia clínica oxihemoglobina (HbO₂), desoxihemoglobina, metahemoglobina (Hi), hemoglobina(Hb), carboxihemoglobina (HbCO). Pero no mide la sulfohemoglobina (SHb).² Es el método de elección para efectuar estudios científicos sobre anemia y para determinar su prevalencia en encuestas de salud pública.⁶

- **Fundamento.** En el sistema de reacción se incluye ferrocianuro y cianuro de potasio en una solución o detergente para hemólisis del eritrocito. La hemoglobina reacciona con el ferrocianuro que hace pasar el hierro de la hemoglobina del estado ferroso (Fe⁺⁺) al férrico (Fe⁺⁺⁺) y forma metahemoglobina que con el cianuro de potasio, se transforma para forma finalmente en la cianometahemoglobina que se cuantifica colorimétricamente.²

- **Material.** Pipeta de Salhi, tubos de 13X1000 mm, celdillas para espectrofotómetro.

- **Aparatos.** Espectrofotómetro.

Las medidas espectrofotométricas se basan en la ley de Beer, en donde la concentración de una sustancia es inversamente proporcional al logaritmo de la luz transmitida o directamente proporcional a la cantidad de luz absorbida, y su expresión matemática es la siguiente:⁸

$$A = abc = 2 - \log \%T$$

En donde:

A = absorción.

a = absortividad o coeficiente de extinción molar.

b = longitud del paso de luz en centímetros.

c = concentración.

T= porcentaje de transmitancia.

Usando esta fórmula se calcula la concentración de una sustancia despejando c:

$$c = \frac{A}{ab}$$

La medida de la concentración se puede obtener con buena exactitud y precisión, teniendo las medidas exactas de A, a y b, por lo que los factores que pueden influir en la calidad son la absorción, la absorptividad y longitud del paso de luz.

La absorptividad (a), es la única propiedad particular de una sustancia química o cromóforo y depende de la longitud de onda. El valor real de la absorptividad varía con el incremento o disminución en la longitud de onda, por tanto una absorptividad específica puede garantizarse sólo si se mantiene la exactitud en la longitud de onda en la que se efectúan las medidas de absorbancia.⁸

Longitud del paso de luz en centímetros (b). La luz monocromática usada por los espectrofotómetros en el análisis, no es realmente una luz monocromática, sino una mezcla de varias longitudes de onda con una cantidad máxima de luz de onda dada. El ancho de banda es espectral e indica aproximadamente las cantidades variables de luz de otras ondas que pasan a través de la cubeta que contiene la muestra. (Figura 9)

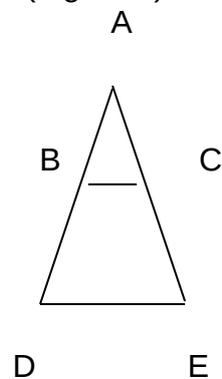


Figura 9. Se ilustra amplitud de la longitud de onda. (Tomada de Muralli D. Control de calidad en los laboratorios clínicos. 2002)

A es la longitud de onda que se fija en el espectrofotómetro, la intensidad de luz es máxima en este punto, si fuera luz monocromática pura se obtendría una línea vertical en el punto A. D hasta E pasan a través de la cubeta de muestra luces de distintas longitudes en cantidades variables. BC Se forma una distribución de la intensidad de luz de varias longitudes de onda, el ancho de banda correspondiente a la anchura del triángulo en su altura media y se indica con letra BC.

Cuando más pequeño es el ancho de banda espectral, mayor es la absorptividad y mejor es el análisis; si el ancho espectral es demasiado estrecho, la luz que

entra en la cubeta resulta muy débil y da lugar a un ruido de fondo que es indeseable.

Se pueden solucionar estos problemas causados por la luz monocromática impura midiendo la absorción de una curva de calibración para hemoglobina.⁶

- Control de calidad para el espectrofotómetro.

Calibración de la longitud de onda. Se calibra usando un filtro de didimio, en un espectrofotómetro con un ancho de banda espectral de 20 nm. Este filtro tiene la absorción máxima (o en el más bajo porcentaje, más alto de transmitancia) que se obtiene a longitudes de onda más altas y más bajas.

Calibración de la absorción. Se calibra con una solución de sulfato de cobre que contiene 20 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) + 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, diluido en 1000 mL agua destilada. Esta solución da las siguientes absorciones a estas longitudes de onda específicas:

400 nm= 0.002

600 nm= 0.068

650 nm= 0.224

700 nm= 0.527

Cuando la absorción no corresponde a la indicada, el equipo se debe reparar.

La absorción debe comprobarse cada mes, la longitud de onda debe calibrarse antes que la absorción.

- **Precisión en las medidas espectrofotométricas.** No se pueden hacer medidas analíticas precisas a niveles muy altos o muy bajos. El intervalo óptimo para medidas precisas en espectrofotometría son del 20 al 50% T o 0.03 a 0.7 de A. ^{6,8}

Reactivo. Solución valorada para cianometahemoglobina (reactivo de Drabkin). Solución de cianometa (polvo para preparar un litro). Se conserva un mes en frasco de vidrio oscuro, desechar si se encuentra turbia. No enfriarse demasiado puede causar una decoloración con reducción ferrocianuro.²

Muestra Biológica. Sangre total con anticoagulante EDTA.

Procedimiento:

1. En un tubo de ensayo de 13X100 mm colocar 5 mL de reactivo de Drabkin.
2. Agregar con pipeta de Salhi 0.020 mL de sangre perfectamente homogenizada, eliminar el exceso de sangre que queda en las paredes externas de la pipeta antes de introducirla en la solución de Drabkin. Llevar la pipeta hasta el fondo del tubo y depositar la sangre, procurando lavar las paredes internas de la pipeta; esto se logra mediante aspiraciones y expulsiones consecutivas de reactivo dentro del tubo.

- Evitar a formación de burbujas. Tapar el tubo y mezclar varias veces por inversión.
3. Dejar reposar por 10 minutos para que se produzca la hemólisis total de las células rojas y se complete la reacción.
 4. Leer en espectrofotómetro a 540 nm contra blanco de cianometa.
 5. Convertir la absorción en gramo de hemoglobina por 100 mL de sangre utilizando la curva estándar o el factor de la misma vigente.²

Control de calidad Para todas las muestras problemas, se procesan por duplicado.⁶

Procedimiento para curva estándar de hemoglobina:

Si se utilizara un estándar de concentración 0.08 g/dL, se agregan los volúmenes con líquido de Drabkin de acuerdo al cuadro 2.

Cuadro 2. Volúmenes para curva estándar de hemoglobina.

Tubo	Estándar (mL)	Drabkin (mL)	Volumen total
1	1	4	5
2	2	3	5
3	3	2	5
4	4	1	5
5	5	0	5

Mezclar y dejar reposar 10 minuto y leer a espectrofotómetro a 540 nm, ajustar el blanco con reactivo de Drabkin.

Fórmula general para cuantificar la concentración de hemoglobina del estándar:

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

Calcular las concentraciones de hemoglobina con la fórmula arriba mencionada para cada tubo, ejemplo:

Tubo 1) $Hb = \frac{1 \text{ mL} \times 0.080 \text{ g/dL}}{5 \text{ mL}} \times 251 = 4.02 \text{ g/dL}$

$$\text{Tubo 2) } Hb = \frac{2 \text{ mL} \times 0.080 \text{ g/dL}}{5 \text{ mL}} \times 251 = 8.03 \text{ g/dL}$$

$$\text{Tubo 3) } Hb = \frac{3 \text{ mL} \times 0.080 \text{ g/dL}}{5 \text{ mL}} \times 251 = 12.05 \text{ g/dL}$$

$$\text{Tubo 4) } Hb = \frac{4 \text{ mL} \times 0.080 \text{ g/dL}}{5 \text{ mL}} \times 251 = 16.06 \text{ g/dL}$$

$$\text{Tubo 5) } Hb = \frac{5 \text{ mL} \times 0.080 \text{ g/dL}}{5 \text{ mL}} \times 251 = 20.08 \text{ g/dL}$$

Cuadro 3. Concentración y lectura de absorción de la curva estándar de hemoglobina.

Concentración de Hb (g/dL)	Absorción
4.02	0.105
8.03	0.22
12.05	0.34
16.06	0.45
20.08	0.58

Con estos datos se construye una gráfica colocando los valores de la absorción en eje de las Y la concentración en el eje de las X. (Figura 10)

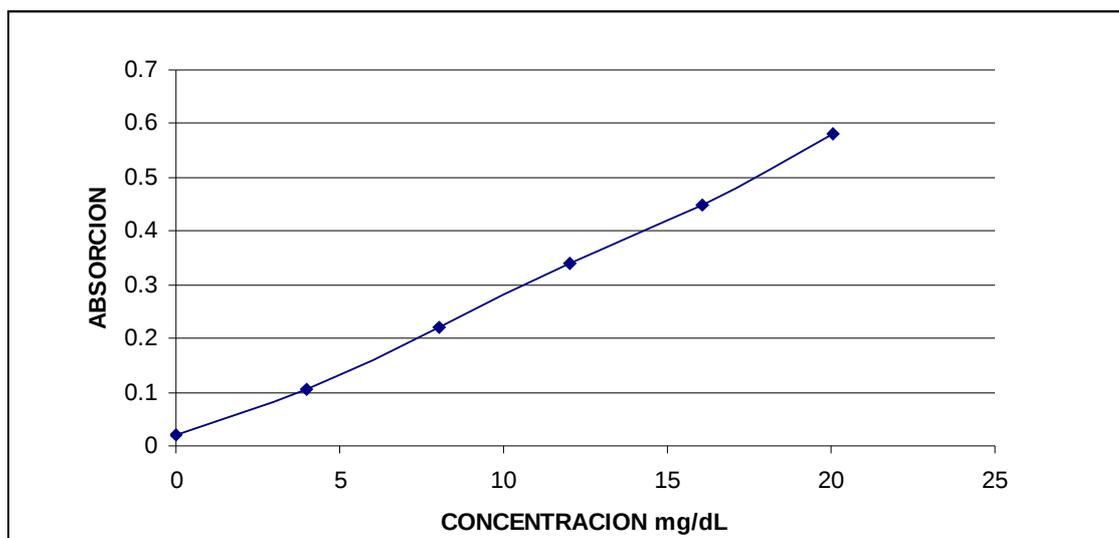


Figura 10. Curva estándar de hemoglobina.

Para obtener la concentración de una muestra, interpolar el resultado del problema y calcular su concentración.³

También se puede obtener un factor de conversión para esta curva como sigue:

Sumar las concentraciones de Hb en g/ dL:

$$4.02 + 8.03 + 12.05 + 16.06 + 20.08 = 60.24$$

Sumar las absorciones de las lecturas de la curva

$$0.105 + 0.22 + 0.34 + 0.45 + 0.58 = 1.695$$

$$F = \frac{\text{suma de las concentraciones}}{\text{suma de las absorciones}}$$

$$F = \frac{60.24}{1.695} = 35.53$$

Con este factor, la absorción de una muestra problema se multiplica por el factor y se obtiene la concentración de Hb en g/dL

Ejemplo: muestra problema con absorción de 0.39

$$\text{Hb} = 0.39 \times 35.53 = 13.86 \text{ g/dL}$$

Nota: cada vez que se prepare líquido de Drabkin se debe realizar curva estándar.

Causas de error (3)

- Errores en la obtención de la sangre. El éxtasis prolongado causado por usar más de un minuto el torniquete en el brazo del paciente, origina resultados falsamente elevados de hemoglobina en las muestras de sangre venosa. En sangre capilar ocurre lo contrario cuando se ejerce una presión excesiva en el sitio de punción y aumenta el flujo de los líquidos tisulares diluyendo la muestra de sangre.
- Que muestra no se mezcle bien. Para evitarlo, invertir el tubo varias veces o, de preferencia, usar un mezclador mecánico.
- Errores de pipeteo o de dilución.
- Muestra de sangre con coágulo.
- Sangre lipemica.
- Recuento de leucocitos muy elevado ($50.0 \times 10^9/\text{L}$).
- Instrumento incorrectamente calibrado. ⁶

Precauciones importantes antes de la lectura fotométrica de la Hb.

Antes de efectuar la lectura de la muestra desconocida, se debe cerciorar que la solución no presente ninguna turbidez, de lo contrario el resultado encontrado puede ser erróneo. Algunas causas de opacidad pueden ser:

- Un número de leucocitos excepcionalmente elevado (en tal caso se debe centrifugar la mezcla y utilizar solo el sobrenadante).
- Presencia de hemoglobina S y C (diluir la muestra 1:1 con agua destilada, y se multiplica por 2 el resultado de la lectura del colorímetro).
- Globulinas anormales (añadir 0.1 g de carbonato de potasio al reactivo de Drabkin).
- Sangre lipemica (mezclar al tubo con reactivo de Drabkin 0.02 mL del plasma lipémico y usarlo como blanco).
- La determinación de la hemoglobina no se ve afectada por la concentración del anticoagulante usado.^{2,3,6}

Valores de referencia

Los valores de referencia varían con la edad, el sexo y la altura sobre el nivel del mar. Para la ciudad de México, los valores considerados son:

Varones adultos: 13.5 - 18 g/dL

Mujeres adultas: 12.5 - 16 g/dL

Lactantes - niños: 11 - 16 g/dL

Recién nacidos: 14 - 24 g/dL

Lactantes. 11- 16 g/dL

Embarazadas: mayor de 11

Ancianos: Los valores disminuyen ligeramente.²

Alteraciones fisiológicas :

La hemoglobina suele disminuir ligeramente durante el embarazo, debido a la expansión del volumen sanguíneo.

La residencia a gran altura eleva los valores de hemoglobina.

Entre los fármacos capaces de aumentar los niveles de incluyen gentamicina y metildopa (aldomet).

Los fármacos capaces de disminuir los niveles son antibióticos, agentes antineoplásicos, aspirina, indometacina (indocin), rifampina y sulfamidas⁹

Resultados anormales :

Valores aumentados

- Enfermedad cardíaca congénita.
- Policitemia vera.
- Hemoconcentración.
- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).
- Insuficiencia cardíaca congestiva.
- Altura.
- Quemaduras severas.
- Deshidratación.

Valores disminuidos

- Anemia en todos sus tipos.
- Hemorragia severa.
- Hemólisis.
- Enfermedad de Hodgkin.

- Hemoglobinopatía.
- Cáncer.
- Deficiencia nutricional.
- Linfoma.
- Lupus eritematoso sistémico.
- Enfermedades renales.
- Hemorragia crónica.
- Esplenomegalia.⁹

Cuantificación de hematocrito

Si el problema de determinación en el equipo KX-21N es el hematocrito, se puede cuantificar manual de por el siguiente método.

Su determinación es sencilla, exacta y es importante para determinar los índices eritrocitarios. El hematocrito, en porcentaje, suele ser aproximadamente tres veces mayor que la concentración de hemoglobina en gramos por decilitro, siempre que los hematíes tengan un tamaño normal y contengan cantidades normales de hemoglobina.⁶

Es posible encontrar una cifra baja de eritrocitos, por ejemplo en las anemias macrocíticas donde una cifra baja eritrocitos por mm^3 puede corresponder a un hematocrito relativamente normal debido al tamaño mayor del eritrocito, o al contrario, hematocritos bajos, con cifras de eritrocitos normales constituidos por eritrocitos muy pequeños como en las anemias microcíticas.

Además en su columna se observa las células blancas proporciona una idea aproximada del recuento de leucocitos; una columna de células blancas, de 1 mm de altura, corresponde aproximadamente a 10,000 leucocitos por mm^3 , pero los leucocitos mayores a esta cifra tiende a concentrarse más; por ejemplo, una columna de células blancas de 4 mm, puede corresponder a un recuento leucocitario entre 40.000 y 60.000. ^{10,11}

Fundamento: Se basa en la separación de los glóbulos rojos y el plasma cuando se centrifuga la sangre, mide el porcentaje del volumen de sangre total pero ocupada solamente por los eritrocitos.²

Método Microcapilar:

Aparatos: Microcentrifuga para hematocrito
Lector para hematocrito

Material. Capilar, gasas, mechero o lámpara de alcohol.

Muestra biológica. Sangre total con anticoagulante EDTA al 5%

Procedimiento:

1. Llenar un capilar aproximadamente a las tres cuartas partes con sangre perfectamente mezclada.
2. Sellar el extremo más distante con fuego dando movimientos de rotación.
3. Centrifugar el capilar a 12,000 rpm durante 5 minutos.
4. Leer el microhematocrito en el lector indicado.³

Control de calidad: Realizar por duplicado cada determinación.⁶

Nota: En caso de no contar con lector microhematocrito medir la longitud del capilar con muestra total es igual a 100% y medir la longitud que ocupa el concentrado eritrocitario, hacer el cálculo de hematocrito.

Ejemplo: longitud del capilar con muestra total concentrado eritrocitario y plasma = 5.8 cm, longitud del concentrado eritrocitario 3.4 cm.

$$\begin{array}{l} \text{HTO} \quad 5.8 = 100 \% \\ \quad \quad 3.4 = X \end{array} \quad X = \frac{3.4 \times 100}{5.8} = 58.62\%$$

La longitud del concentrado eritrocitario se multiplica por 100 y se divide entre el total de la longitud de la muestra del capilar.

Causas de error:

- Centrifugación. La menor fuerza centrifuga da lugar al atrapamiento entre los eritrocitos de cantidades mayores de plasma por tanto a un resultado erróneo.
- Muestra. El éxtasis prolongado causado por la constricción con un torniquete aplicado por más de 1 minuto puede dar resultados falsamente elevados con un error del 2 a 6%.
- El exceso de EDTA va dar resultados falsamente bajos.

- Otros errores. Los errores técnicos incluyen la mezcla deficiente, una lectura inadecuada del nivel de células y plasma, menos tiempo de centrifugación o menos revoluciones por minuto.^{2,6}

Factores que interfieren en el resultado:

- Las alteraciones en el tamaño del eritrocito pueden modificar el hematocrito.
- Un número extremadamente alto de leucocitos puede afectar los valores.
- La hemodilución y la deshidratación puede afectar el nivel de hematocrito.
- El embarazo suele reducir ligeramente los valores por la hemodilución.

Valores de referencia varían según la edad y el sexo.

Hombres: 42 – 52 %

Mujeres: 37 – 47 %

Ancianos: Los valores pueden disminuir ligeramente

Niños: 31 - 43%

Lactantes: 30 – 40 %

Recién nacidos 44 – 64 %.⁹

Resultados anormales:

Niveles aumentados

- Enfermedad cardíaca congénita
- Policitemia vera
- Deshidratación severa
- Eritrocitosis
- Diarrea severa
- Eclampsia
- Traumatismo
- Cirugía
- Quemaduras

Niveles disminuidos

- Anemia
- Hipertiroidismo
- Cirrosis
- Reacción hemolítica
- Hemorragia
- Insuficiencia de la médula ósea
- Artritis reumatoide
- Mieloma múltiple

- Desnutrición
- Leucemia¹⁰

Cuenta total de leucocitos

Si el problema de determinación el equipo KX-21N es la cuenta total de **leucocitos** se cuantifica de forma manual por el siguiente método:

Se realiza en la cámara de Neubauer, es importante conocer su área y su volumen de los cuadros que la conforman con estas medidas se calcular un factor por el cual se multiplican las células contadas y así obtener el total de células por mm^3 o por μL (microlitro) que son equivalentes.²

Cámara de Neubauer

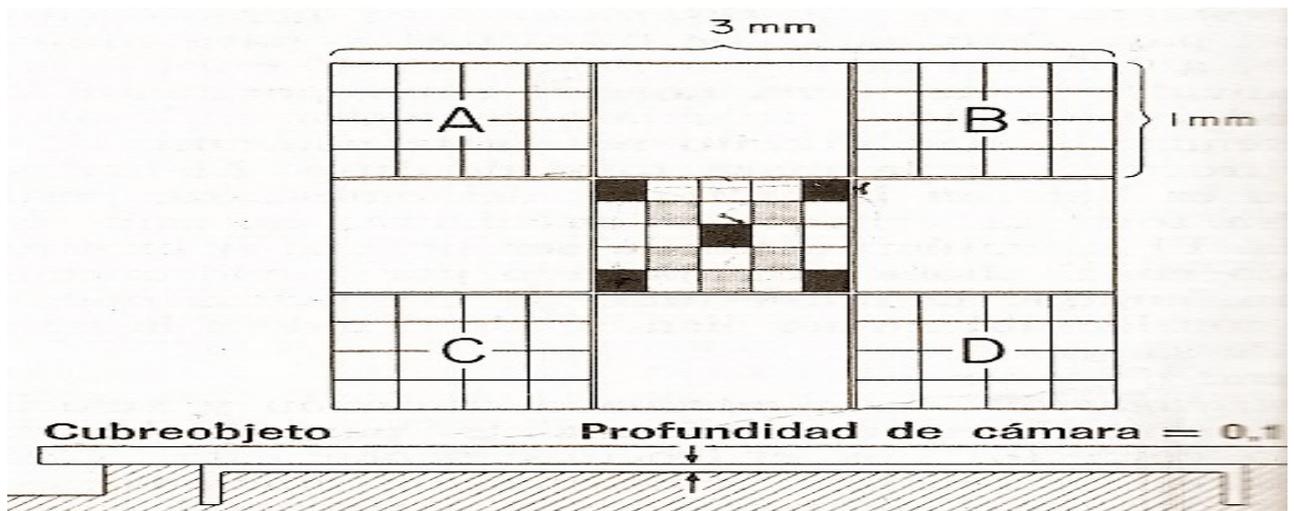


Figura11. Ilustración de la cámara de Neubauer. (Tomada de Henry JB. Todd-Sanford-Davidshon. Diagnóstico y tratamiento clínico para el laboratorio.1984)

- Medidas de las cámara de Neubauer

Los cuadrantes de los extremos que están indicados con la letra L en los extremos de la cámara están subdivididos en cuadros de 4X4 cuadros que miden 1mm de largo y 1 mm de ancho proporcionando un área total de 1mm^2 , un solo cuadrado de los 16 mide 0.25 mm de lado por lado. En estos cuadrantes se cuenta los leucocitos. ²

El cuadrante del centro mide 1 mm de largo, 1 mm de ancho y cada cuadrado de los 25 subdivididos miden 0.2 mm de lado por lado, en esta cuadrícula se cuentan los eritrocitos. La altura de cámara es de 0.1 mm.

Medidas de las cámara de Neubauer.²

- Fórmula general para cuenta de células hemáticas

El factor de multiplicación para obtener una cuenta total de células contadas va a variar dependiendo de la dilución hecha a la muestra, el cuadrante donde se

cuenten las células en la cámara de Neubauer la fórmula general para un factor es:

$$\text{Factor} = \frac{\text{dilución de la muestra}}{\text{número de cuandante} \times \text{volumen (área cuadrado} \times \text{altura)}}$$

Fundamento: La muestra sanguínea se diluyen con líquido de Turk (ácido acético al 2% con unas gotas de azul de metileno) que es una solución hipotónica ácida que destruye glóbulos rojos y plaquetas y permite la cuantificación de leucocitos. El azul de metileno permite observar mejor los glóbulos blancos, a los que tiñe ligeramente. Los normoblastos no se destruyen, se debe tomar en cuenta para corregir los resultados.^{2,6}

Aparatos: Piano para conteo de células, microscópio.

Material: Tubos de 12 X75 mm

Cámara de Neubauer

Reactivos: Líquido de Turk

Muestra biológica: Sangre total con anticoagulante EDTA

Procedimiento:

Para facilitar el procedimiento manual, en el laboratorio se validó un método modificado que utiliza una pipeta de Sahli en vez de la pipeta de Thoma (Anexo 1), para lo cual deben seguirse los siguientes pasos:

1. Colocar en tubo de 12 X 75 mm, agregar 500 μ L (medir volumen con pipeta semi automatizada calibrada que se cuenta en el laboratorio) de líquido de Turk.

2. Aspirar sangre bien mezclada con una pipeta de Sahli hasta la marca de 0.02 mL ($20 \mu\text{L}$) limpie perfectamente por la parte externa y mezcle en el tubo que contiene el líquido de Turk, al vaciar la muestra aspirar líquido de Turk y regresar el aspirado al mismo tubo, hacer esto 2 a 3 veces para que toda la muestra de sangre que esta en la pipeta de Sahli se vacíe y limpie la pipeta.
3. Mezclar suavemente por 20 segundos, colocar la muestra al homogenizador por 3 minutos minutos.
4. Llenar la cámara con un capilar en forma tal que la introducción del líquido quede uniforme.
5. Esperar 1 minuto a que las células se asienten y contar las células con el objetivo de seco débil a 10 X en los 4 cuadros de la cuadrícula de las esquinas indicados con la letra L. A continuación se muestra un sólo cuadrante donde se realiza la cuenta.

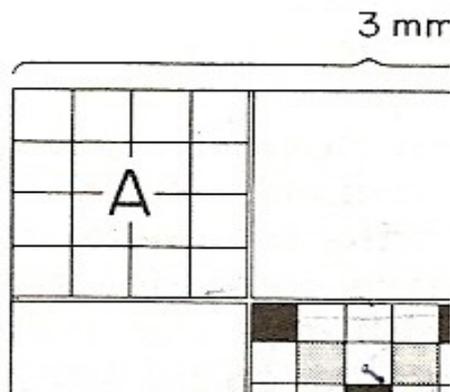


Figura 12. Ilustración de conteo de un cuadrante de células. (Tomada de Henry JB. Todd-Sanford-Davidshon. Diagnóstico y tratamiento clínico para el laboratorio. 1984)

La cuenta se realiza en forma de L siguiendo las flechas y todos los leucocitos que están en la línea de L se cuentan.

Control de calidad: Realizar por duplicado cada determinación.⁶

El factor se obtiene a partir de la fórmula general para cuentas hemáticas.

$$Factor = \frac{\text{dilución de la muestra}}{\text{número de cuadrantes} \times \text{volumen (área cuadrado} \times \text{altura)}}$$

Por ejemplo **cuenta de leucocitos total**

Dilución de la muestra: se tomó 0.02 mL de sangre y 0.5 mL de reactivo de Turk:

$$Dilución = \frac{0.02\text{mL} + 0.5\text{mL}}{0.02} = 26$$

Número de cuadrantes leídos= 4

Área del cuadrante= 1mm al cuadrado.

Altura de la cámara = 0.1 mm

Estos datos se sustituyen en la formula general.

$$Factor = \frac{26(\text{dilución de la muestra})}{[4(\text{número de cuadrante})] * [(1\text{mm}^2 \text{área cuadrado})(0.1 \text{altura})]} = 65$$

El resultado se reporta en mm³ o µL (microlitro) que son equivalentes.

Para cuentas de leucocitos menores a 2,000 mm³ o µ L (microlitro)

Para cuentas de leucocitos menores de 2000, realizar dilución de 1:11 de la muestra con 0.02 mL de sangre (tomar con pipeta de Sahli) y agregar 0.2 mL (pipeta semiautomatizada calibrada que se tiene en el laboratorio) de líquido de Turk. Seguir el mismo procedimiento para cuenta de leucocitos totales y multiplicar por factor de 27.5

$$Factor = \frac{11(\text{dilución de la muestra})}{4(\text{número de cuadrantes}) \times 1\text{mm}^2 (\text{área cuadrado}) \times 0.1(\text{altura})} = 27.5$$

Para cuentas de leucocitos mayores a 25,000 mm³ o µL (microlitro)

Para cuentas de leucocitos mayores a 25,000, realizar una dilución 1:51 de la muestra con 0.02 mL de sangre (tomar con pipeta de Sahli) y agregar 1.0 mL (pipeta semiautomatizada calibrada que se tiene en el laboratorio) de líquido de Turk. Seguir el mismo procedimiento para cuenta de leucocitos totales y multiplicar por factor de 127.5:

$$Factor = \frac{51(\text{dilución de la muestra})}{4(\text{número de cuadrantes}) \times 1\text{mm}^2 (\text{área cuadrado}) \times 0.1(\text{altura})} = 127.5$$

Valores de referencia:

Adultos: 5000 - 10 000 / mm³

- Recién nacidos: 10 000 - 25 000 / mm³

- Niños menores de 2 años: 8000 - 15 000 / mm³

Alteraciones fisiológicas:

El aumento del recuento total de leucocitos (leucocitosis) se puede presentar en el estrés emocional o físico pueden aumentar las cifras de leucocitos

La leucopenia (disminución de la cifra total de leucocitos) se encuentra en muchas formas de insuficiencia medular (p.ej., después de quimioterapia antineoplásica o radioterapia, o en la agranulocitosis).⁹

Recuentos anormales:

Aumento del recuento de leucocitos (leucocitosis)

- Infección
- Neoplasia leucémica
- Traumatismo

- Estrés
- Necrosis hística
- Inflamación.

Disminución del recuento de leucocitos (leucopenia)

- Toxicidad por fármaco (p. ejemplo cloramfenicol)
- Insuficiencia de la médula ósea
- Infecciones sobreagudas (p. ej., fiebre tifoidea, brucelosis) suelen producir neutropenia. En las infecciones sobreagudas graves, la médula ósea puede ser incapaz de responder al consumo periférico de neutrófilos, lo que conduce a neutropenia profunda, con frecuencia un signo de mal pronóstico.
- Enfermedades autoinmunes.
- Enfermedades dietéticas.
- Infiltración de la médula ósea; ejem: mielofibrosis trastorno de la médula ósea en el cual la médula es reemplazada por tejido fibroso.⁹

Corrección de cuenta total de leucocito cuando la muestra presenta eritroblastos

Si el equipo Sysmex KX-21N presenta la alarma WL para resultado de leucocitos indica la presencia de eritroblastos, estas células ya sea por método manual o automatizado, no se destruyen y son contadas como leucocitos debido a esto se debe realizar una corrección del recuento total de leucocitos, y se debe realizar una cuenta diferencial, si se observan eritroblastos se debe hacer la corrección de leucocitos con la siguiente fórmula:

$$\text{Leucocitos corregidos} = \frac{\text{cuenta total de leucocitos}}{100 + \% \text{ de eritroblastos observados en la diferencial}} \times 100$$

Ejemplo: cuenta total de leucocitos con eritroblastos presentes = 13,800

Eritroblastos observados en 100 leucocitos contados = 20

$$\text{Cálculo: Leucocitos corregidos} = \frac{13800}{100 + 20\%} \times 100 = 11500$$

De una cuenta de 13800 que se tenía al hacer la corrección por la presencia de eritoblasto quedaron 11500 resultado confiable. ²

En las figuras 13 y 14 se observa la estructura de los eritoblastos en una tinción de Wright a 100 X.

Eritoblastos observados a 100X

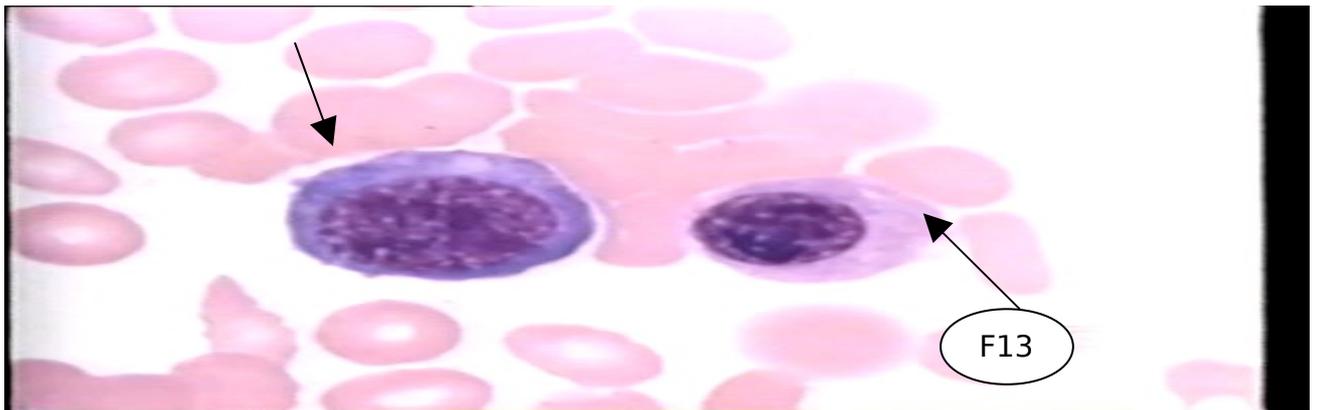


Figura 13. Ilustración microscópica de eritoblastos. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

A.- Muestra un eritoblasto basófilo célula de mayor tamaño (300-800fl) con cromatina nuclear ligeramente densa. No se observa nucleolo, citoplasma azul medio a oscuro y no tiene gránulos u organelos que se identifiquen.¹²

B.- Muestra un eritoblasto policromatofilo célula más pequeña con núcleo más compactado y poca hemoglobina en el citoplasma lo que le da un color verde azulado.

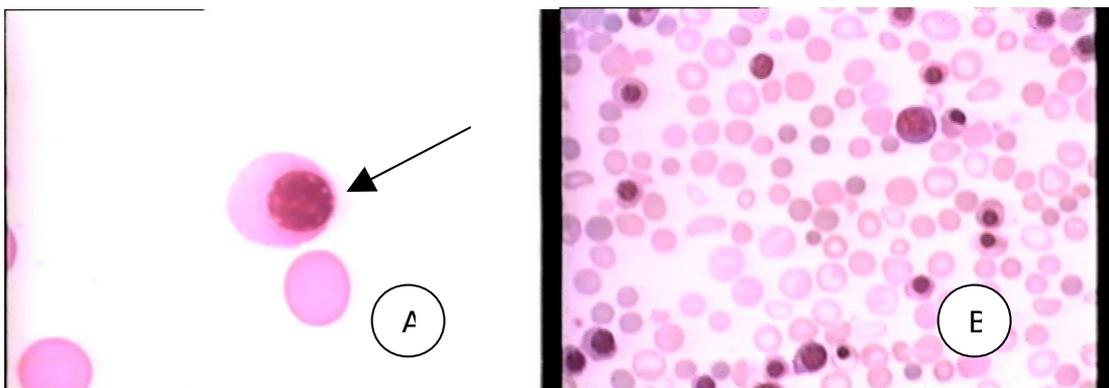


Figura 14. Ilustración microscópica de eritoblastos. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

A.- Se observa un eritroblasto ortocrómico.- presente un citoplasma predominantemente rojo, con ligero matiz azul residual. B.- Se observan eritroblastos, en anemias hemolíticas.¹²

Los cambios morfológicos que se expresan durante su maduración se caracterizan por una notable disminución del tamaño nuclear del eritroblastos, con condensación progresiva de la cromatina y desaparición de los nucleolos. El citoplasma evoluciona perdiendo la intensa basófilia propia de los estadios más jóvenes y adquieren la acidofilia típica que le proporciona la hemoglobina en los estadios más maduros. ¹²

Cuantificación de eritrocitos manual

El método manual no se recomienda, debido a que para cuantificar los millones de células que se contienen por μL se realiza una dilución 1:200 y se multiplica por factor de 10,000 por ser un factor alto causa error por cada célula de $\pm 10\ 000$ por esta razón no es confiable se recomienda el método automatizado. ^{10,11}

Cuantificación de plaquetas manual método directo

Si se presenta problema de determinación en el equipo KX-21N en la cuenta total de **plaquetas** se cuantifica manual. En el laboratorio se validó un método más rápido y sencillo para su cuantificación (Anexo 2).

Las plaquetas del total del cuerpo, $\frac{2}{3}$ circula por la sangre y el otro $\frac{1}{3}$ se deposita en el bazo. Hay intercambio entre las plaquetas sanguíneas y las esplénicas. Su vida media es entre 8 y 12 días. Las plaquetas intervienen en la detención de las hemorragias (hemostasia) formando un verdadero tapón hemostático en el sitio de la lesión, adhiriéndose al endotelio lesionado, constituyendo una verdadera adhesividad plaquetaria.¹³ Actúa en la coagulación propiamente dicha, a través de la liberación de factores proporcionan fosfolípidos, factor plaquetario 3 (FP3) que cataliza la actividad de ciertas interacciones de procoagulantes calcio-dependientes. El FP3 acelera la interacción de los factores de coagulación IXa y VIII y el calcio en la activación del factor X; el FP3 también contribuye a la interacción del factor Xa y V y el

calcio en la activación de la protrombina. El FP4 tiene una actividad antiheparinoide y se libera durante la descarga; el FP4 impide la inhibición de la coagulación en un coágulo plaquetario.¹⁴

Las plaquetas también contienen plasminógeno y antiplasmina, aunque no está claro el papel que desempeña estos factores plaquetarios en la fibrinólisis.²

Fundamento: Se mezcla la sangre con oxalato de amonio al 1 % este reactivo es hipertónico y destruye las demás células y permite cuantificar el número de plaquetas.

Reactivo: Oxalato de amonio 1 %

Muestra biológica. Sangre total con anticoagulante EDTA

Procedimiento:

1. Colocar en un tubo de ensayo de 12 X 75 mm, 0.5 mL de oxalato de amonio 1%.
2. Aspirar sangre bien mezclada con una pipeta de Sahli hasta la marca de 0.02 mL, limpiar perfectamente por la parte externa y mezclar en el tubo que contiene el líquido de oxalato de amonio 1%, aspirando y regresando la muestra por la pipeta de Sahli por 3 veces.
3. Mezclar 20 segundos por inversión y colocar el tubo mezclador mecánico por 3 minutos.
4. Llenar la cámara de Neubauer con un capilar de tal forma que el líquido quede uniforme distribuido por la cámara.
5. Dejar reposar la cámara llena en una caja petri cuyo fondo esté ocupado por una gasa húmeda colocar su tapa, dejar durante 10 minutos en cámara húmeda dentro del refrigerador para evitar la evaporación.
6. Leer al microscopio con el objetivo de 40 X bajando la intensidad de la luz.
7. Contar los 5 cuadrantes de la cuadrícula central en L como se explicó para conteo de leucocitos (los cuadros marcados con color gris, como se ilustran en la figura 15).

Control de calidad: Realizar por duplicado cada determinación.⁶

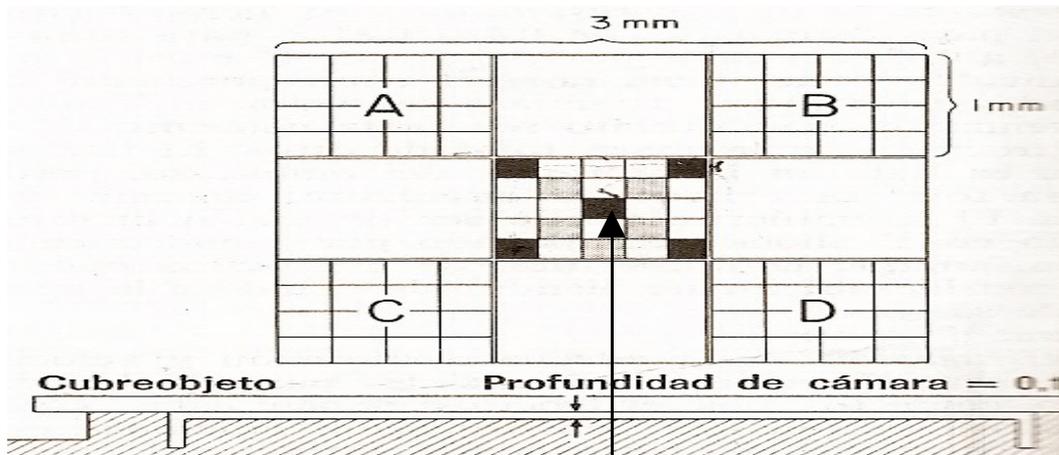


Figura 15. Ilustración de cuadrantes para conteo de plaquetas en la cámara de Neubauer. (Tomada de Henry JB. Todd-Sanford-Davidshon. Diagnóstico y tratamiento clínico para el laboratorio.1984)

La flecha señala uno de los 5 cuadrantes para contar plaquetas.

8. La cifra de plaquetas contadas se multiplica por factor de 1300 y el número obtenido es total de plaquetas por mm^3 o μL (microlitro).

Obtención del factor de 1300:

$$\text{Factor} = \frac{26 \text{ (dilución de la muestra)}}{5 \text{ (número de cuadrante)} \times 0.2\text{mm (2área cuadrado)} \times 0.1\text{(altura)}} = 1300$$

Cuantificación de plaquetas manual método indirecto

Este método de conteo de plaquetas no es el ideal para una cuantificación exacta, se tiene un grado de error si el extendido de sangre no es uniforme pero es un método alternativo en caso de no contar con oxalato de amonio al 1 % y se tenga que realizar una cuantificación manual de plaquetas.²

Procedimiento:

1. Homogenizar la muestra de sangre con EDTA perfectamente y hacer una extensión sanguínea sobre un portaobjeto la cual debe ser uniforme y llevarse a cabo con gran rapidez (con el objeto de evitar la aglomeración de las plaquetas).
2. La extensión sanguínea se tiñe con colorante de Wright al igual que una cuenta diferencial.
3. Se cuentan por lo menos 1000 eritrocitos y a la vez se realiza el recuento de plaquetas en los eritrocitos contados.
4. El recuento de los 1000 eritrocitos se debe realizar en la parte delgada del frotis de modo que se observen una cantidad uniforme de eritrocitos.²

Si se contaron por campo 300 eritrocitos, leer en 3 campos cuantas plaquetas contienen y en el cuarto campo contar 100 eritrocitos y el número de plaquetas.

El número de plaquetas se calcula con la siguiente formula: ^{2,3}

$$\text{No. plaquetas} = \frac{\text{recuento total de eritrocitos por mm}^3}{1000} \times \text{recuento plaquetas en frotis}$$

-

Ejemplo: Paciente con cuenta de eritrocitos de 3,910,000 mm³

Se contó 129 plaquetas por 1000 eritrocitos

$$\text{No. plaquetas} = \frac{3,910,000 \text{ eritrocitos por mm}^3}{1000} \times 129 \text{ plaquetas en frotis} = 504,390 \text{ plaq.}$$

Otro cálculo para cuantificar plaquetas por método indirecto:

Procedimiento:

1. Homogenizar la muestra de sangre con EDTA perfectamente.
2. Hacer una extensión sanguínea sobre un portaobjeto la cual debe ser uniforme y llevarse a cabo con gran rapidez (con el objeto de evitar la aglomeración de las plaquetas).
3. La extensión sanguínea se tiñe con colorante de Wright al igual que una cuenta diferencial.
4. Contar un promedio de plaquetas por campo, leyendo mínimo 5 campos, leer en la parte delgada del frotis de modo que se observen una cantidad uniforme de eritrocitos, y no estén aglomerados los eritrocitos, obtener un promedio de plaquetas por campo y multiplicar por 25,000.¹⁵

Ejemplo. Promedio de plaquetas de 5 campos leídos = 21 plaquetas

Número de plaquetas = $21 \times 25,000 = 525,000 \text{ mm}^3$

Este método es práctico y generalmente se obtiene buenos resultados, pero no es el ideal para una cuantificación exacta, se tiene un grado de error si el extendido de sangre no es uniforme pero es un método alternativo en caso de no contar con oxalato de amonio al 1% y se tenga que realizar una cuantificación manual de plaquetas. ¹⁵

Valores de referencia:

Adultos: 150.000 – 450.000 /mm³

Recuentos anormales:

Causas de valores bajos de plaquetas (trombocitopenia)

- Trombocitopenia hipoproliferativa.
 - o Médula aplásica o hipoplasia
 - o Enfermedad infiltrativa de la medula: carcinoma, leucemia, infección desimanada.
 - o Hipoplasia megacariocítica específica.

- Trombopoyesis inefectiva.
 - o Deficiencia de folato.
 - o Deficiencia de vitamina B₁₂

- Secuestro de plaquetas.
 - o Reserva de plaquetas en el bazo agrandado(8)

- Mayor destrucción plaquetaria
- Trombocitopenia inmune
- Autoinmune
- Asociación con fármacos

- Coagulación intravascular diseminada
- Lesión mecánica de las plaquetas

Causas de valores altos de plaquetas (trombocitosis)

- Trombocitosis reactiva
- Transtornos infecciosos.
- Tumores malignos
- Anemias por deficiências de hierro
- Después de intervenciones quirúrgicas
- Postesplenectomía
- Trastornos inflamatorios
- Después de hemorragia^{6,9}

Cuenta de reticulocitos manual

Una vez finalizada la maduración del eritroblastos ortocromático, el núcleo es expulsado de la célula se transforma en reticulocito, célula enucleada que todavía posee cierta capacidad de síntesis de ARN, proteínas y hemoglobina, gracias a la presencia de algunas mitocondrias, ribosomas y restos de reticuloendoplasmático. Su tamaño es de 8-9 micrometros, conserva un cierto grado de basofilia, a medida que madura va perdiendo retículo granulofilamentoso hasta transformarse en un eritrocito maduro. El reticulocito permanece algunos días en la medula ósea, pasando luego a la sangre periférica, donde persiste durante 24 horas y finaliza su maduración. El tiempo que tarde en madurar el proeritroblasto en reticulocito es de 3 a 4 días. ^{13,16}

Su cuenta constituye un excelente indicador de la capacidad regenerativa de la medula ósea eritroide, de forma que en las anemias arregenerativas son escasos o nulos y en la regenerativa son abundantes. ²

Una baja cuenta de reticulocitos en presencia de anemia indica una inapropiada respuesta medular. ⁶

Fundamento: Cuando los reticulocitos se tiñen con azul de cresilo brillante, un colorante supravital, que penetra en la célula viva antes de la fijación, se precipita el ácido ribonucleico y aparece como una red azul, de ahí el nombre de reticulocito a la célula. ⁶

Aparatos: Piano para conteo de células, microscopio.

Material. Porta objetos, aceite de inmersión, tubos de 12X 75 mm.

Reactivo: Azul de cresilo brillante al 1%

Muestra biológica. Sangre total con anticoagulante EDTA

Procedimiento:

1. A un tubo de 13 X 75 mm agregar 2 a 3 gotas de colorante, añadir 5 gotas de sangre perfectamente homogenizada, mezclar perfectamente.
2. Incubar a 37 °C por 10 a 15 minutos. No pasar el tiempo.
3. Mezclar bien la suspensión. Realizar con esta mezcla un extendido en un portaobjeto.
4. Dejar seca.
5. Observar al microscopio objetivo de 100X, se escoge una zona que no haya suspensión de glóbulos rojos.
6. Examinar 1000 eritrocitos y contar el número de reticulocitos que hay en estas células contadas.²

Control de calidad: Realizar por duplicado cada determinación.⁶

Estructura a observar del reticulocito a 100X

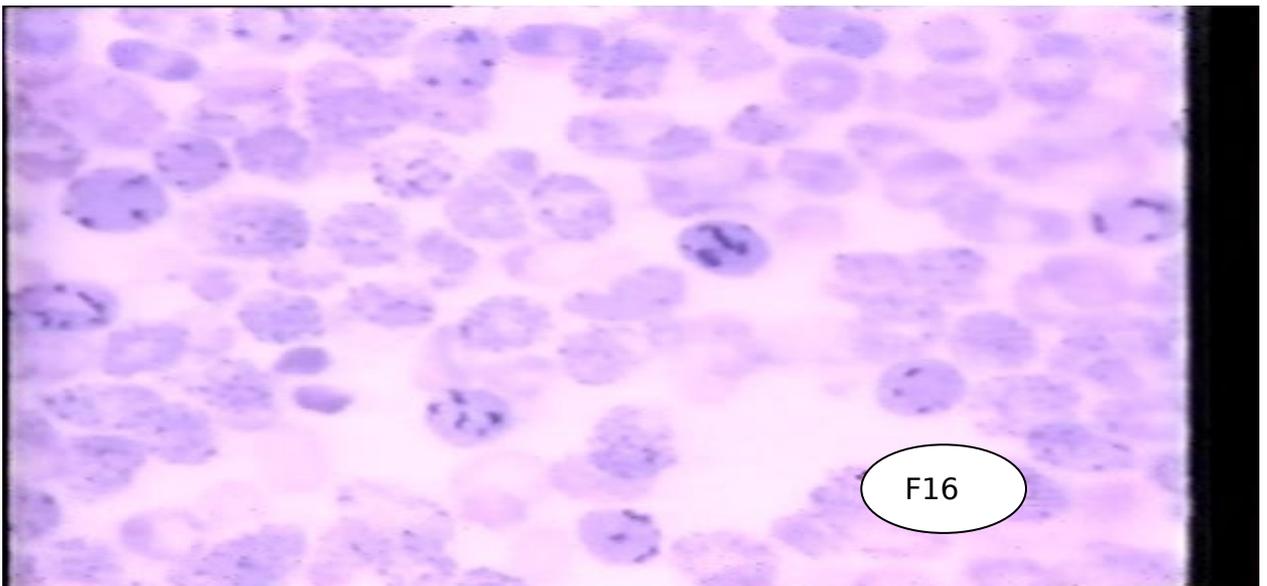


Figura 16. Ilustración de reticulocitos microscópicamente. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

Se observa reticulocitos y con las flecha señala alguno de ellos que se encuentra en la figura.

El número de reticulocitos se calcula con la siguiente fórmula:

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

Ejemplo: Se observaron 15 reticulocitos de 1000 (número aconsejable a observar) eritrócitos observados.

$$\%reticulocitos = \frac{15}{1000} \times 100 = 1.5\%$$

Valores de referencia:

- Adultos 0.5 a 2%
- Recién nacidos 2.5-6.5 %
- Lactantes 2.5 – 3.2 %²

Para aclarar si el aumento de reticulocitos indica eritropoyesis adecuada en pacientes anémicos con hematocrito disminuido, se puede calcular el índice reticulocitario:

$$\text{Índice reticulocitario} = \text{reticulocitos en \%} \times \frac{\text{hematocrito del paciente}}{\text{hematocrito normal}}$$

Ejemplo:

$$\text{Índice reticulocitario} = 1.5 \% \text{ reticulocitos} \times \frac{26\%}{45\%} = 0.86\%$$

El índice reticulocitario en un paciente con buena respuesta medular a la anemia deber ser de 1.0; si el inferior a 1.0, aunque el recuento de reticulocitos esté elevado en el paciente anémico, indica que la respuesta de la médula ósea es inadecuada en cuanto a su capacidad compensadora (Por ejemplo en caso de deficiencia de hierro, deficiencia de vitamina B₁₂ o insuficiencia medular) ^{6,9}

Alteraciones fisiología :

El recuento de reticulocitos puede estar aumentado durante el embarazo.

Resultados anormales:

Valores aumentados

- Anemia drepanocítica
- Hemorragia (3 a 4 días mas tarde)
- Postesplenectomía
- Anemia hemolítica
- Eritroblastosis fetal
- Embarazo
- Leucemia

Valores disminuidos.

- Anemia perniciosa
- Deficiencia de acido fólico
- Cirrosis hepática
- Anemia aplásica
- Radioterapia

- Insuficiencia medular
- Hipofunción de la hipófisis anterior
- Infección crónica ⁶

Velocidad de sedimentación globular (VSG)

La eritrosedimentación o **velocidad de sedimentación glomerular (VSG)** es utilizada para la evaluación de enfermedades infecciosas, inflamatorias, neoplásicas, tuberculosis, linfomas y en la tamización de personas sanas. Con la incorporación de nuevas pruebas de laboratorio, en las dos últimas décadas ha perdido vigencia, quedando sólo unas pocas entidades en donde realmente estaría indicada. La prueba es inespecífica, como alternativa, el médico dispone de pruebas con mayor sensibilidad y especificidad, como la proteína C reactiva cuantitativa por nefelometría cinética (la proteína C reactiva es una proteína anormal que aparece en la sangre en las etapas agudas de distintos trastornos inflamatorios, virtualmente ausente en personas sanas).

En el resto de las enfermedades inflamatorias es preferible utilizar la proteína C reactiva.

En las enfermedades neoplásicas no tiene indicación. En estos casos se deben utilizar los marcadores tumorales, de acuerdo con las respectivas neoplasias.^{16,}

17

Fundamento: La velocidad de sedimentación de las células se acelera cuando la concentración de fibrinógeno y de otras globulinas aumenta en el plasma o cuando la albúmina disminuye.⁶

Material: Tubos de Wintrobe, pipetas pasteur de punta larga.

Muestra biológica. Sangre total con anticoagulante citrato de sodio al 3.8%.

Procedimiento:

1. Llenar un tubo de Wintrobe con sangre perfectamente homogénea hasta la marca de 0-100 con una pipeta pasteur de punta larga, cuidando que no queden burbujas de aire dentro del tubo.
2. Colocar el tubo en una gradilla para tubos de Wintrobe previamente calibrada.
3. Esperar 60 minutos.
4. Leer el nivel en que se encuentra la zona de separación entre el plasma y los eritrocitos sedimentados.²

Causas de Error:

Si la concentración de anticoagulante es demasiado elevada, la VSG estará disminuida.

Si se deja la sangre en la pipeta durante más de 60 minutos, la VSG aumentará. Si se lee antes de 60 minutos la VSG dará resultados bajos.

Un aumento (o disminución) muy marcado de la temperatura ambiente dará valores de VSG aumentados (o disminuidos), respectivamente.

La vibración de tubo donde se halla la sangre aumenta los valores de la VSG.

La presencia de burbujas en la sangre dará resultados erróneos.

La presencia de coágulos de fibrina en la sangre invalida los resultados de la prueba.^{2,6}

Valores de referencia:

La eritrosedimentación varía con el sexo y la edad.

- Niños menores a 10 años de 10 mm/h.
- Hombres menores 50 años de edad de 0 y 15 mm/h.
- Hombres mayores 50 años de edad de 0 y 20 mm/h.
- Mujeres menores 50 años de edad de 0 y 20 mm/h.
- Mujeres mayores 50 años de edad de 0 y 30 mm/h.

Resultados anormales:

Valores aumentados.

- Anemia.
- Inflamación
- Embarazo
- Fiebre reumática.
- Tumores malignos

- Paraproteinemia.
- Mieloma
- Enfermedad de Waldenström
- Artritis reumatoide
- Enfermedad de Kawasaki
- Enfermedad infecciosa bacteriana.

Valores disminuidos.

- Policitemia
- Hipoproteinemia. ^{2,6,9}

Fórmulas para realizar manualmente el cálculo de los índices eritrocitarios

Los índices eritrocitarios son útiles para establecer el diagnóstico diferencial entre los diversos tipos de anemia. Se obtienen por cálculo matemático a partir del recuento eritrocitario, el hematocrito y la concentración de hemoglobina. Se pueden realizar cuando se tiene los valores del equipo automatizado, como una medida confirmatoria que el equipo Sysmex está funcionando correctamente no son aconsejables sus cálculos con resultados manuales debido a que con resultados manuales de conteo de cuenta total de eritrocitos se obtiene resultados no confiables.^{6,11}

Volumen corpuscular medio (VCM)

Indica el tamaño promedio de los glóbulos rojos. Su valor medio de referencia del VCM es de 90 fL (femtolitro $1 \times 10^{-15} \text{L}$). Un VCM bajo equivale a microcitosis y

un valor elevado macrocitos. La valoración del tamaño de los hematíes es fundamental es para el diagnóstico de una anemia, siendo el mas importante de todos los índices eritrocitarios. Más del 90% de anemias en México están dadas por anemias microcíticas con un VCM bajo, y de ellas la más frecuente es la anemia por deficiencia de hierro, aunque también se encuentra microcitos en talasemias.^{10,13}

El VCM está aumentado cuando los hematíes son grandes o macrocíticos. Esto se ve sobretodo en las anemias megaloblasticas (p. ejemplo deficiencia de vitamina B₁₂ o ácido fólico).¹¹

Se requiere de los valores de hematocrito y la cuenta de eritrocitos. Se determina con la siguiente fórmula:

$$VCM = \frac{\text{hematocrito(L)}}{\text{eritrocitos/L}} \times 10 = \text{femtolitro (fL)}$$

Ejemplo:

Hematocrito:61%= 61 mL = 0.061 L

Eritrocitos: 8 X 10¹²/L

$$VCM = \frac{0.061L}{8 \times 10^{12} / L} \times 10 = 76.26 \text{ fL}$$

Valor de referencia: 80- 90 fL.^{2,6}

Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)

Es el contenido medio de hemoglobina promedio de cada glóbulo rojo, expresa el promedio de peso de la hemoglobina en los glóbulos rojos. Representa la cantidad promedio (peso medio) de hemoglobina en cada eritrocito y se

expresa en picogramos (pg). Indica la cantidad de hemoglobina en el eritrocito, por lo que se considera hipocromía si HCM es bajo; normocromía con HCM normal e hipercromía si el HCM es alto.¹¹

Se necesitan los valores de hemoglobina en g/dL y de la cuenta de eritrocitos. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$HCM = \frac{\text{hemoglobina (g/dL)}}{\text{eritrocitos/L}} \times 10 = \text{picogramos (pg)}$$

Ejemplo: 19.97 g/ dL= 199.7 g/ L

$$HCM = \frac{199.7 \text{ g / L}}{8 \times 10^{12} / L} \times 10 = 24.96 \text{ pg}$$

Valor de referencia: 27 a 34 pg^{2,6}

Concentración de Hemoglobina Corpuscular de Media (CHCM)

Define la concentración de hemoglobina en 100 ml de glóbulos rojos. La CHCM se encuentra baja en los hematíes observados en extensión sanguínea que presentan palidez central de mayor tamaño que habitual, es decir, se aprecian hipocrómicos.¹²

Aunque la hemoglobina está presente sólo en el interior de los hematíes, éstos se lisan para medir la concentración de hemoglobina y los resultados se expresan en relación a decilitros (dL) de sangre total. Para convertir este valor en concentración de hemoglobina dentro del eritrocito [concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)], es necesario contar con los valores de hemoglobina y hematocrito y realizar el siguiente cálculo: ¹¹

$$CHCM = \frac{\text{hemoglobina (g / dL)}}{\text{hematocrito / L}} \times 100 = \text{g / dL}$$

Ejemplo:

$$CHCM = \frac{19.97g/dL}{61dL} \times 100 = 32.73g/dL^2$$

Resultados anormales de los índices eritrocitarios:

Valores VCM aumentado

- Enfermedades hepáticas
- Tratamiento con antimetabólicos
- Alcoholismo
- Anemias perniciosas (deficiencia de vitamina B₁₂)
- Deficiencia de ácido fólico

Valores VCM disminuido.

- Anemia ferropénica
- Talasemia

Valores HCM aumentada

- Anemia macrocítica

Valores HCM disminuida

- Anemia macrocítica
- Anemia hipocrómica

Valores CHCM aumentada

- Esferocitosis

Valores CHCM disminuida

- Anemia ferropénica
- Talasemia ^{2,3,6,9}

Categorización de las anemias según los índices eritrocitarios:

Anemia normocítica normocrómica

- Deficiencia de hierro (en fases precoces)
- Enfermedades crónicas (sepsis, tumor)
- Pérdida aguda de sangre
- Anemia aplásica (toxicidad por cloramfenicol)
- Anemias hemolíticas adquiridas (válvula cardiaca protética)

Anemia microcítica hipocrómica

- Deficiencia de hierro (fase avanzadas)
- Talasemia
- Intoxicación por plomo

Anemia microcítica normocrómica

- Enfermedad renal (debido a falta de eritropoyetina)

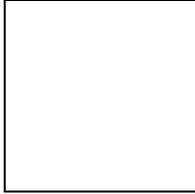
Anemia macrocítica normocrómica

- Deficiencia de B₁₂ o ácido fólico
- Ingestión de hidantoína
- Quimioterapia.^{16,17}

Cuenta diferencial de leucocitos manual

El equipo identifica con precisión a los neutrofilos, linfocitos y en un parámetro que define como MX cuenta monocitos, basofilos, eosinófilos, todos en un solo valor, y no identifica bandas. Por tanto si el equipo reporta aumentado el valor de MX, o si el diagnóstico del paciente es de algún padecimiento agudo como dolor abdominal o crisis asmática, se debe realizar una **cuenta diferencial** manual con colorante de Wright por el siguiente método:

Fundamento: Este colorante se llama policromático por que produce varios colores. Es una solución de alcohol metílico de un colorante acido eosina que



se unen con los componentes básicos de las células (citoplasma) y otro básico (azul de metileno) que tiñen los compuestos ácidos (ácidos nucleicos y nucleoproteínas del núcleo) de las células sanguíneas.^{2,6}

Procedimiento:

1. Hacer un extendido de sangre sobre un portaobjeto limpio y desengrasado.
2. Secar al aire
3. Teñir con colorante de Wright por 7 minutos.
4. Agregar solución amortiguadora sobre el portaobjeto por 5 minutos.
5. Escurrir, pasar sobre el chorro del agua de la llave.
6. Secar al aire.
7. Observar al microscopio a objetivo de inmersión contando en método cruzado hasta contar 100 células (Figura 17).

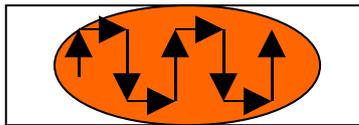


Figura 17. Ilustración con flechas como se debe contar las células en el frotis para cuenta diferencial de leucocitos iniciando el conteo por la extensión más delgada a la más gruesa.

La cuenta diferencial se realiza como se indica en la figura 17 con el objeto de incluir las áreas central y periférica del frotis.

En esta cuenta diferencial identifica con exactitud las células de cada una de las cinco estirpes, si hay alguna anomalía en su morfología se debe reportar.

El resultado se reporta en números absolutos por microlitro haciendo la conversión de porcentaje a cuenta absoluta con la siguiente fórmula.

$$\text{Valores absolutos} = \frac{\text{No. total leucocitos} \times \text{microlitro}}{100} \times \% \text{ leucocitos contados en diferencial}$$

Ejemplo:

Cuenta total de leucocitos = 19, 100 / μ L

Se contó 100 encontrando 73 segmentados, 3 linfocitos, 1 monocito, 18 bandas.

Se aplica la fórmula para cada serie para obtener cuenta de células absolutas

Para segmentados

Sustitución

$$\text{Valor absoluto} = \frac{19100}{100} \times 78 = 14898 / \text{microlitro}$$

Para linfocitos es:

$$\text{Valor absoluto} = \frac{19100}{100} \times 3 = 573 / \text{microlitro}$$

Para monocitos es:

$$\text{Valor absoluto} = \frac{19100}{100} \times 01 = 191 / \text{microlitro}$$

Para bandas es:

$$\text{Valor absoluto} = \frac{19100}{100} \times 18 = 3438 / \text{microlitro}$$

La sumar de cuenta de valores absolutos debe sumas el total de leucocitos contados $14,898 + 573 + 191 + 3438 = 19, 100$.^{2,3,6}

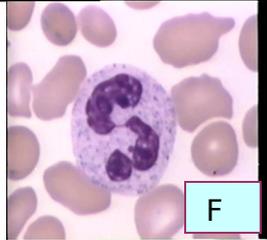
Interpretación

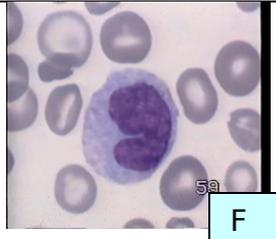
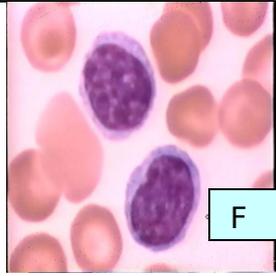
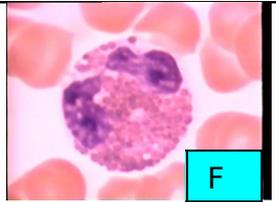
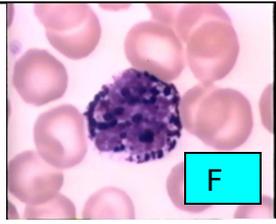
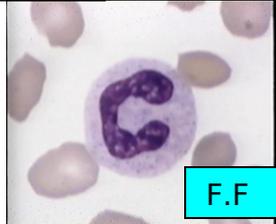
Desviación a la izquierda: corresponde a un aumento de formas inmaduras (bandas o en cayado y juveniles) dentro de los neutrófilos.

Desviación a la derecha: Corresponde a una híper segmentación nuclear de polimorfonucleares presentan más de 5 lóbulos.

Es importante hacer la diferenciación de la morfología normal de la patológica. Las células con morfología normal de la serie leucocitaria se presenta en el cuadro 4.

Cuadro 4 Observación de la Serie leucocitaria normal

Célula	Forma	Tamaño en micrómetro	Forma del núcleo	Tinción citoplasma	Granulación
Segmentado (neutrofilo)		12-14	Segmentado 2 -5 lóbulos unidos por finos puentes de cromatina. la cromatina se observa condensada	Poco basofilo	Abundante azurófila y específica.

Monocito		15-18	El nucleo puede ser redondo o reniforme. Se caracteriza por los gránulos muy finos que no son visibles.	Abundante de color gris-azulado. Con pequeñas vacuolas	Abundante granulación azurofila.
Linfocito pequeño. Linfocito grande		9-12 12-16	Es redondo Es grande	Su color es celeste Basofila, gránulos azurofilos	Pocos Azurofilos
Eosinofilo		14-16	Núcleo compactado, bilobulado. Muy fragiles y se dañan al preparar el frotis.	Grandes eosinofilo	únicamente eosinófilos
Basofilo		14 -16	Ocultos por gran cantidad de gránulos	Basofilo	Gran cantidad de granulos basófilos.
Banda		14- 16	Alargado sin lobulaciones, cromatina condensada	Poco basofilo	Finas basofilas.

Serie leucocitaria normal. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)^{2,3,6}.

Al observar el frotis sanguíneo para contar cuenta diferencial se observa también las estructuras eritrocitarias y plaquetarias se ilustra su forma normal en la figura 18 y 20 respectivamente.

Observación de la Serie roja normal

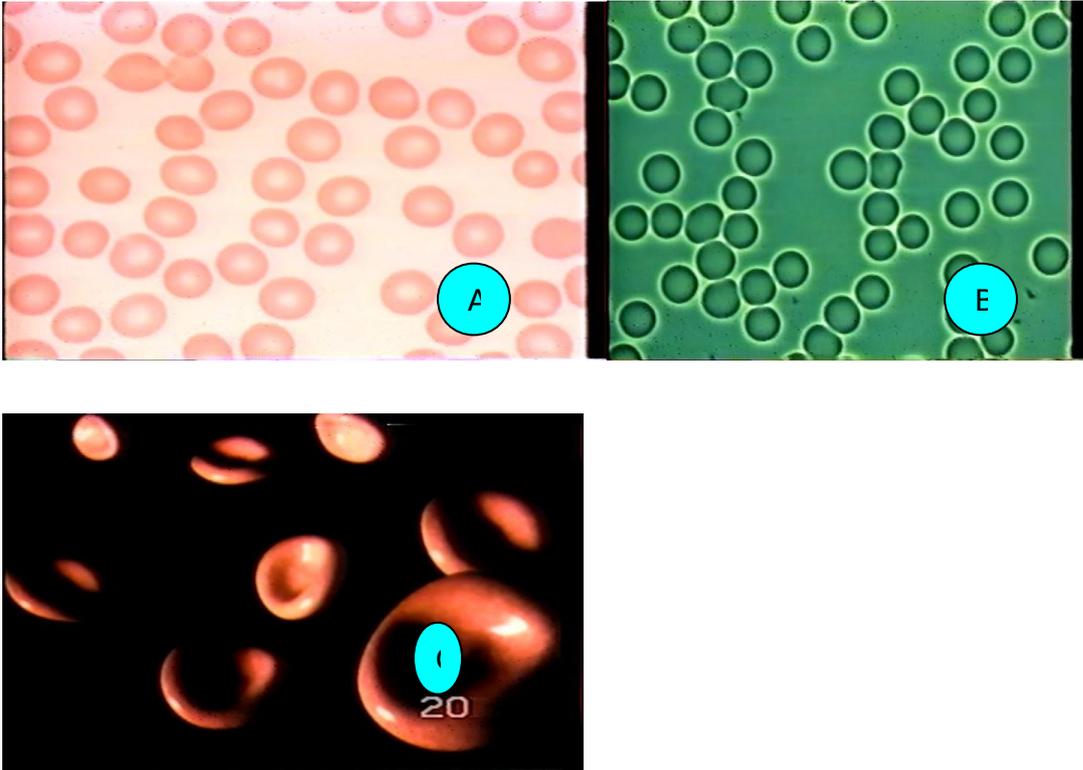


Figura 18. Ilustración de microscópica de eritrocitos normales. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

A.- estructura normal del eritrocito. B.- eritrocito en contraste de fase.

C.- Eritrocito en tercera dimensión.

Los eritrocitos normales son discos bicóncavos de 6 a 8 micras de diámetro y de a 0.5 a 2.5 micras de espeso, en un frotis teñido se presentan como corpúsculos circulares con borde de neto y liso. El color es menos intenso en el centro.¹²

Membrana eritrocitaria:

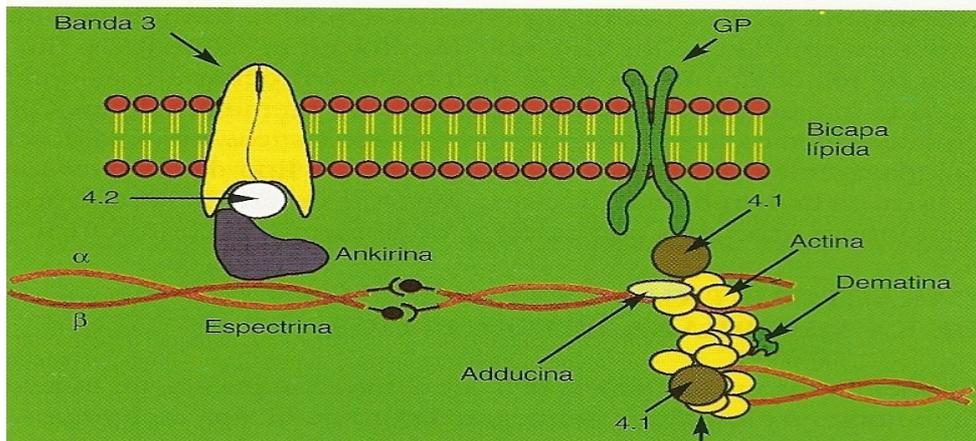


Figura 19. Membrana del eritrocito. (Tomada de Ruiz-Argüelles G. Fundamentos de Hematología. 2003)

La membrana eritrocitaria forma una barrera entre el interior de la célula y el plasma, que permite mantener altas concentraciones de hemoglobina y cifras diferentes de iones y metabolitos en plasma; su característica principal es su insolubilidad al agua debido a que esta formada en más del 50 % por lípidos que forman una bicapa.

El 95 % del total de lípidos de la membrana los integran los fosfolípidos y el colesterol no esterificado, y en conjunto con otros lípidos (glucolípidos, glicéridos y ácidos grasos). La superficie interna de la membrana es una red de proteínas y son responsables del mantenimiento de la forma, estabilidad y deformación del eritrocito. Principales componentes de la membrana son espectrina, actina, proteína 4.1, aducian, anquirina, tropomiosina, tropomodulina, dematina (banda 4.9), transportador de aniones (banda 3) banda 4.2 y el anclaje glucolípido. ¹¹

Observación de las plaquetas normal

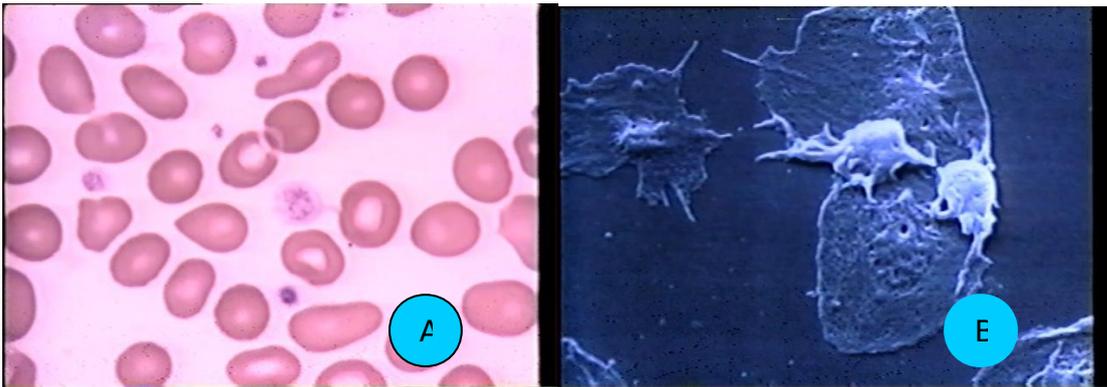


Figura 20. Ilustración microscópica de plaquetas normales. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

A.- Observación de plaquetas. B.- Plaquetas en microscopio de barrido

Las plaquetas son fragmentos del citoplasma de los megacariocitos. En frotis de sangre se observan de un diámetro de 2-3 micras, pero varían entre 1 y 4 micras, en diversas enfermedades su tamaño puede variar de partículas casi invisibles o masas más grandes que los eritrocitos o leucocitos. Suelen hallarse en formas de redondas, avaladas, fusiformes y discoides, con bordes lisos, el citoplasma se tiñe de azul pálido contiene un número variable de pequeños gránulos azules que tienden a conglomerarse en el centro.¹⁸

Morfología eritrocitaria anormal.

Como todas células sanguíneas, derivan de las células de la médula ósea llamadas células madre hematopoyéticas multipotenciales (CMHs). Se necesitan muchos nutrientes para producir los glóbulos rojos. Los más importantes son el hierro, la vitamina B12 y el ácido fólico, pero el organismo necesita también cantidades mínimas de vitamina C, riboflavina y cobre, así como un equilibrio apropiado de hormonas, sobre todo la eritropoyetina (hormona que estimula la producción de glóbulos rojos). Sin estos nutrientes y hormonas, la producción de los glóbulos rojos es lenta e inadecuada y las células pueden deformarse y resultar incapaces de transportar el oxígeno adecuadamente. Las enfermedades crónicas también pueden ocasionar una disminución en la producción de los glóbulos rojos. A continuación se menciona las anomalías más frecuentes encontradas en la población de análisis a este laborator.²¹

Alteraciones del eritrocito en cuanto al tamaño.

Anisocitosis.

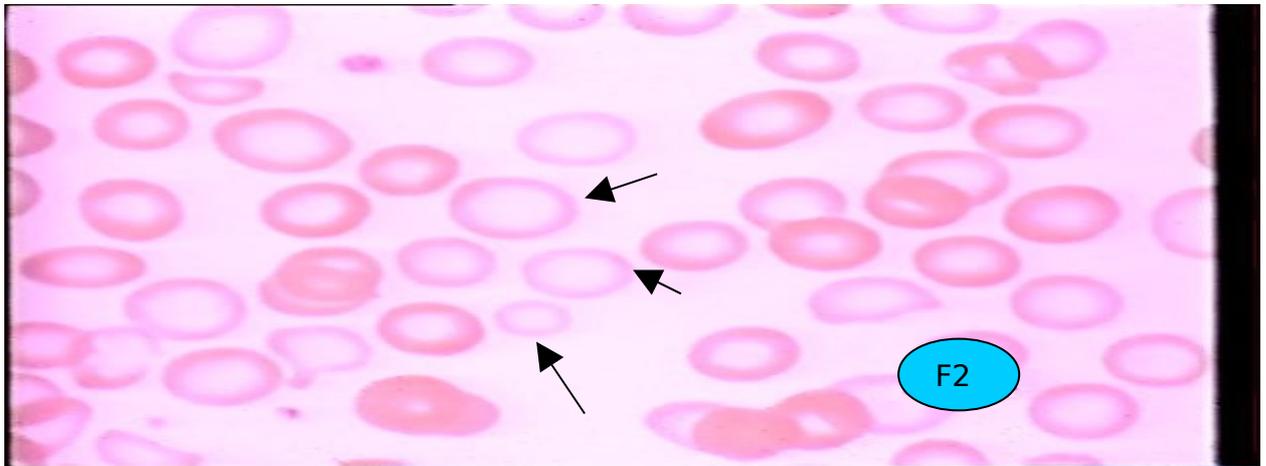


Figura 21. Ilustración microscópica de eritrocitos en forma de anisocitosis. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

Se observa anisocitosis en los eritrocitos señalados con las flechas (variación de tamaño)

Anisocitosis.- se observan desigualdad en el tamaño de los eritrocitos, observándose de tamaño mayor o macrocitos y menor al normal microcitos.

La anisocitosis de grado variable es una característica de la mayoría de las anemias; cuando es intensa, existen tanto macrocitos como microcitos.^{2,12}

Microcitosis.-

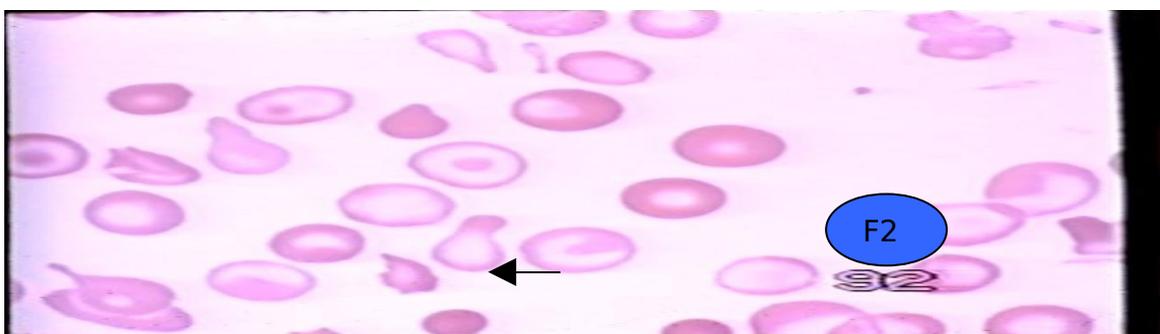


Figura 22. Ilustración de eritrocitos en forma de microcitosis. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

Microcitosis: eritrocito anormalmente pequeño El VCM es menor a 80 fL y su diámetro menor de 6.0µm en un frotis teñido. Asociado a patologías como anemia ferropénica, talasemias anemias de enfermedades crónicas.⁶

Macrocitosis

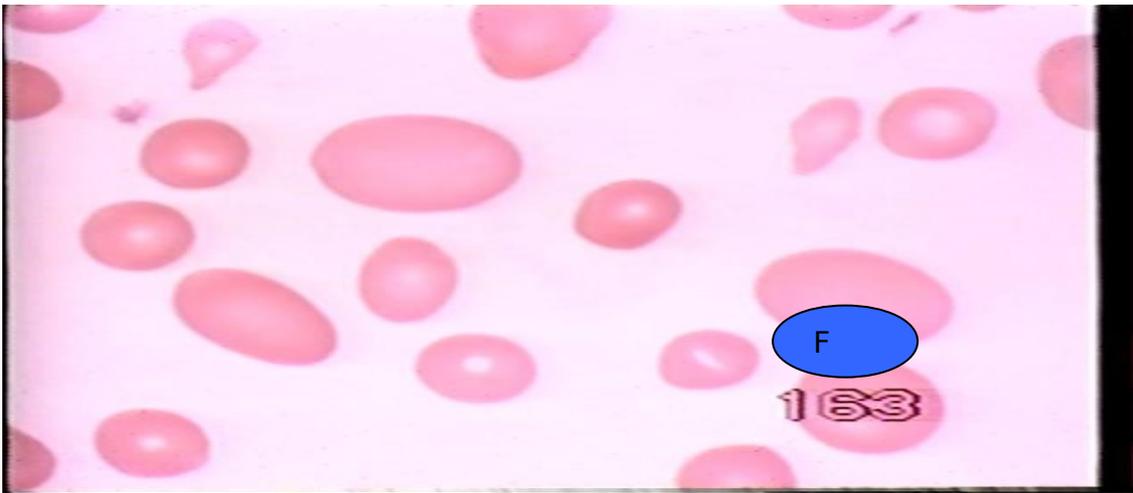


Figura. 23. Se observa macrocitosis en los eritrocitos (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. México.1997)

Se observan eritrocitos de diámetro mayor al normal, en los que no es aparente la posición clara central. Estos se forman por la disminución en la síntesis de ADN por deficiencia de vitamina B12 o el ácido fólico, se produce por deficiencia hereditaria de enzimas necesarias para la síntesis, hay una eritropoyesis ineficaz.^{6,12}

Formas megaloblasticas: deficiencia de vitamina B-12 o ácido fólico, secundarias anomalías gastrointestinales, gastrectomía, enfermedad hepática, empleo de anticonvulsivantes, antimetabolitos y anticonceptivos orales, deficiencia dietética.

Formas no megaloblasticas: hemorragias, enfermedades hepáticas crónicas, hipotiroidismo.³

El reporte de estas alteración es de acuerdo a la cantidad encontrada. Ejemplo: + escasas, ++ moderadas, +++ abundantes.

Alteraciones en cuanto a la forma.

Poiquilocitosis

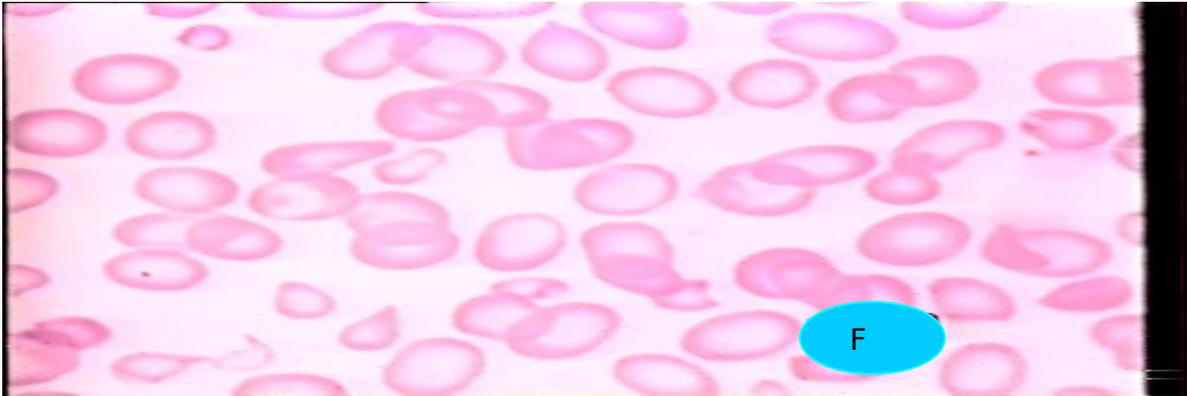


Figura 24. Se observan eritrócitos de diferentes formas (poiquilocitosis)
(Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

Se observa alteración en cuanto a la forma del eritrocito, se ven diferentes formas irregulares, como eritrocitos espinosos, eliptocitos, piriformes, drepanocíticos y no la forma bicóncava. Se encuentran en anemias perniciosas, talasemia.etc ¹²

Equinocitos.

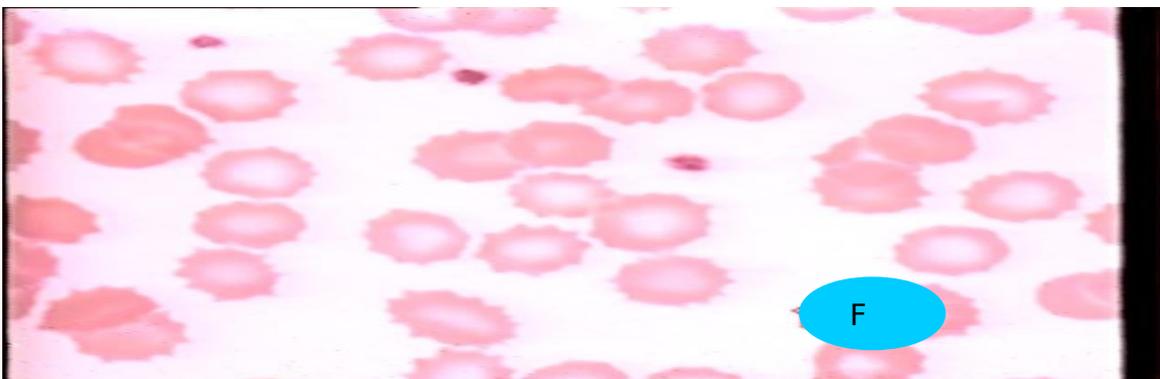


Figura 25. Se observa eritrocitos crenados en su superficie (equinocitos)
(Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. México.1997)

Equinocitos eritrocitos crenados, se observa predominio de eritrocitos con pequeñas espículas cortas distribuidas regularmente por su superficie. Generalmente se observan en insuficiencia renal.¹⁷

Keratocitos o eritrocitos en casco.-

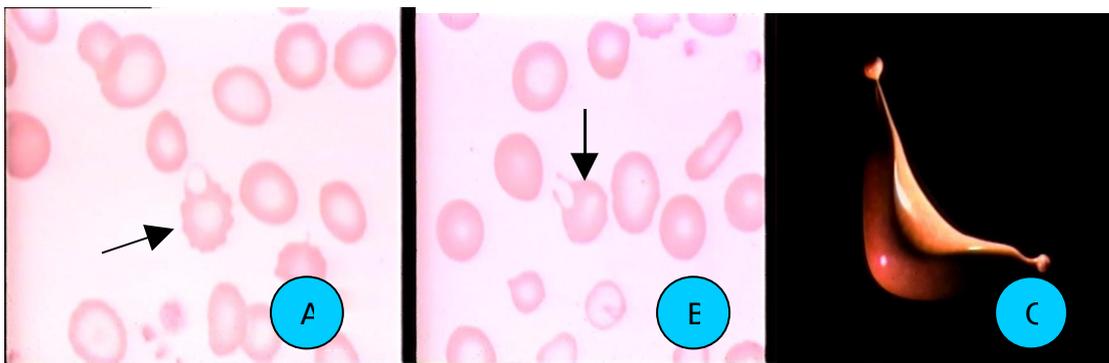


Figura 26. Se observa eritrocitos en forma de keratocitos. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. México.1997)

A,B **Keratocitos o eritrocitos en casco.-** Se observa predominio de eritrocitos con dos proyecciones en forma de especulas o de casco. C Se observa en tercera dimensión.

Se puede observar en uremia, hemólisis por valvulopatía cardíaca, anemia hemolítica.¹²

Esquizocito

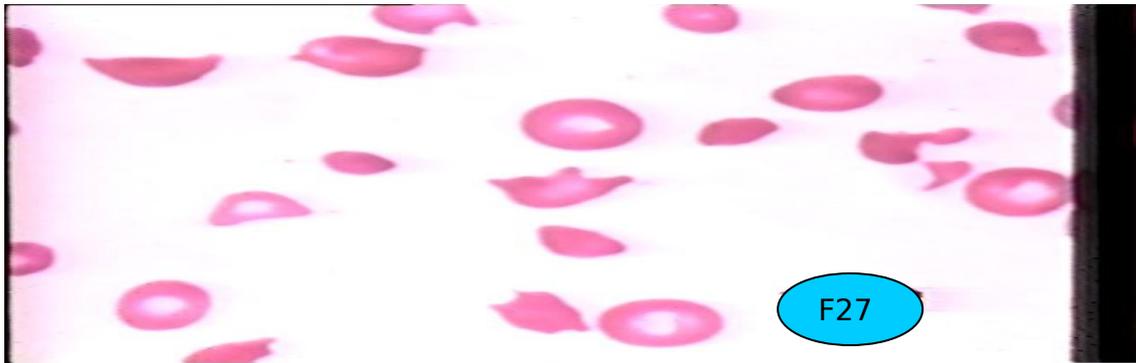


Figura 27. Se observan eritrocitos fragmentados de 2 a 3 micras (esquizocitos) (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. México. 1997)

Estas células son microcíticas e hipercromicas. Se producen por fragmentacion mecánica de eritrocitos normales y se encuentran en:

Anemias hemolíticas microangiopáticas

Anemias hemolíticas por prótesis de valvular cardiacas o por válvulas calcificadas.

Hemoglobinuria de la marcha y sus variantes.

El primer grupo corresponde a enfermedades en las que existe trombosis de la microcirculación, los filamentos de fibrina de los trombos más laxos “cortan a los eritrocitos que pasan entre ellos.

El segundo grupo las parte mecánicas duras de la prótesis o las zonas calcificadas de las válvulas, destruyen a los eritrocitos al chocar sobre ellos.

El tercer grupo corresponde a sujetos que tienen hemólisis intravascular durante caminatas largas, debido a la fragmentación de eritrocitos en vasos plantares, estos pacientes literalmente pisan con glóbulos rojos. Los nuevos tipos de zapatos acojinados protegen de este fenómeno. Se ha visto una alteración similar en algunos sujetos que realizan ejercicios de karate, por los golpes de la mano. ^{19,20}

Acantocitos

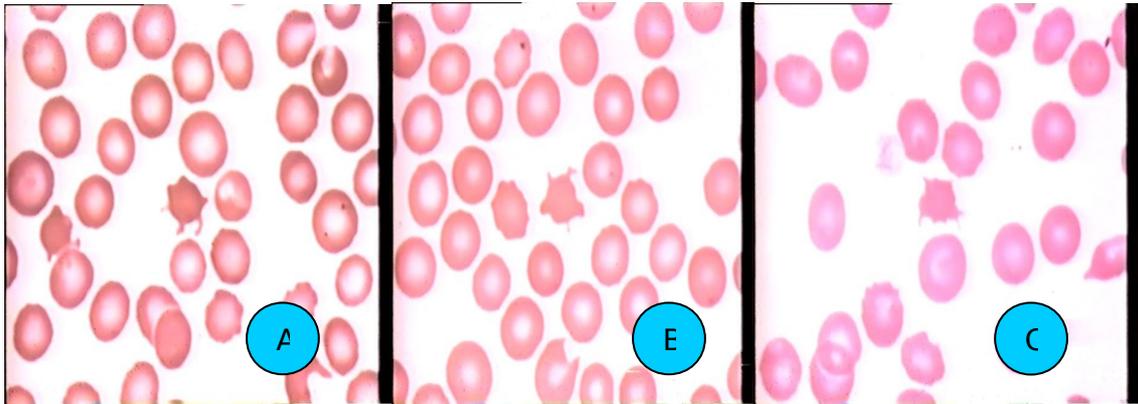


Figura 28. Se observa eritrocitos en forma de acantocitos. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

A, B, C Acantocitos se observan predominio de eritrocitos con espículas de diferentes longitudes en su superficie

El defecto molecular consiste en un aumento de lípidos en la hemicapa externa de la bicapa lipídica de la membrana, al tener la hemicapa externa más superficie que la interna, la membrana se deforma. Este cambio de forma acontece por la transferencia de colesterol no esterificado a la membrana del eritrocito. Incorporación de colesterol no esterificado a la hemicapa externa (deficiencia de LCAT lecitin-colesterol acil transferasa, produce rigidez y hemólisis.^{12,21}

ESTADOS PATOLÓGICOS:

Abetalipoproteinemia, Cirrosis hepática, Trastornos del metabolismo de lípidos, Posesplenectomía, anemias hemolíticas, cirrosis cardíaca, colestasis infantil.¹⁹

Dacriocitos

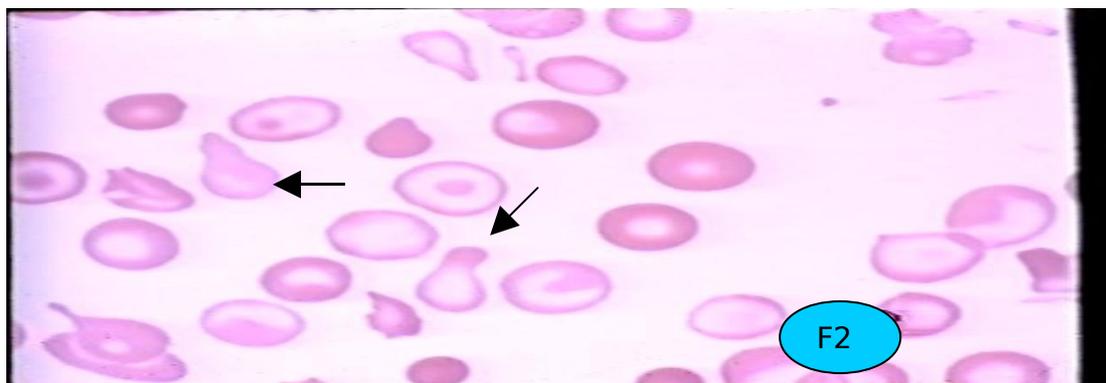


Figura 29. Se observa eritrocitos en forma de Dacriocitos. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. México.1997)

Se observa predominio de eritrocitos con una proyección alargada en un polo con de forma de una pera o lagrима.

Esta forma se debe a que inicialmente el eritrocito tenia inclusiones (cuerpos de Heinz ya que estos se encuentran en la periferia del eritrocito) y por el intento de pasar por el filtro capilar del bazo este se estiró dejando esa parte alargada.

Patología: Enfermedades: hemoglobinopatías (por los cuerpos de Heinz que son precipitados de Hb, que su exclusión provocó la forma de lágrima del eritrocito).^{6,12}

Esferocitos

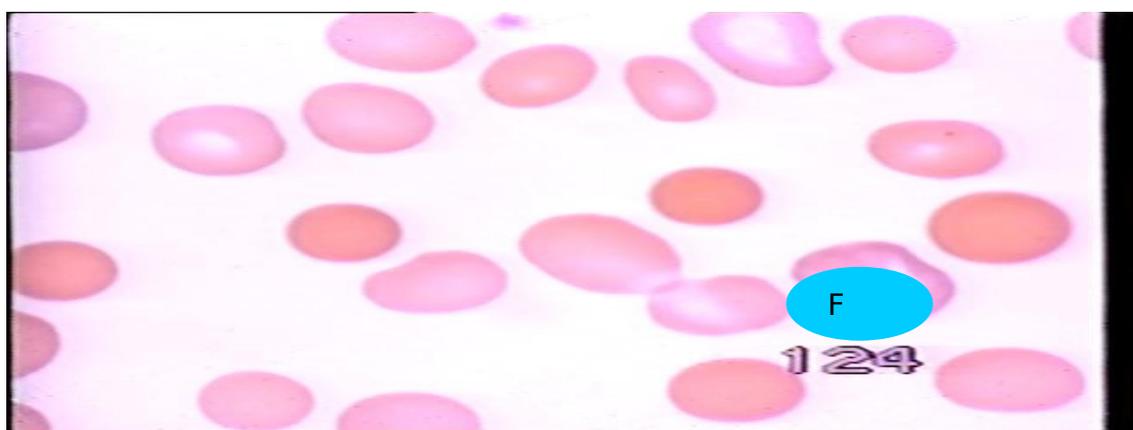


Figura 30. Se observa eritrocitos en forma de Esferocitos. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. México.1997)

Se observa predominio de eritrocitos de forma esferica sin aclaración central.

Son eritrocitos esféricos hiperocrómicos (con alta coloración), se debe a que el esferocito reduce el área de su membrana plasmática concentrando la hemoglobina que se encuentra en su interior coloreándose más el hematíe. La formación de esferocitos se debe a una deficiencia en las proteínas verticales de la membrana plasmática del eritrocito como la banda 3 (principalmente), ankirina y glicoforina C. La banda 3 y la glicoforina C poseen los canales iónicos por lo que al haber daño en éstas se permite el paso incontrolado de iones dentro de la célula entrando también líquido para equilibrar el medio, por lo que la célula tiende a hincharse por eso también se ven células grandes (macroцитos redondos). La proteína ankirina se encarga principalmente de la unión de la espectrina con la proteína de la banda 3 y glicoforina C. ^{12,21}

Patología: Esferocitosis hereditaria, Anemia hemolítica extravascular.

- **Eliptocitos**

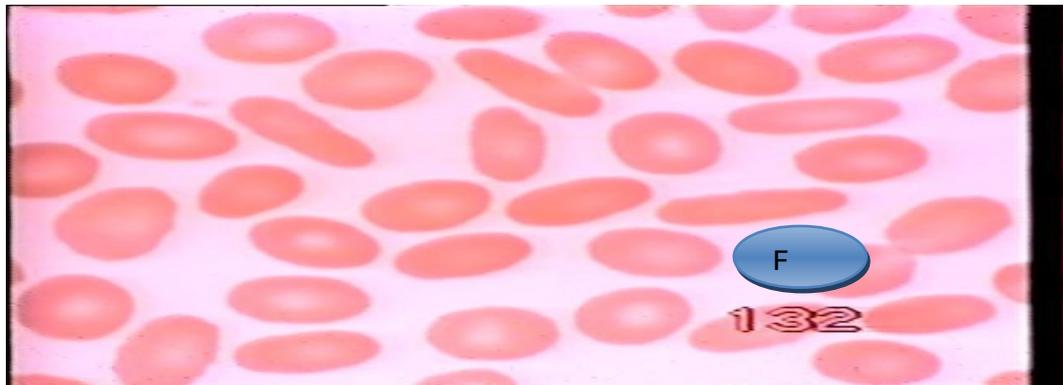


Figura 31. Se observa eritrocitos en forma de eliptocitos. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. 1997)

Eliptocitos.- se observa predominio de eritrocitos de forma eliptica. Eliptocitocis hereditaria. Se hereda como carácter autonómico dominante. Hematíes maduros de forma ovalada más o menos alargada con un centro pálido. La hemoglobina se concentra en los extremos, se debe a defectos en las cabezas α y β espectrina, deficiencia o defecto en banda 4.1. Proteínas integrales anormales (Glicoforina y proteínas de transporte de aniones banda

3) se presente defecto en las interacciones horizontales de proteína, producen inestabilidad a la membrana y en la permeabilidad.^{6,12}

Patología: Enfermedades: anemia megaloblástica y por deficiencia de hierro.

Se acompaña de reticulocitos, fragilidad osmótica.

Drepanocitos

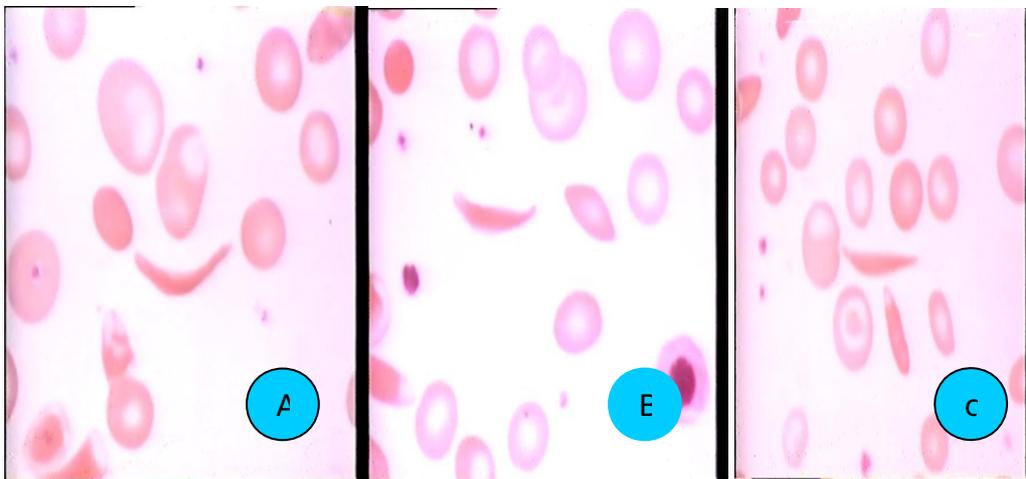


Figura 32. Se observa eritrocitos en forma de Drepanocitos. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. México.1997)

En A,B,C, se observa casos de anemia drepanocítica los eritrocitos exhiben una forma semilunar.

Drepanocitos.- Se observa predominio de eritrocitos en forma falciforme y varias formas de hoz media luna o bote. Eritrocito que contiene HbS polimerizada que muestra varias formas: falciforme, media luna o forma de barco.^{3,12}

Patología: Anemia drepanocítica.

Estomatocitos

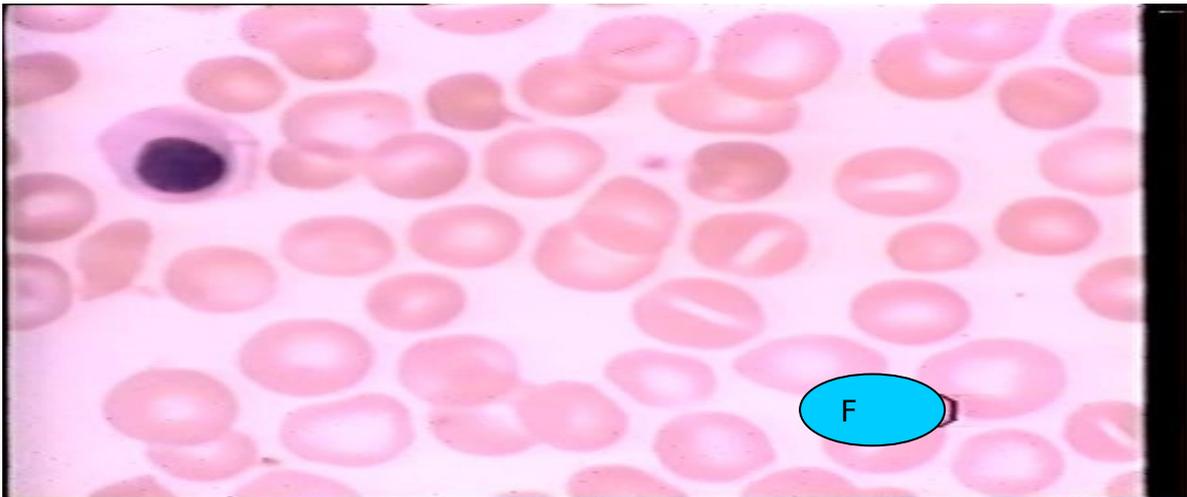


Figura 33 .Se observa eritrocitos en forma de estomatocitos. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. México.1997)

Estomatocitos.- se observa predominio de eritrocitos que en su región central clara poseen una hendidura en forma de boca. Son células con aspecto de estoma, o como si tuviera una boca, tridimensionalmente se observa como tazón. Se debe a defectos en la producción de la estomatina haciendo permeable la célula al sodio y por lo tanto al aumento de agua. Los eritrocitos poseen 10 veces más de sodio y menos de la mitad de la concentración de potasio.^{12,21}

Patología: Se presenta en: estomatocitosis hereditaria, cirrosis hepática y carcinomas.

Codocitos (células diana)

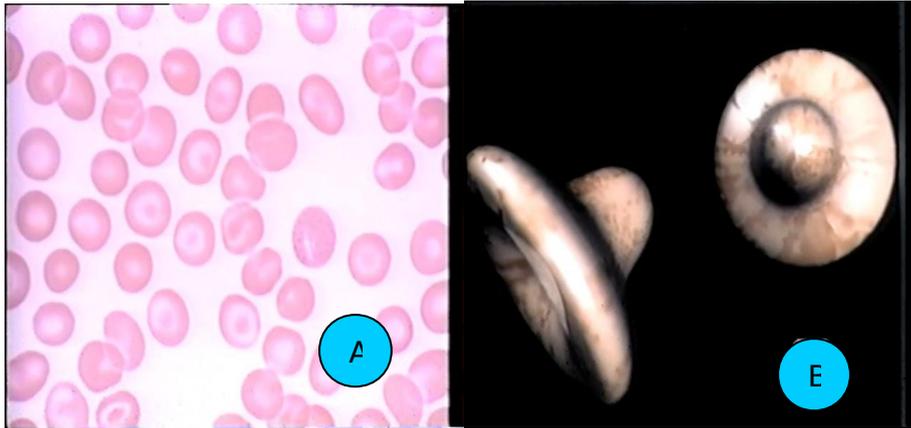


Figura 34. Se observa eritrocitos en forma de Codocitos. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. México. 1997)

. A.- Observación de eritrocitos en forma de codocitos en frotis de tinción de Wright. B se codocito en tercera dimensión

- Eritrocito de forma anormal la célula se presenta como un blanco de tiro con una masa central de hemoglobina que forma un ojo de buey rodeado por un anillo exterior de hemoglobina la fragilidad osmótica de esta célula está disminuida también se le conoce como célula blanco o célula en sombrero mexicano. Se presentan por Deficiencia LCAT (lecitin-colesterol acil transferasa), y produce aumento de lípidos y colesterol en la membrana) o por un exceso de cadenas alfa por deficiencia de cadenas beta (hay precipitación de la Hb en el centro de la célula) ^{2,6,12}

Patología: Hemoglobinopatías, talasemias, anemia por deficiencia de hierro, esplenectomía, enfermedades renales, deficiencia de LCAT.¹⁹

Roleaux
(eritrocitos en pila de monedas)

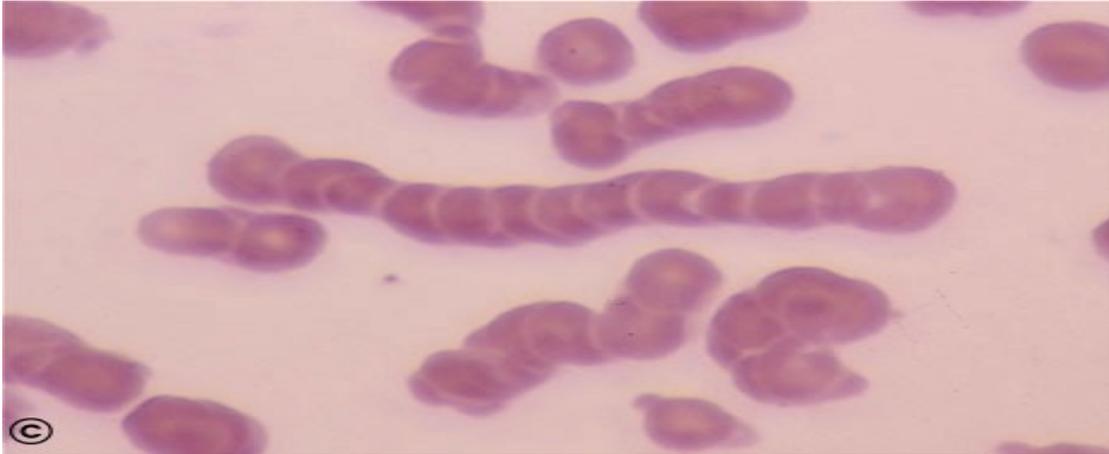


Figura 35. Se observa eritrocitos en forma en pila de monedas. (Tomada McDonald GA, Paul J, Cruickshank B. Atlas de hematología.1998)

Los eritrocitos que se encuentran encimados formando pilas de monedas indican que han perdido la carga negativa de su membrana plasmática, por lo que dejan de repelerse unas de otras al haber una concentración elevada de proteínas en sangre periférica, lo que impide que el ácido ciálico contenido en la glicoforina C de la membrana del eritrocito actúe en la repulsión de cargas.^{12,22}

Patología: mieloma múltiple¹²

El reporte de estas alteración es escribir el predominio de la forma observada y de acuerdo a la cantidad encontrada de escriben cruces.

Ejemplo: + escasas, ++ moderadas, +++ abundantes

Alteraciones en el eritrocito por concentración de hemoglobina.

Hipocromia

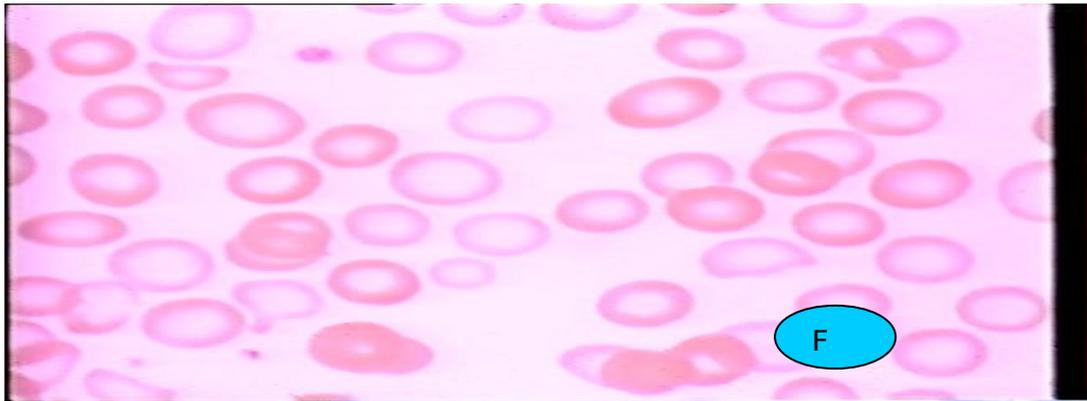


Figura 36. Se observa eritrocitos con hipocromia. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. México.1997)

Frotis de wright se observa eritrocitos que contienen menos cantidad de hemoglobina y s Se observa eritrocitos en forma de Esferocitos e tiñen débilmente.^{2,6}

Se observan en anemias hipocromicas.

Policromasia.



Figura 37. Se observa eritrocitos con policromasia. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. México.1997)

Frotis de Wright se observa el eritrocito del centro con policrmasia.

Se observa predominio de eritrocitos jóvenes que se contienen parte de material basofilo y se tiñen de color gris generalmente se observa en recién nacido.^{6,12}

El reporte de estas alteración observada y de acuerdo a la cantidad hemoglobina encontrada en el eritrocito encontrada de escriben cruces. Ejemplo: + escasas, ++ moderadas, +++ abundantes

En ocasiones los eritrocitos pueden presentar inclusiones de naturaleza diversa de acuerdo con el origen de las misma, en el cuadro 5 de describen las de mayor interés

Cuadro 5. Inclusiones que se puede observar en el eritrocito.

Anomalía	Descripción	Asociación patológica	Colorante	Tipo de colorante
Cuerpos de Howe-jolly	Se observan dentro de eritrocito corpúsculos redondos únicos o pueden ser múltiples de diámetro 1 micrómetro de color rojo violáceo.	Postesplectomia. Atrofia esplenica, anemias megaloblásticas	Wright	Policromático vital
Anillos de cabot	Se observan línea muy fina en forma de color rosado.	Indica trastorno profundo de la eritropoyesis.	Wright	Policromático vital
Cuerpos de pappenheimer	Se observa granulación azul negruzca	Sobre carga ferrica	Azul de Prusia	Supravital
Cuerpos de Heinz	Se observan esferulas azules	Hemoglobinopatías, talasemias, anemias hemolíticas,	Cristal violeta	Supravital
Siderocitos	Se observan granulos verdes	Postesplectomia, anemias aplásicas, hemolítica, sobre carga	Tinción de Perls	Supravital

		ferrica.		
Punteado basofilo	Se observan agrupaciones de color azul grisáceo.	Anemia hemolítica, saturnismos, síndromes mielodisplásicos.	Wright	Policromático vital

2,18

Inclusiones del eritrocito y su estructura al microscopio a 100 X

CUERPOS DE HOWELL-JOLLY

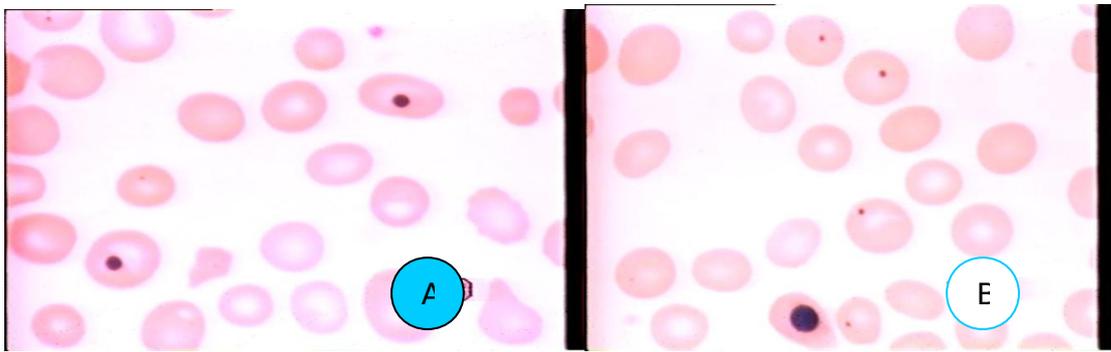


Figura 38. Se observa eritrocitos con cuerpos de Howell-Jolly. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. México.1997)

A, B Se observan cuerpos de Howell-Jolly en frotis de tinción de Wright. Se observan dentro de eritrocitos corpúsculos redondos únicos o pueden ser múltiples de diámetro 1 micrómetro de color rojo violáceo.

Los cuerpos de Howell-Jolly son pequeñas esférulas que se encuentran principalmente en la parte central del citoplasma del eritrocito, están compuestas de restos nucleares formados de DNA, por lo que se ven de color azul intenso cuando se tiñen con el colorante de Wright (azul de metileno colorante básico) su presencia indica una deficiencia en la división celular, esto se debe principalmente por la falta de vitamina B12 y ácido fólico necesarios para la síntesis de DNA. ^{12,21}

Patología: Anemia Megaloblástica.

Formación de anillos de Cabot

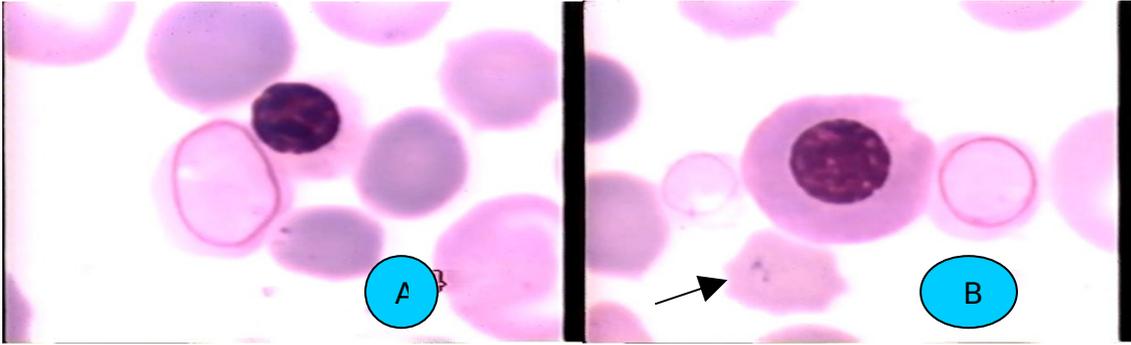


Figura 39. Se observa eritrocitos con anillos de cabot. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. 1997)

A,B frotis con tinción de Wright. Se observa eritrocitos con formación de anillos de cabot. En la imagen B se observa además fragmentación del anillo dando lugar a punteado azurófilo, que tiene el mismo significado que un anillo de Cabot.

Son restos de fibra de husos que se forman durante la mitosis y se debe a deficiencias en la maduración celular con la persistencia del huso cromático de la división celular. Cuando los eritroblastos pierden el núcleo, el filamento permanece en el citoplasma y sus extremos se unen formándose un anillo.^{12,18}

Observan en esplenectomía y en ocasiones en anemia megaloblástica y leucemia.^{12,18}

Cuerpos de Pappenheimer sobre carga ferrica en anemias sideroblástica

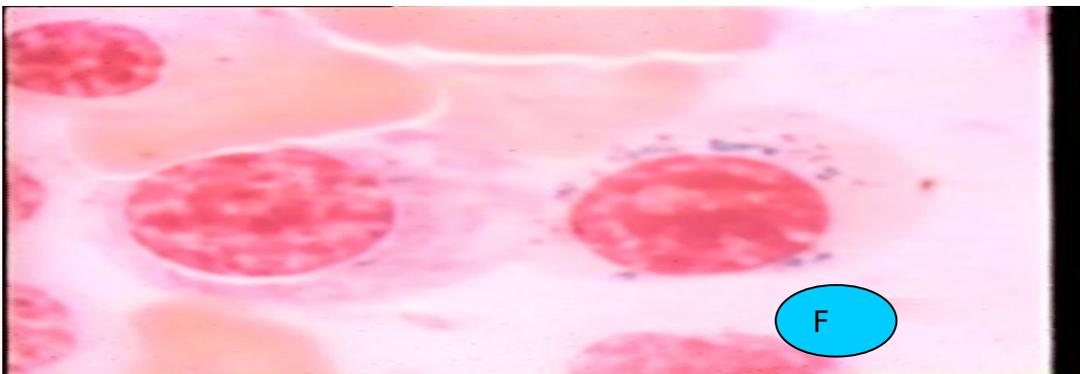


Figura 40. Frotis con tinción de perls. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

Eritrocitos que se observan con granulación azul negruzca indica sobre carga ferrica. el hierro, en lugar de estar situado en el citoplasma como ferritina, se acumula en el interior de las mitocondrias en forma de micelas ferruginosas que pueden ser vistas como anillos alrededor del núcleo. Cuando la ferritina no es usada rápidamente por el eritrocito, se agrega y forma hemosiderina; por tanto, ésta representa un abastecimiento de Fe al normoblasto o una anomalía en el uso de este elemento por la célula. Patología. Anemia sideroblastica.^{12,18}

Cuerpos de Heinz:

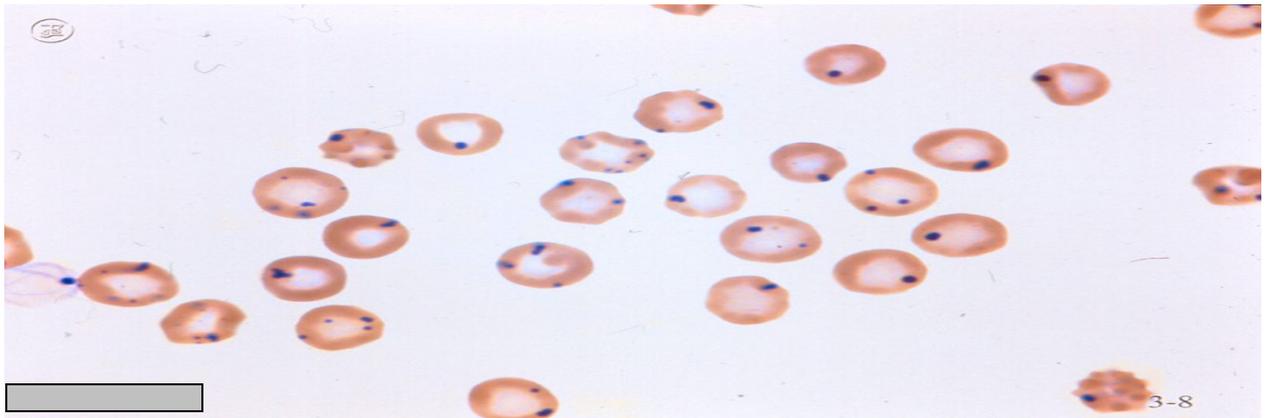


Figura 41. Frotis con tinción de cristal violeta se observan cuerpos de Heinz se observan esferulas azules. (Tomada de McDonald GA, Paul J, Cruickshank B. Atlas de hematología. 1998.

Se deben a la polimerización y desnaturalización de moléculas de hemoglobina.

Patología: Hemoglobinopatías, talasemias, anemias hemolíticas, deficiencia de 6-G-PD.^{12,18}

Punteado basófilo

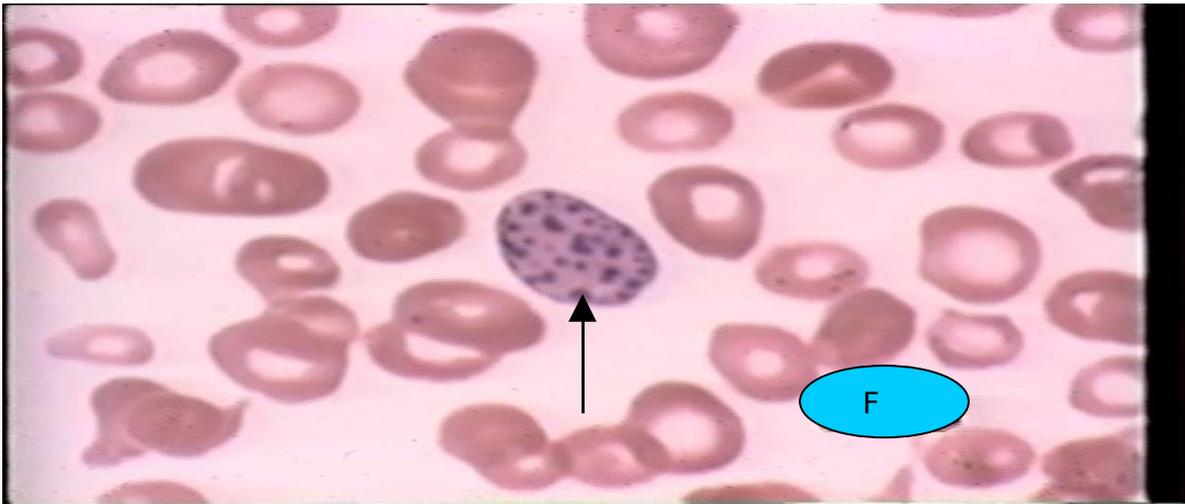


Figura 42. Frotis con tinción de Wright se observa punteado basófilo en el eritrocito. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

Son restos de RNA y ribosomas que se aglutinan formando puntos de color azul grisáceo. Su presencia indica una maduración precoz de las células. Los puntos se observan con una distribución citoplasmática homogénea.

Patología: Se presenta en : anemia hemolítica, saturnismo, carcinomas, síndrome mielodisplásico, leucemias, en déficit de piridín-5-nucleotidasa y talasemias.^{18,21}

Alteraciones que se pueden encontrar en leucocito neutrófilos (segmentados)

Los **leucocitos** o **glóbulos blancos** son células que están principalmente en la sangre y circulan por ella con la función de combatir las infecciones o cuerpos extraños

La modificación de la cantidad de leucocitos puede orientar al diagnóstico de enfermedades infecciosas, inflamatorias, cáncer y leucemias, y otros procesos. Por ello el recuento es muy orientativo en diferentes enfermedades. Además el porcentaje de cada grupo de leucocitos nos ofrecerá una mayor información para precisar un diagnóstico a continuación en el cuadro 6 se menciona las alteraciones morfológicas que se pueden presentar y su posible patología

Cuadro 6. Alteraciones en leucocito neutrófilos (segmentados)

Anomalía	Descripción a observar	Asociación a una patología
Cel. De pelger-huet	El leucocito presenta ausencia de	Anomalía congénita, enfermedades

	segmentación, se observa en forma de banda o 2 segmentados	infecciosas, anemia aplásica, anemia perniciosa, síndrome mielodisplásico y mieloproliferativo y crónico, leucemia mieloblástica.
Núcleos en anillo	Hay una hipersegmentación nuclear con un gran agujero central (forma de dona)	síndrome mielodisplásico y mieloproliferativo, leucemias agudas, alcoholismo crónico, mononucleosis
Hipersegmentación nuclear	Polinucleares con 4 o más segmentados	Anemias megaloblásticas, renales y ferropénicas
Pleocariocito	Hipersegmentación nuclear mas gigantismo celular	Anemias megaloblásticas

2,6,12,18

Alteraciones que se pueden encontrar en leucocito neutrófilos (segmentados) con su estructura a observar.

Pelger-Huët

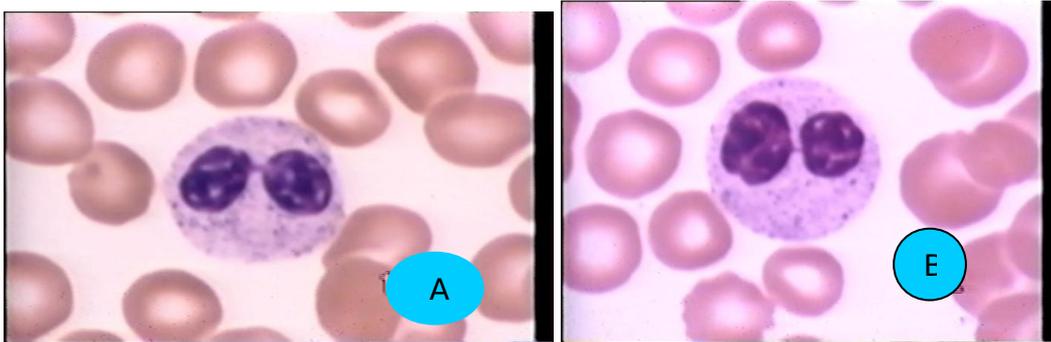


Figura 43. Se observan leucocitos con forma de Pelger-Huët. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

A,B Frotis con tinción de wright se observa anomalía hereditaria de Pelger-Huët muchos de los neutrófilos permanecen sin lobularse, como banda.

Normalmente los neutrófilos segmentados tienen de dos a cinco lóbulos, pero aún los bilobulados tienen segmentos de distinto tamaño y forma.

En anomalía Pelger-Huët_ los segmentos nucleares son simétricos, en forma de gafas. Se puede presentar por una variedad de herencia autosómica, normalmente heterocigota y asintomática, en la que el 98% de los granulocitos son binucleados o bandas. Cuando la ANOMALIA es hereditaria no debe confundirse con la desviación a la izquierda propia de las infecciones.^{12,18,21}

Neutrófilo multilobulado

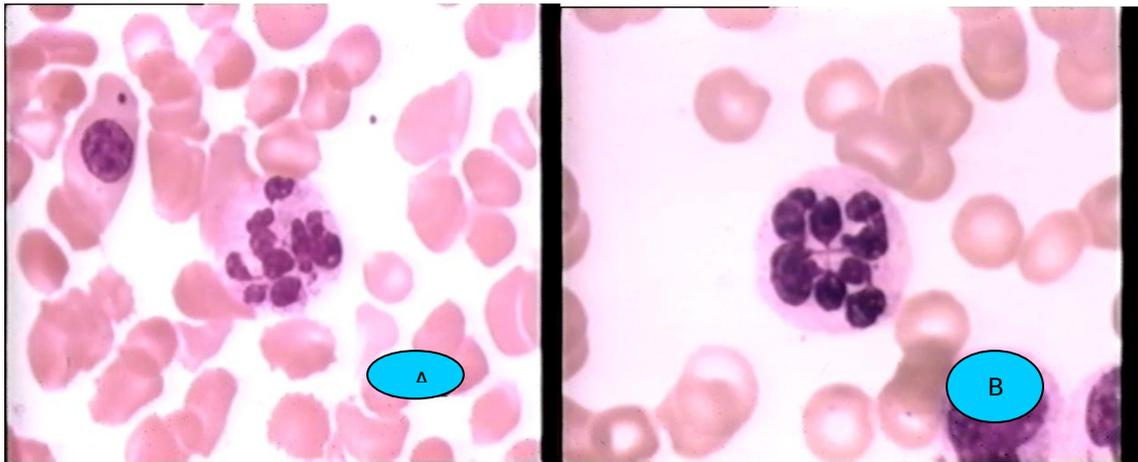


Figura 44. Se observa leucocitos en forma multilobulados. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

A, B Frotis de tinción de Wright se observa neutrófilos con núcleos multilobulados.

La multilobulación del núcleo de los neutrófilos es un dato precoz de megaloblastosis.

La presencia de más de cinco segmentos nucleares en un neutrófilo es anormal. En la mayor parte de estos casos existe una deficiencia de ácido fólico o de vitamina B 12, y es importante notar que este cambio puede preceder a la instalación de un cuadro anémico.

Patología: cuadro anémico, quimioterapia, neoplasias, enfermedad renal crónica, ocasional en anemia ferropénica.^{12,21}

Cuadro 7. Alteraciones que se pueden encontrar en leucocito neutrófilos (segmentados) en el citoplasma de la célula.

Anomalía	Descripción a observar	Asociación a una patología
Granulación toxica	Granulación primaria se tiñe de forma pronunciada	Infecciones, carcinomatosis generalizada, quemaduras.
Desgranulación	Neutrófilos sin granulación, aparece azulado y agranular	Indicativo de hemopatía grave, leucemias agudas mieloides, síndromes mielodisplásicos y crónicos.
Anomalía de Alder-Reilly	Granulación grosera color violeta (afecta a basofilo, eosinofilo, linfocito y monócito).	Suele asociarse a una mucopolisacaridosis

12,18

Alteraciones que se pueden encontrar en el leucocito neutrófilos (segmentados) en el citoplasma de la célula y su estructura a observar.

Granulacion toxica

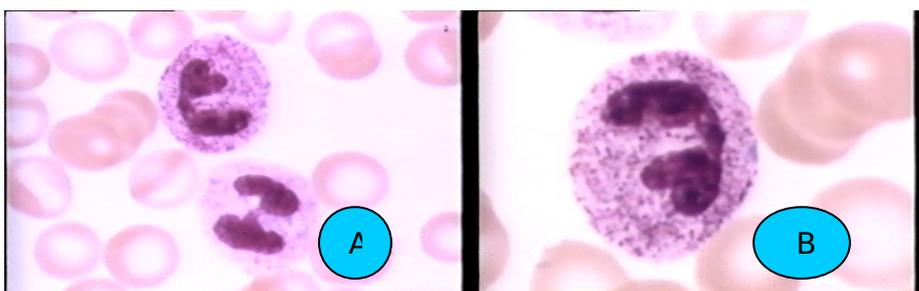


Figura 45. Frotis de tinción de wright se observa granulación de forma pronunciada en el citoplasma del leucocito. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

Se observan neutrofilos con numerosos gránulos azurofilos de color violeta, (lisosomas) que se presentan cuando hay un proceso infeccioso su tiempo de maduración se acorta y provoca translocación o secreción de sus gránulos (lisosomas) hacia el citoplasma de la célula blanco.^{12,18}

Neutrofilo con vacuolas.

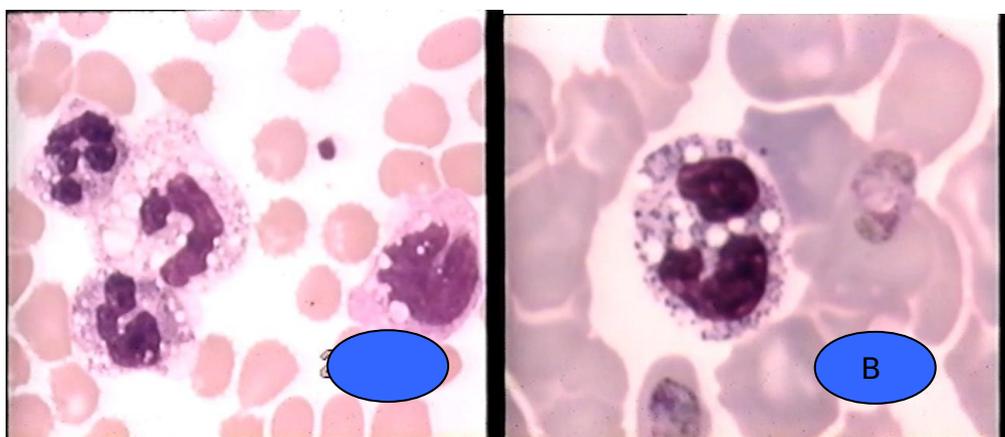


Figura 46. Frotis con tinción de wright se observa leucocitos segmentados con vacuolas. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

A.- Se observa 3 neutrofilos, un monocito con vacuolas, en infecciones severas por microorganismo al ser activados comienzan a fagocitar en la zona de infección en sangre si no esta el proceso infeccioso lo que fagocita es plasma.

B.- Neutrofilo con vacuolas.^{12,18}

Mucopolisacaridosis en neutrofilos

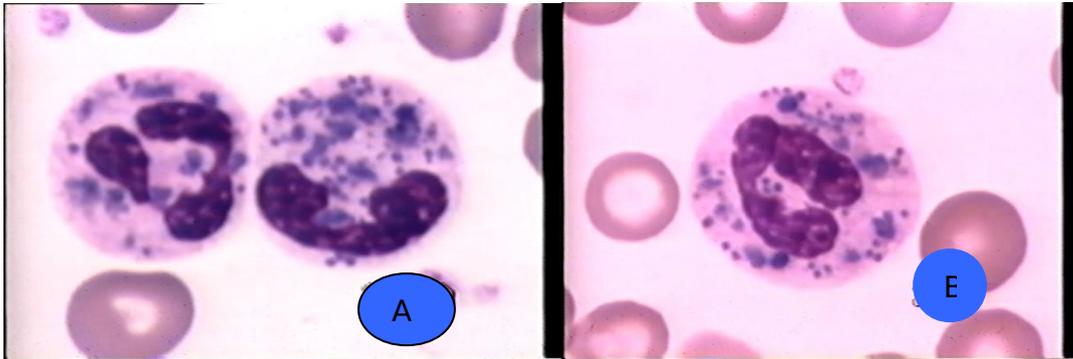


Figura 47. A, B frotis con tinción de wright que muestra neutrofilos con gránulos distribuidos irregulares en su citoplasma, que son los MPS. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

Grupo de enfermedades hereditarias caracterizadas por la deficiencia de enzimas que intervienen en la degradación de glicosaminoglicanos, producen una incapacidad para degradar los carbohidratos complejos (mucopolisacáridos) a moléculas más simples. La acumulación de estos mucopolisacáridos no degradados en las células son la causa de un gran número de síntomas y de anomalías físicas. Desde el punto de vista de los hallazgos de laboratorio, se presentan inclusiones de cuerpos de Alder-Reilly en los neutrófilos, eosinófilos y basófilos, y ocasionalmente en linfocitos y monocitos. Las plaquetas son anormalmente grandes.^{12,18,23}

Linfocitos activados

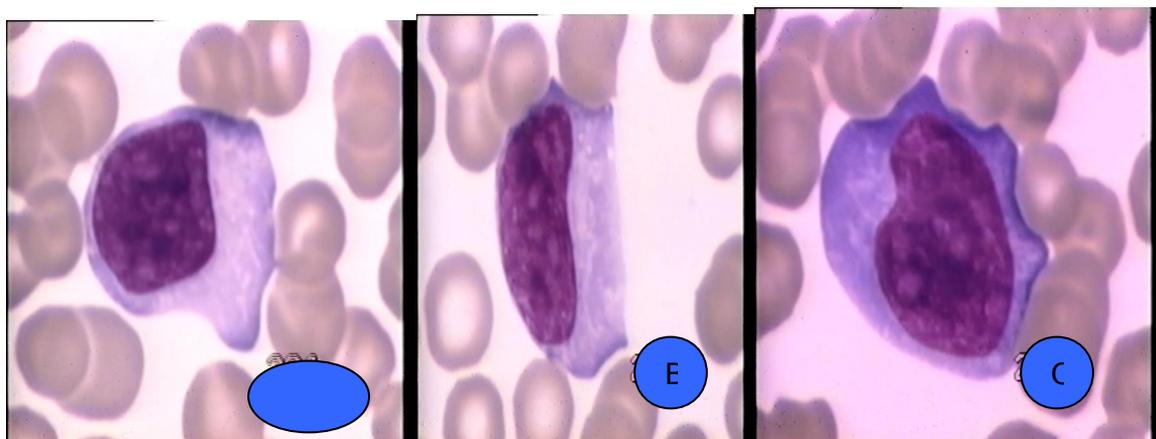


Figura 48. A, B, C. frotis de tinción de wright se observan linfocitos de tamaño grande con citoplasma abundante irregular y basofilia mas marcada en sus orillas. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

Característica que presentan cuando se encuentran activadas para la destrucción de células infectadas por virus o en células neoplásicas.²⁴

Leucemias

En la observación de un frotis sanguíneo es posible encontrar alteraciones morfológicas inmaduras que pueden corresponder algún tipo de leucemia. La presencia de blastos, ya sea de serie mieloide o linfoide, es muy sugestiva de leucemia aguda; los cuadros leucoblásticos /leucoeritroblásticos pueden acompañarse de blastos en sangre periférica. Por ejemplo, el observar células blásticas con cuerpos de Auer es diagnóstico de leucemia aguda de estirpe mieloide, sin embargo al observar estas células en un laboratorio de rutina por una tinción de Wright no es posible dar ningún resultado preciso, por lo que estos hallazgos obligan a efectuar una investigación hematológica detallada por un especialista en el área.^{2,6}

La clasificación de una leucemia linfoblástica se realiza por pruebas histoquímicas y por personal experto en el área, por lo que y el laboratorio no las lleva a cabo, haciéndose necesaria la revisión por un hematólogo. En caso de encontrar este tipo de alteraciones se debe reportar que “se observan células inmadura de tipo linfoblasto, que se sugiere el análisis y la revisión por un hematólogo”.

Las leucemias granulocítica agudas, mielomonocítica, eritroleucemia y la megacariocítica se dividen en siete, y al igual que las linfoblásticas, se requiere de pruebas histoquímicas y revisión de un hematólogo para su clasificación. El reporte es igual al anterior.^{2,6,12}

Células sanguíneas en fagocitosis

Neutrófilos en endocarditis bacteriana

El tipo agudo y suele ser provocada por estreptococos beta-hemolíticos, neumococos u otras bacterias, pueden depositarse sobre válvulas cardíacas normales o con deformaciones, produciéndola, la subaguda por es *Streptococcus viridans* en las válvulas cardíaca lesionadas por la fiebre reumática.²⁵

Se observan en pacientes con endocarditis bacterianas, trombos vasculares infectados o catéteres infectados.¹²

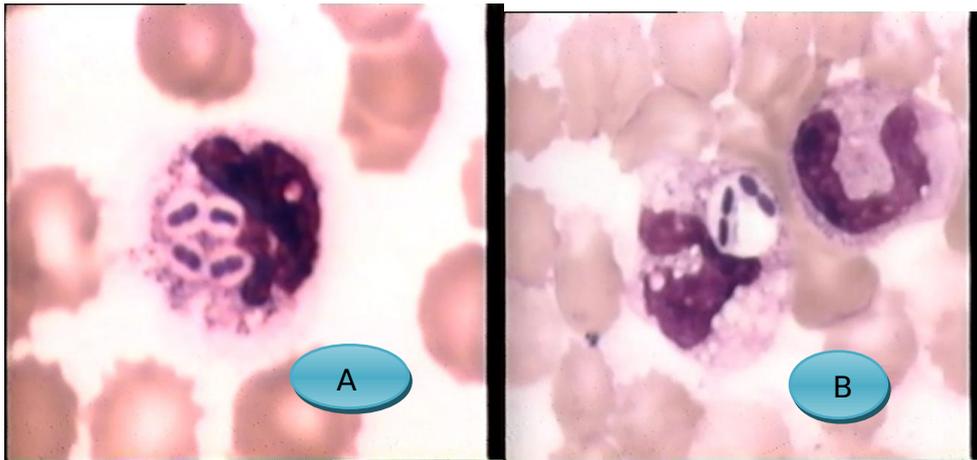


Figura 49. A, B Se observa neutrófilos que fagocitaron bacterias, en un proceso infeccioso por endocarditis bacteriana. (Tomada de Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología.1997)

Se muestran neutrófilos con bacterias fagocitadas; se distinguen de un contaminante porque se encuentran en el interior de “vacuolas” correspondientes a fagosomas.^{12,24}

COAGULACION

En esta área se procesa únicamente tiempo de protrombina (TP) y tiempo parcial de protombina (TPT), en el equipo STAR-4 con reactivo comercial de Roche.

Para la determinación de TP de los paciente se debe realiza una curva estándar en equipo START-4 con un unicalibrador comercial, con base en esta curva, el equipo calcula el % de coagulación que le corresponde a las muestras problemas, así como su INR.²⁵

Tiempo de protrombina (TP)

Esta prueba rastrea el sistema extrínseco de la coagulación, que incluye un activador tisular. Se prolonga cuando las concentraciones del factor VII disminuyen, así como en la vía común (factores X, V, protrombina y

fibrinógeno).²⁶ El tiempo que tarda normalmente el plasma en formar el coágulo por esta vía, es de 12 a 14 segundos.²⁷ La prolongación aislada de la prueba de detección selectiva refleja deficiencia del factor VII como un estado raro congénito o de un defecto de producción adquirido tempranamente en el cual los factores relacionados no presentan disminución significativa. Las pruebas del sistema extrínseco se usan para el control de dosis anticoagulantes todos ellos son inhibidores de la vitamina K (aVK) al impedir que ésta intervenga en la (gamma-) carboxilación de los factores II, VII, IX y X; y son la medida más sensible de la disminución de la síntesis en enfermedades hepáticas graves.²⁸

Esta prueba valora los factores de coagulación de la extrínseca como se muestra en la figura 51

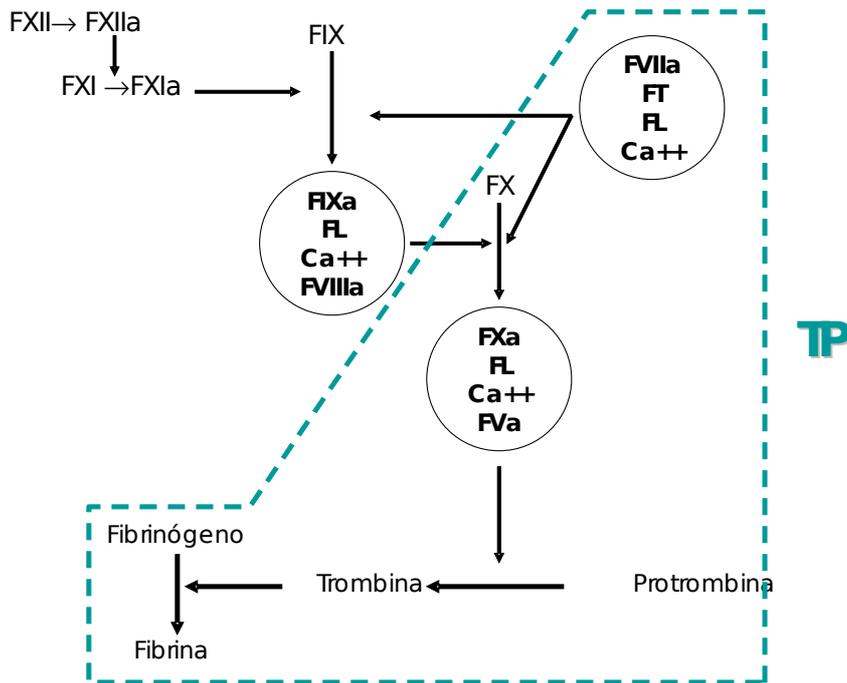


Figura 50. Ilustración de la vía extrínseca.⁶

Método de determinación

Fundamento: Mide el tiempo que tarda en aparecer la primera hebra de fibrina cuando se añade al plasma tromboplastina tisular. La velocidad de formación de fibrina depende de la concentración de los factores V, VII, X, protrombina y fibrinógeno.²

Procedimiento para llevar a cabo una curva de TP

Para el procedimiento de esta curva se requiera de cuatro puntos y se preparan como sigue:

Primer punto. Se utiliza un unicalibrador sin dilución, cuyo porcentaje el cual su (%) equivale al valor que indica el inserto, ejemplo 90 %, se coloca el unicalibrador directo en la copilla 0.050 mL , agregar 0.01 mL de Neoplastine.

Segundo punto. Diluir el unicalibrador 1:2, agregar 0.01 mL del calibrador mas 0.01 mL de diluyente amortiguador, colocar 0.050 mL de esta dilución mas 0.01 mL de Neoplastine. Siguiendo el ejemplo, este punto corresponde al 45%

Tercer punto. Del unicalibrador se realiza una dilución 1:3, agregar 0.01 mL mas 0.02 mL de diluyente amortiguador y colocar 0.050 mL de esta dilución mas 0.01 mL de Neoplastine, este punto corresponde al 30%.

Cuarto punto. Del unicalibrador se realiza una dilución 1:4, agregar 0.01 mL mas 0.03 mL de diluyente amortiguador y colocar 0.050 mL de esta dilución mas 0.01 mL de Neoplastine, este punto corresponde al 22.5 %

Todos estas pruebas se incuban por 120 segundos a 37°C y se realizan por duplicado, determinando el tiempo de TP. ²⁶

Ejemplo de resultados obtenidos:

Muestra	Tiempo	Porcentaje
Concentración total	13.6, 13.7	90%
Dilución 1:2	20.1, 19.6	45%
Dilución 1:3	25.9, 26.8	30%
Dilución 1:4	34.7, 34.3	22.5%

Los valores obtenidos de la curva se aceptan por ser los correctos por el incerto del proveedor y se ingresa estos valores a la pantalla de calibración. Los plasmas problemas se procesan y % de coagulación es estimado por esta curva.

Procedimiento para tiempo de protrombina :

La muestra recibida del paciente en tubo con anticoagulante de citrato de sodio se centrifuga a 3500 rpm por 10 minutos y se separa el plasma para su determinación de TP,TPT.

- 1) Realizar en equipo semiautomatizado en cubetas diferentes colocar un imán a cada una, agregar 0.050 mL de plasma en una cubeta, en incubar por 60 segundo a 37 °C.

- 2) Agregar a la muestra 0.010 reactivo Neoplastine Plus (TP) que contiene tromboplastina el cual esta incubado a 37°C por 60 segundos.
- 3) Enseguida presionar tecla que cuenta tiempo hasta la aparición de la fibrina, muestran esta contando el imán de mantiene en moviendo al momento de formar la fibrina este se detiene y aparece en la pantalla el valor del tiempo contado.²⁶

Valores de referencia: 11.0 a 13.0 segundos

Varía con el método que utilice cada laboratorio. El suero pool de muestra de población normal generalmente es de 12 segundos.^{3,6}

Valores aumentados:

Cirrosis, hepatitis, deficiencia de vitamina K, intoxicación por salicilatos, obstrucción del conducto biliar, ingestión de cumarina, coagulación intravascular disemina (CID)

Valores disminuidos:

Ingesta de esteroides anabólicos, barbitúricos, estrógenos, vitaminas K, anticonceptivos.²⁷

Generalmente el resultado de TP se reporta en segundo, pero cuando el paciente esta en vigilancia de anticoagulantes orales con acenocumarol (Sintron) y warfarina ,pertenecen al grupo de los derivados cumarinicos que actúan inhibiendo la síntesis hepática de vitamina k dependiente de los factores II (PROTROMBINA), VII, IX ,y X de la de la coagulación y de la proteína C y su cofactor S el medico solicita el resultado en INR (radio internacional normalizado) este valor se calcula en base a:

Cociente Normalizado Internacional

Existen muchas tromboplastinas, tantas como casas comerciales y, muchas veces, más de una por casa comercial. Se fabrican de distinta forma, pueden ser de extracto tisular o recombinantes, pueden tener distinto origen animal

(conejo, buey, humana), y, en el caso de ser humana, puede ser de cerebro o de placenta. La Organización Mundial de la Salud ha desarrollado una tromboplastina de referencia basada en preparados de tejido de cerebro humano, que se denomina como estándar, recomendando que todos los preparados comerciales se ajusten a ese patrón, dándoles un valor denominado ISI (Índice Internacional de Sensibilidad) y es diferente para cada reactivo.^{2,3,6}

El ISI servirá para calcular el cociente normalizado internacional (INR) a partir del tiempo de protrombina (TP), y el INR es el parámetro que se utiliza para verificar el nivel de anticoagulación del paciente.

Se cálculo con la siguiente formula:

$$INR = \frac{TP \text{ del paciente}}{TP \text{ de referncia normal}} \quad ISI$$

Indice internacional de sensibilidad (ISI) este valor varia dependiendo del fabricante del reactivo.²⁸ el utilizado es S Neoplastine Plus (TP)= 1.26.

En este equipo Start reporta el resultado del tiempo de la muestra, el % que le corresponde y su INR que es calculado de acuerdo a una curva de calibración que se le pasa al equipo.

VALORES DEL INR

1.0 a 2.5 Profilaxias de trombosis venosa profunda.

2.0 a 3.0 Tratamiento de trombosis venosa profunda; tromboembolia pulmonar, infarto del miocárdio.

3.0 a 4.5 Tratamientos de recurrencias de trombosis venosa profunda; tromboembolia pulmonar; injertos vasculares; válvulas cardíacas artificiales.⁹

TPT (tiempo parcial de promboplastina) reactivo de Roche

El TPT mide factores de coagulación intrínseco, (XII, XI, IX y VII), y factores de la via común. El termino "tromboplastina parcial" se refiorea a la adición de fosfolipidos sin factor tisular. También se refiere a un TPT "activado" para iniciar la adición de un contacto activo, con superficie de carga negativa como el caolín o el acido elágico. El proceso de coagulación en esta vía se desencadena cuando la sangre entra en contacto con una superficie "extraña", es decir, diferente al endotelio vascular.

En el caso de una lesión vascular, la membrana basal del endotelio o las fibras colágenas del tejido conectivo, proporcionan el punto de iniciación.

En general las superficies polianiónicas (cargadas negativamente) pueden cumplir el mismo papel, tanto materiales orgánicos como la celulosa, o no orgánicos como el vidrio, el caolín o algunas resinas pueden actuar como desencadenantes de la reacción.^{29,30}

Fundamento:

Mide el lapso que tarda en formarse la fibrina cuando se añade cefalina (sustituto plaquetario factor 3) y suspensión de caolín (activador) a la muestra de plasma se incuba provocando la activación por contacto de los factores XII y XI. Se adiciona cloruro calcio que pone en marcha la activación del sistema endógeno (intrínseco) de coagulación hasta la formación de fibrina. Mide en la cascada de coagulación los siguientes factores: vía intrínseca XII, XI, IX, VIII, X, II, I, V.^{2,6}

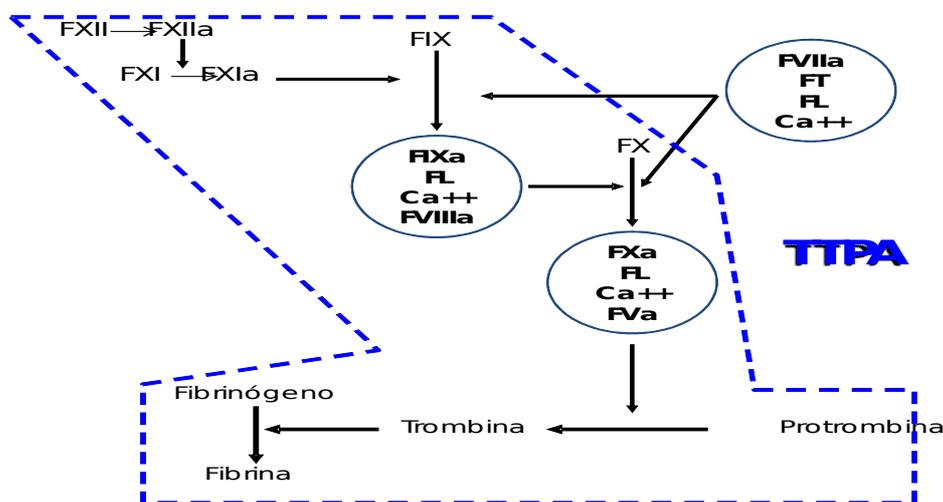


Figura 51. Ilustración de la vía intrínseca.⁶

Procedimiento para tiempo de TPT (tiempo parcial de tromboplastina)

- 1) Se realiza en equipo semi-automatizado, agregar 0.050 mL de plasma en una cubeta, a la misma cubeta agregar 0.050 reactivo que contiene tromboplastina, incubar 180 segundos a 37 °C (el tiempo es crítico no de pasar ni ser menos)
- 2) Incubar calcio a 37 °C.
- 3) Al cubeta que contiene la muestra de plasma y reactivo agregar 0.05 ml de cloruro de calcio a 0.1 M, presiono tecla que cuenta tiempo hasta la aparición de la fibrina, muestran esta contando el imán de mantiene en moviendo al momento de formar la fibrina este se detiene y aparece en la pantalla el valor del tiempo contado.²⁶

El resultado se reporta en segundos.

Valores de referencia 20 a 40 segundos.

Valores aumentados:

Un tiempo prolongado de aPTT puede indicar:

- uso de **heparina** (o contaminación de la muestra);
- coagulación intravascular diseminada(CID)
- presencia de un **anticuerpo** antifosfolípidos (sobre todo en el **lupus anticoagulante**, una afección que paradójicamente aumenta la propensión a la **trombosis**);
- una deficiencia en un **factor de coagulación**, específica (por ejemplo, el FVIII en la **hemofilia** de tipo A) o general (por ejemplo, debido a la carencia en **vitamina K**).

Para distinguir entre estas causas posibles, se realizan tests de mezclado, en los que se mezcla el plasma del paciente (inicialmente en una dilución 50:50) con plasma normal. Si la anomalía no desaparece, se dice que la muestra contiene un "inhibidor" (bien heparina, anticuerpos antifosfolípidos o inhibidores específicos de los factores de coagulación). Si la anomalía se corrige, es más probable una deficiencia en un factor de coagulación, por ejemplo, deficiencias en el **factor VIII, IX, XI y XII**, en la vitamina K (que provocará una deficiencia en factores II, VII, IX y X, y por tanto simultáneamente un alargamiento del **tiempo de protrombina**) y más raramente en el **factor de von Willebrand** (si causan un descenso en los niveles del FVIII) pueden producir un incremento del aPTT que se corrige en los estudios de mezclado.^{2,3,6}

Valores disminuidos:

Estadios precoces de CID, Cáncer extenso.

Servicio de transfusiones.

El laboratorio no cuenta con banco de sangre y los productos que se reciben provienen del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, al recibir cualquier producto se debe registrar su entrada en libreta de transfusión, revisar su fecha de extracción. Caducidad, y que sea negativo a pruebas de infecto contagiosas (Sífilis, Hepatitis B: Antígeno de superficie, Hepatitis C, anticuerpos VIH, anticuerpos con antecedentes o proceder de zonas de riesgo, Brucelosis, Paludismo, Tripanosomiasis). En concentrado eritrocitarios que no presente hemólisis, lipemia.³⁰

.

En esta área se realizan las siguientes pruebas.

Determinación de grupo sanguíneo.

Los sistemas antigénicos considerados más importantes son el sistema ABO y el Sistema Rh. Estos son los sistemas comúnmente relacionados a las temidas reacciones de transfusiones hemolíticas. Reacciones contra antígenos eritrocitarios también pueden causar la *dolencia Hemolítica del recién nacido*, causada por el factor Rh+ del padre y del bebé y el Rh - de la madre (Eritroblastosis Fetal), cuya causa generalmente (no siempre) se asocia a diferencias antigénicas relacionadas al Sistema Rh.

Las transfusiones de sangre entre grupos incompatibles pueden provocar una reacción inmunológica que puede desembocar en hemólisis, anemia, fallo renal, shock, o muerte.

Determinación de grupo sanguíneo prueba directa. Los azúcares que ocupan la posición Terminal en las cadenas se han denominado azúcares inmunodominantes. La **N-acetilgalactosamina** es la azúcar responsable de la especificidad del **grupo A**.

La **D-galactosa** para el **grupo B**.

La **L-fucosa** de la sustancia **H**.^{30,31}

Siempre realizar grupo sanguíneo del receptor y donador por el método directo e inverso de la siguiente manera.

Fundamento: Se realiza por una reacción antígeno-anticuerpo empleando eritrocitos del paciente que presenta antígenos que son carbohidratos fijados en la membrana del eritrocitos como glicoproteínas, que van a formar aglutinación con anticuerpos comerciales de los antígenos presentes en el eritrocito.²

Procedimiento en tubo para grupo sanguíneo:

1. Desangre total del paciente que contiene anticoagulante EDTA tomar una alícuota de en un tubo de 12X75 mm y agregar 4 mL solución salina isotónica al 0.85 %.
2. Centrifugar a 3500 rpm durante 30 segundos.
3. Decantó el sobrenadante
4. Hacer dilución 5 % con solución salina isotónica al 0.85 % con eritrocitos lavados.

- De esta dilución agregar una gota a 4 tubos de 12X75 mm y agregar al primer tubo 1 gota de Anti-A, segundo tubo Anti-B, tercer tubo Anti-AB, cuarto tubo Anti-D.
- Centrifugo a 3500 r.p.m. por 30 segundos.
- Observar si hay presencia de aglutinación en los tubos interpretar los resultados.

Resultados

	Anti-A	Anti-B	Anti-AB		A cells	B cells	O cells
A							
B							
AB							
O							

Figura 52. Ilustración de aglutinación en grupos sanguíneos

En caso de que no aglutine el Anti-D se debe hacer prueba de Du directo.³⁰

Determinación de grupo sanguíneo a la inversa.

Fundamento:

Se realiza por una reacción antígeno-anticuerpo empleando suero del paciente que presenta anticuerpos que van a formar aglutinación con los antígenos presentes en el eritrocito. En esta prueba se busca presencia de anticuerpos en el paciente y no antígenos como el grupo normal de ahí nombre a la inversa.

Metodología.

- Centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos la muestra del paciente, sangre total si anticoagulante, separar el suero del paciente.
- Del suero del paciente agregar 2 gotas a 4 tubos de 13X75 mm.
- Al tubo 1 agregar 2 gotas de células tipificadas como grupo sanguíneo A.

4. Al tubo 2 agregar 2 gotas de células tipificadas como grupo sanguíneo B.
5. Al tubo 3 agregar 2 gotas de células tipificadas como grupo sanguíneo AB.
6. Mezclar suavemente y centrifugar a 3500 rpm por 30 segundos.

Observar si hay presencia de aglutinación en los tubos interpreto los resultados.

Resultados. Aglutinación en tubo No. 1 grupo B.

Aglutinación en tubo No. 2 grupo A.

Aglutinación en tubo No. 3 grupo O.

No aglutinación grupo sanguíneo AB.

Cuadro 8. Antígenos y anticuerpos presentes en grupo sanguíneos

Grupo sanguíneo	Genotipo	Antígenos(GR)	Anticuerpos (SUERO)	Prueba directa aglutina con GR (Ag)	Prueba indirecta aglutina con suero (Acs)
O	OO	NO HAY	ANTI-A, B.	NO HAY	A, B, AB
A	AO-AA	A	ANTI- B	ANT- A, AB	B
B	BO-BB	B	ANTI- A	ANTI- B, AB	A
AB	AB	A Y B	NO HAY	ANTI-	NO HAY

				A,B,AB.	
--	--	--	--	---------	--

30

EJEMPLO: Si un grupo es B por la prueba directa a la inversa debe aglutina en A que el anticuerpo que contiene en su suero.

En caso de haber discrepancia entre la prueba celular (GR) y la prueba serica (SUERO).

Cuando los resultados entre ambas pruebas no concuerdan, existe discrepancia y esta debe ser investigada. Si se trata de una unidad de sangre donada, esta debe conservarse aparte y no transfundir hasta que no se haya resuelto la discrepancia. Cuando la muestra de sangre es de un paciente que requiere la transfusión, puede ser tranfundido con glóbulos rojos del grupo O tomando una muestra suficiente para el estudio de la discrepancia.

Esta se discrepancia se puede presentar por:

- 1.- Errores técnicos
- 2.- Problemas inherentes a la células a su sistema inmunologico
- 3.- Problemas inherentes al suero presentar anticuerpos irregulares. ^{30,31}

Prueba de Coombs directa o de D^u

Prueba de Coombs directa: Permite establecer la presencia de globulinas o anticuerpos incompletos que se adhieren a los eritrocitos. También se utiliza para el estudio de ciertas anemias hemolíticas autoinmunes y en investigaciones de reacciones transfusionales y sensibilización por drogas. ³²

La prueba de coombs directa se usa para detecta autoanticuerpos frente a los hematíes que pueden cuasar daño celular. Muchas enfermedades (por ejemplo eritroblastosis fetal, linfomas, lupus eritematoso, infección por micoplasma, mononucleosis infecciosa) y fármacos por ejemplo quinidina se asocian con producción de estos autoanticuerpos que provocan anemia hemolítica. La producción de auto anticuerpos frente a los hematíes no se debe muchas veces a ninguna enfermedad, por lo que la anemia hemolítica resulta de denominada idiopática. ³⁰

Fundamento: Es una reacción de antígeno–anticuerpo se busca la presencia de antígeno D que se puede encontrar escasamente en la membrana del eritrocito y que no producen aglutinación visible en un medio salino, para que reaccionen requieren de Antisuero específico de tipo IgG como la inmunoglobulina en la que se encuentra presente el antígeno Rh se usa anti-globulina humana para que produzca una aglutinación visible del antígeno D.

Procedimiento:

La muestra empleada es sangre total con anticoagulante EDTA.

1. Preparar glóbulos rojos del paciente lavados al 5%.
2. Agregar a un tubo dos gotas de glóbulos rojos del paciente y dos gotas de suero de Coombs.
3. Centrifugar por 15 segundos a 3400 rpm
4. Examinar el tubo para observar si hay aglutinación, graduarla en cruces y anotar los resultados. .
5. Las pruebas negativas deben confirmarse con células control de Coombs. Al tubo de la prueba negativa se agrega 1 gota de células control de coombs. Mezclar, llevar a centrifugar por 15 segundos, leer y anotar los resultados.

Si la prueba con las células control de coombs es positiva demuestra que la técnica de lavado fue correcta y que el reactivo de anti-globulina tiene actividad anti IgG y por lo tanto la prueba es válida.

Interpretación de resultados

Valores de referencia negativo.

Para determinación de RH: Si hay aglutinación el resultado es RH negativo, D^u positivo. Si no hay aglutinación el resultado es RH negativo D^u negativo.

Prueba Positiva:

Anemia hemolítica autoinmune, reacción a la transfusión, eritroblastosis fetal, linfoma, lupus eritematoso, infecciones por micoplasma, mononucleosis infecciosa.³⁰

Para búsqueda de antígenos: Si la prueba presenta aglutinación se interpreta como positiva. Esto significa que hubo sensibilización in vivo de los eritrocitos y se informa: Coombs directo positivo, señalando en cruces la intensidad de la reacción.

Si no hubo aglutinación la prueba es negativa y significa ausencia de sensibilización eritrocitaria. La prueba negativa será válida solamente si la prueba control de coombs es positiva y se informa: Coombs directo negativo.

30

- Si la prueba de control es negativa la prueba queda inválida y debe repetirse.

Células control de coombs: 4 gotas de anti D + 4 gotas de solución salina + 4 gotas de glóbulos rojos Grupo O Rh positivo. Incubar 1 hora a 37 ° C. Lavar 4 veces con solución salina. Reconstituir con 2ml de solución salina(29)

Interferencias: Ciertos fármacos pueden causar interferencias en la aplicación y obtención de resultados de esta técnica generando falsos positivos. Entre los más comunes tenemos los siguientes: Ampicilina , Anfotericina B , Bencilpenicilina , Clorpromacina, Clorpromamida, Etosuximida , Fenacetina , Fenilbutazona , Fenitoína , Hidralazina , Indometacina , Isoniazida , Levodopa , Metildopa , Quinidina , Quinina Rifampicina , Tolbutamina.²⁹

Prueba de Coombs indirecta.

Prueba de coombs indirecta: Esta prueba permite demostrar la presencia de anticuerpos incompletos en el plasma o suero del paciente. A través de ella se demuestra la sensibilización in vitro de los eritrocitos. Se utiliza para detectar anticuerpos que podrían atravesar la placenta y atacar las células del feto, causando la enfermedad hemolítica del recién nacido.

Se procesa siempre previamente a una transfusión de sangre y como seguimiento de una reacción transfusional.³⁰

Fundamento: se detecta la presencia de anticuerpos anti-D circulante en el suero del paciente por medio de una reacción antígeno- anticuerpo por medio de la observación de una aglutinación.

Procedimiento.

1. Preparar una suspensión de eritrocitos seleccionados del grupo O RH positivo al 5 % previamente lavado tres veces.
2. Depositar una gota de la suspensión de eritrocitos en tubo de 13 X75 mm.
3. Agregar una gota del suero del paciente.
4. Mezclar bien, centrifugar a 3400 rpm por 30 segundos.
5. Remover suavemente los eritrocitos sedimentados y observar si existe aglutinación macroscópica.
6. Si esta no se observa o es débil incubar a 37 °C durante 30 minutos.
7. Transcurrido el tiempo centrifugar el tubo a 3400 rpm por 30 segundos
8. Remover suavemente los eritrocitos sedimentados y observar si existe aglutinación macroscópica. Si la reacción es negativa o débil lavar los eritrocitos 3 veces con solución salina, en el último lavado decantar completamente el sobrenadante.
9. Al sedimento de eritrocitos en el tubo agregar 1 gota de Anti-gammaglobulina.
10. Mezclar bien y centrifugar para observar aglutinación macroscópica.
11. Determinar simultáneamente pruebas testigo positiva, negativa y un auto testigo.

Valores de referencia: negativo

Si la prueba de Coombs indirecta es positiva, existe uno o más tipos de anticuerpo.

Prueba postiva:

Incompatibilidad de la sangre del donante, anticuerpos anti-RH, anemias hemolítica adquirida, presencia de anticuerpos específicos, eritroblastosis fetal.³⁰

Pruebas cruzadas para concentrados eritrocitarios

- Se efectúa antes de transfundir la sangre para asegurarse de que los hematíes del donante son compatibles con el receptor
- Comprenden la determinación del grupo ABO y Rh del receptor así como el estudio de la presencia de anticuerpos irregulares en el suero.
- Si hay anticuerpos positivos es necesario identificarlos.

Será competencia del responsable del banco de sangre o del servicio de transfusión, realizar o garantizar que se hayan hecho las pruebas cruzadas, antes de cada transfusión de unidades alogénicas.³⁰

En todos los receptores se deberá determinar su grupo ABO y antígeno Rho (D), los receptores deberán recibir preferentemente sangre, concentrado de eritrocitos o plasma de su mismo grupo del sistema ABO. o bien, los podrán recibir de diferente grupo en el orden de preferencia que señala en la siguiente tabla. ³¹

Cuadro 9.ALTERNATIVAS DE TRANSFUSION EN ORDEN DE PREFERENCIA

GRUPO DEL RECEPTOR	CONCENTRADO DE ERITROCITOS O SANGRE			PLASMA		
	1	2	3	1	2	3
O	O	NINGUNO	NINGUNO	O	AB	A o B
A	A	O	NINGUNO	A	AB	O
B	B	O	NINGUNO	B	AB	O
AB	AB	B o A	O	AB	B o A	O

Tomado de NOM-003-SSA2-1993, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.

En los pacientes que van a recibir transfusión y sea Rh negativo y su Du positivo deben recibir sangre de tipo Rh negativa.

En caso que el donante fuera Rh negativo y Du positivo su sangre debe ser transfundida un receptor Rh positivo. ³⁰

Los plasmas, incluyendo el contenido en las unidades de concentrados de plaquetas o de leucocitos, se transfundirán de conformidad como lo indica la tabla anterior.

En enfermedad hemolítica del recién nacido que requiera exsanguineo transfusión, se deberá proceder como sigue:

- a) Cuando es por incompatibilidad ABO, se deberán utilizar eritrocitos de grupo O con plasma del mismo grupo ABO del neonato o con plasma del grupo AB;
- b) Si es por incompatibilidad Rho (D), se deberán utilizar eritrocitos Rho (D) negativos;
- c) Tratándose de incompatibilidad debida a otros sistemas antigénicos, se deberán utilizar eritrocitos carentes del antígeno responsable de la inmunización materna.

En casos de emergencia, los pacientes de grupo ABO desconocido, deberán recibir eritrocitos del grupo O

En sistemas cerrados, su vigencia máxima a partir de la recolección dependerá del anticoagulante empleado, con las variaciones siguientes:

- Heparina: 48 horas;
- ACD (dextrosa, ácido cítrico y citrato trisódico): 21 días;
- CPD (dextrosa, citrato trisódico, ácido cítrico, fosfato sódico): 21 días;
- CPDA (dextrosa, citrato trisódico, ácido cítrico, fosfato sódico y adenina): 35 días;
- CPDA con manitol (dextrosa, citrato trisódico, ácido cítrico, fosfato sódico, adenina y manitol): 45 días.^{33,34}

Fundamento: detecta anticuerpos en el suero del receptor (paciente) que estén dirigidos contra antígenos presentes en los glóbulos rojos del donante (concentrado eritrocitario). Determina compatibilidad serológica entre la sangre de un donante y un receptor, asegura que no va haber reacción hemolítica transfusional.

Metodología.

Las pruebas cruzadas incluirán pruebas de aglutinación en medio salino, así como, en algún medio facilitador de la reacción, rutinariamente se empleará la prueba de antiglobulina humana (prueba de Coombs), pudiéndose omitir cuando se tenga certeza que el receptor y el donante carezcan de antecedentes propiciadores de aloinmunización.

Las pruebas cruzadas deberán incluir un control que permita detectar la presencia de autoanticuerpos.

A manera de control del procedimiento y del reactivo, en cada prueba de Coombs interpretada como negativa, es recomendable agregar células sensibilizadas con inmunoglobulina G (control de antiglobulina humana

1. Centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos muestra de sangre total sin anticoagulante.
2. Separar el suero del paciente.
3. Cortar una prueba piloto del paquete de concentrados eritrocitarios y centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos.

Para cualquier unidad de sangre o componente sanguíneo en un sistema abierto, bajo condiciones de esterilidad, su vigencia máxima será:

- De 24 horas, si se conserva entre +1° y +6° C;

- De cuatro horas, si se conserva entre +20° y +24°.
- Se deberá dar destino final a las unidades de sangre o componentes sanguíneos cuyo sistema haya sido abierto en condiciones inciertas de esterilidad.³⁴

4. Separar la muestra del plasma del paquete globular (donador)
5. Preparar suspensión de eritrocitos al 5 % en solución salina previamente lavados del donador y del receptor.

Prueba salina o directa.

- **Prueba mayor:** agregar 2 gotas de eritrocitos del donador, y 2 gotas del suero del receptor mezclar suavemente.
- **Prueba menor:** agregar 2 gotas del plasma del donador (Concentrado eritrocitario) mezclar suavemente.
- **Autotestigo:** agregar 2 gotas de eritrocitos del receptor y 2 gotas de suero del receptor mezclar suavemente.
- Centrifugar a 3500 rpm por 30 segundos.
- Observar si existe hemólisis, remover suavemente los eritrocitos sedimentados y observar si existe aglutinación macroscópica.

En caso positivo hasta esta fase se termina la prueba, de ser negativo se continua con la siguiente fase.

Prueba de albúmina (eliminación del potencial Z)

- Agregar a los tubos 2 gotas de albúmina al 2 %.
- Mezclar e incubar a 37 °C por 30 minutos.
- Centrifugar a 3500 rpm por 30 segundos.
- Observar si existe hemólisis, remover suavemente los eritrocitos sedimentados y observar si existe aglutinación macroscópica.

En caso positivo hasta esta fase se termina la prueba, de ser negativo se continua con la siguiente fase.

Prueba de Coombs (suero antigamaglobulina humana IGg)

1. Realizar lavados con solución salina 0.85 % a los tubos 3 veces y escurrir sin perder eritrocitos.
2. Agregar a los tubos 2 gotas de suero antigamaglobulina humana
3. Mezclar e incubar a 37 °C por 30 minutos.
4. Centrifugar a 3500 rpm por 30 segundos.
5. Observar si existe hemólisis, remover suavemente los eritrocitos sedimentados y observar si existe aglutinación macroscópica.

Resultados: prueba **mayor negativa** (no se encontró presencia de hemólisis o aglutinación) si es compatible la sangre del donador con el receptor y se puede transfundir concentrado eritrocitario.

Si la **prueba mayor es positiva** (se encontró presencia de hemólisis o aglutinación) no es compatible la sangre del donador con la receptor.

Si la **prueba menor es negativa** (no se encontró presencia de hemólisis o aglutinación) si es compatible la plasma del donador con el receptor y se puede transfundir plasma.

Si la **prueba menor es positiva** (se encontró presencia de hemólisis o aglutinación) no es compatible el plasma del donador con la receptor.

El auto testigo debe ser negativo y sirve de control negativo.^{32, 33}

Para la transfusión de unidades de sangre, concentrados de eritrocitos, plasmas y crioprecipitados, se deberán utilizar equipos con filtro, estériles y libres de pirógenos, capaces de retener microagregados, los que se emplearán individualmente y se desecharán en el momento que ocurra cualquiera de las dos circunstancias siguientes:

- Cuando tengan seis horas de uso;
- Al haber transfundido cuatro unidades.

El plasma congelado y el crioprecipitado previamente a su transfusión, deberán ser sometidos a una temperatura de +30° a +37° C hasta su descongelamiento y su transfusión deberá ser completada dentro de las seis horas siguientes al descongelamiento

Es recomendable irradiar las unidades de sangre y de componentes sanguíneos celulares, con una dosis mínima de 1,500 cGy (centiGray) o (1,500 rads) para reducir el riesgo de enfermedad injerto contra huésped, en los receptores que se encuentren en los casos siguientes:

- a) Fetos receptores de transfusiones intrauterinas;

- b) Exsanguineotransfusión en prematuros y en recién nacidos de peso corporal inferior a 2,500 g;
- c) Pacientes seleccionados inmunocomprometidos;
- d) Receptores que han sido sometidos a trasplante de médula ósea;
- e) Receptores de unidades provenientes de familiares consanguíneos de primer grado.³⁴

Prueba cruzada para PFC (Plasma Fresco Congelado)

Metodología. Seguir la misma metodología para concentrado eritrocitario pero la prueba de mayor importancia es la menor ya que es la que determina si hay compatibilidad para transfundir plasma.³⁰

Pruebas de compatibilidad para transfundir plaquetas.

Este producto al ingresar al laboratorio lo debe mantener mezclando, colocar en mezclador mecánico de hematológica y se debe transfundir en no mas 8 horas que es el tiempo que se mantienen en buen estado a temperatura ambiente, después de este tiempo no se debe utilizar.

Fundamento: es una prueba de compatibilidad para asegurar que el receptor no presentara reacciones hemolíticas transfusional.

Hasta el momento no se ha podido demostrar satisfactoriamente en el laboratorio la presencia de los antígenos ABO en las plaquetas, por lo tanto estas pueden ser transfundidas indiferentemente en receptores ABO incompatibles. Sin embargo se ha demostrado que la recuperación de las plaquetas ABO incompatibles transfundidas fue significativamente menor que cuando se administraron plaquetas ABO compatibles. Otros autores han

demostrado que en pacientes con anticuerpos linfocitoxicos, la respuesta a la transfusión de plaquetas HLA compatibles no fue afectada por la incompatibilidad ABO. Hasta que estas inconsistencias no sean resueltas es **aconsejable transfundir en lo posible plaquetas ABO compatibles**, pero debe quedar claro que en cualquier caso en que estas no estén disponibles o en emergencias pueden usarse indiferentemente del grupo sanguíneo.^{30,31}

Metodología.

- Para la compatibilidad de esta prueba se realiza determinación de grupo sanguíneo, tanto del donador como del receptor.

Resultados. El donador como el receptor deben ser del mismo grupo para ser compatibles.

En caso de emergencia utilizar indiferente del grupo sanguíneo.

Pruebas de compatibilidad para transfundir crioprecipitados.

Debido al escaso volumen de plasma residual, no es necesaria la compatibilidad del sistema ABO, pero de preferencia transfundir del mismo grupo.

Para su uso se debe descongelar a 37 ° C, obteniéndose una solución blanquecina, lista para se transfundida. Una vez que el crioprecipitado se ha descongelado, debe mantenerse a la temperatura del laboratorio y ser administrado dentro de las seis horas siguientes. No se debe congelar.³⁰

Cada bolsa de crioprecipitado contiene aproximadamente:

80 a 100 unidades de factor VIII,

250 mg de fibrinogeno,

30% de factor XIII, 40 – 70 % de factor von Willebrand

El volumen de cada bolsa es de 10 a 15 mL, permitiendo el tratamiento adecuado de las deficiencias moderadas del factor VIII, sin el riesgo de sobrecargar la volemia del paciente.^{30,31}

Metodología.

- Para la compatibilidad de esta prueba se realiza determinación de grupo sanguíneo, tanto del donador como del receptor.

Resultados. El donador como el receptor debe ser del mismo grupo para ser compatibles.

Todas pruebas realizadas en este servicio se deben registrar en una libreta que tiene el formato de cada una de las pruebas, registrar nombre del paciente, diagnostico, edad, hb, servicio, datos del donador, prueba realizadas resultados.

Llenar un formato que indica si las pruebas fueron compatibles o no, datos del paciente, datos del donador, mis datos que determine las pruebas, este formato se entrega junto con el producto al medico o enfermera que solicite el producto y firma de recibido en la libreta de registro de productos de entrada.

ETAPA POSANALITICA

Llamamos fase posanalitica, a todos los procesos y actividades que siguen al acto propiamente analítico. Incluye una revisión sistemática de confirmación de resultados, puntualidad, confiabilidad, informe, bitácoras y almacenamientos de las muestras examinadas. A continuación se menciona cada una de estas etapas y su correcta ejecución para concluir con la entrega de resultados éxitos y confiables.

- Confirmación de resultados:

Muestra los resultados obtenidos y se especifican en el informe del laboratorio, al cual se llega, partiendo de que las fases preanalitica y analítica son realizadas con el rigor técnico y científico, exigido por un sistema de gestión de la calidad. Por tanto el resultado antes de ser liberado fue verificado y confirmado el valor obtenido.¹

- Puntualidad

La profesional a cargo del área de hematología debe asegurarse que las pruebas se realizan tan pronto como sea posible después que los especímenes han llegado al laboratorio, y el resultado llegue a las manos del médico oportunamente y pueda establecer un diagnóstico del paciente, y su médico tratante pueda darle la terapia adecuada a sus patologías identificadas.

- Confiabilidad

Las pruebas fueron procesadas técnicas estandarizadas, equipos adecuados bien calibrados y verificados, reactivos y consumibles de calidad garantizada, el verificar y controlar todos estos procesos garantiza su confiabilidad para la entrega de resultados con calidad y exactitud.^{1,6}

El personal de laboratorio clínico no podrá emitir opiniones ni sugerir interpretaciones sobre los resultados obtenidos, excepto al médico o laboratorio que solicite el servicio de referencia.³⁵

- Informe

El formato y configuración del informe de laboratorio debe contener los siguientes datos:

- Identificación del laboratorio con dirección y teléfono para cualquier consulta.
- Nombre del responsable del laboratorio
- Número de páginas y el total de páginas que consta el informe de laboratorio.
- Fecha de obtención de la muestra
- Fecha de impresión del informe
- El número de historia analítica o datos para recuperar informes anteriores. Numero y código de la muestra
- Nombre, apellidos del paciente y fecha de nacimiento,
- Identificación del método utilizado.¹

Presentación de los resultados.

Los resultados serán legible, sin errores de transcripción y reportados en la nomenclatura en que describen las magnitudes biológicas, espécimen y tipo de muestras. Es recomendable que se indique el procedimiento o método de medida, es importante indicarlo, cuando sea relevante o requerido para la interpretación del resultado. Los informes de resultados de los análisis deberán tener impresos los valores de referencia conforme a las técnicas empleadas, salvo en aquellos casos donde no se requiera.³³

Los valores de referencia, son un conjunto de valores de una magnitud medible, obtenidos de un grupo de individuos o de un individuo que se encuentra en una situación de salud definida. Los valores de referencia, se denominan valores de referencia de grupo o individuales respectivamente.

Es recomendable, que el laboratorio calcule los rangos de referencia para los diferentes análisis.

- Bitácoras

Una vez realizado el proceso de análisis, los resultados de cada una de las muestras procesadas se registran en bitácoras, quedan como un archivo disponible para el laboratorio, para manejo de datos estadísticos, o cualquier aclaración de resultado en caso de ser necesario. Se pueden incorporar otros comentarios, por ejemplo la calidad de la muestra que posibilitara un resultado desviado, usos de métodos, etc. Se pueden incorporar otros comentarios, por ejemplo la calidad de la muestra que posibilitara un resultado desviado, usos de métodos.

Cada uno de estos pasos de fase pre analítica requiere de procedimientos y decisiones cuidadosas para incrementar la calidad de los resultados y deben ser realizados con el rigor técnico y científico exigido por un sistema de gestión de la calidad.¹

ANEXO 1

VALIDACIÓN DEL MÉTODO MODIFICADO PARA CUANTIFICACIÓN DE LEUCOCITOS

Procedimiento:

Se seleccionaron 30 muestras de pacientes al azar y se realizó la cuenta de leucocitos por tres métodos:

- Automatizado utilizando el equipo Sysmex.
- Manual tradicional con la pipeta de Thoma.
- Manual modificado usando la pipeta de Sahli, como fue descrito en el procedimiento correspondiente.

Las mediciones fueron realizadas por un sólo analista, para evitar la variación inter-analista.

Se calculó una ANOVA de un factor con prueba para la comparación de las medias. Se llevó a cabo también un análisis de regresión lineal simple vs. el método automatizado, que fue considerado como estándar de oro.

folio	sysmex	shali	thoma
7	8200	7800	7750
8	9700	9100	9000
9	7300	7345	7300
10	8500	8125	8300
11	13200	13130	13500
12	11100	11375	11400
15	7900	7800	8050
16	6300	6500	6750
19	22700	23400	22100
20	18200	18200	18500
21	7400	7800	7100
22	7000	7150	7300
23	9800	9425	10050
5	17500	17550	17100
6	3900	4420	4300
7	8200	7800	7900
8	21100	20800	21500
10	9100	9230	8800
11	12700	12545	12950
12	8000	7475	8200
15	9400	9100	9700
20	8000	8450	7900
21	20400	20800	20100
22	7900	7800	7500
24	7100	7150	6900
26	10500	10725	10800
29	7900	7410	7600
30	9400	9295	9200
33	9000	8905	9100
34	10900	11050	10800

Resultados:

No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los métodos (cuadro A) y se encontró una buena correlación entre ellos (cuadro B).

Cuadro A. Promedio y desviación estándar de las mediciones de leucocitos por diferentes métodos.

Sysmex (cél/mm ³)	Tradicional con pipeta de Thoma (cél/mm ³)	Tradicional con pipeta de Sahli (cél/mm ³)
10,610 ± 4,697	10,588 ± 4,773	10,581 ± 4,671

Cuadro B. Coeficientes de regresión y determinación al comparar las cuentas de leucocitos de los métodos manuales vs. el automatizado.

Método	r	r ²
Tradicional con pipeta de Thoma	0.998	0.995
Modificado con pipeta de	0.998	0.995

ANEXO 2

VALIDACIÓN DEL MÉTODO MODIFICADO PARA CUANTIFICACIÓN DE PLAQUETAS

Procedimiento:

Se seleccionaron 30 muestras de pacientes al azar y se realizó la cuenta de plaquetas por tres métodos:

- Automatizado utilizando el equipo Sysmex.
- Manual tradicional con la pipeta de Thoma.
- Manual modificado usando la pipeta de Sahli, como fue descrito en el procedimiento correspondiente.

Las mediciones fueron realizadas por un sólo analista, para evitar la variación inter-analista.

Se calculó una ANOVA de un factor con prueba de Tukey como *posthoc* para la comparación de las medias. Se llevó a cabo también un análisis de regresión

lineal simple vs. el método automatizado, que fue considerado como estándar de oro.

FOLIO	SYSMEX	SHALI	THOMA
7	264000	265200	266000
9	239000	239200	241000
11	205000	204100	207000
13	343000	344500	345000
14	262000	263900	261000
15	239000	237900	240000
17	222000	223600	221000
18	245000	243100	246000
20	788000	786500	785000
22	141000	141700	140000
10	103000	101400	105000
11	248000	247000	249000
12	33000	33800	32000
13	236000	235300	235000
14	217000	217100	216000
15	356000	357500	358000
17	188000	188500	187000
19	346000	347100	345000
20	116000	114400	114000
21	61000	59800	62000
25	247000	248300	249000
28	174000	175500	173000
29	349000	348400	350000
31	249000	249600	247000
32	210000	208000	211000
33	257000	256100	260000
34	321000	321100	320000
35	266000	267800	268000
36	216000	214500	217000
37	237000	237900	235000

Resultados:

No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los métodos (cuadro C) y se encontró una buena correlación entre ellos (cuadro D).

Cuadro C. Promedio y desviación estándar de las mediciones de plaquetas por diferentes métodos.

Sysmex (cél/mm ³)	Tradicional con pipeta de Thoma (cél/mm ³)	Tradicional con pipeta de Sahli (cél/mm ³)
245,993 ± 129,283	245,960 ± 129,297	246,266 ± 129,015

Cuadro D. Coeficientes de regresión y determinación al comparar las cuentas de plaquetas de los métodos manuales vs. el automatizado.

Método	r	r ²
Tradicional con pipeta de Thoma	1.000	1.000

Modificado con pipeta de Sahli	1.000	1.000
--------------------------------	-------	-------

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Anticoagulante para biometrías hemáticas

EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético). Las sales de sodio y potasio en este ácido se comportan como poderosos anticoagulantes y son anticoagulantes de elección para el trabajo de rutina en Hematología.

Ventajas:

- o No afecta la morfología de las células hemáticas, por 2 horas y se debe realiza frotis en un tiempo no mayor a este para leer diferencial. Se conservan las células por 24 hrs a 4 °C

- o No modifica la velocidad de sedimentación globular.

Se le llama secuestro ya que secuestra al calcio y lo separa de la cascada de la coagulación, impidiendo que la sangre coagule.

Se utilizan al 5 % con 0.1ml por cada 3ml de muestra de sangre o bien de 1-2 mg por mL de sangre. Un exceso anticoagulante afecta adversamente tanto a los eritrocitos como a los leucocitos, causando su encogimiento y provocando cambios en su forma, y produce una hemodilución de la sangre, un exceso de sangre con relación al anticoagulante produce microcoágulos que alteran los resultados por ello debe cuidarse de agregar la cantidad correcta de sangre al anticoagulante. Se prefiere la sal tripotásica a la disódica, ya que es más soluble (10 veces más) y ello hace efectiva la mezcla del anticoagulante con la sangre.

EDTA al 5% se prepara de la siguiente manera:

EDTA (sal disódica).....5 gramos

Agua destilada c.b.p.....100 ml

Utilizar 0.1 ml de EDTA para 5 ml de sangre.

Citrato de sodio (Tiempos de coagulación)

Citrato de sodio.....3.8 g

c.b.p.....100 mL

Utilizar una parte de anticoagulación por 9 de sangre.

Solución diluyente de Drabkin

Ferricianuro de potasio.....0.20 g

Cianuro de potasio.....0.05 g

Bicarbonato de sodio.....1.00 g

c.b.p.....1000 mL

Reactivo para cuenta de leucocitos totales

Líquido de Türk 3 %

Medir un volumen de 3 ml de ácido acético glacial y vaciar en matraz aforado que contenga un poco de agua destilada. (Siempre el orden al vaciar debe de ser primero agua y luego el ácido, por lo violento que reacciona al revés).

Agregar unas gotas de azul de metileno.

Agua destilada..... Agregar lo que falte para el aforo a 100 ml

Reactivo para cuenta de plaquetas

Oxalato de amonio

Oxalato de amonio.....1 gramo

Agregar unas gotas de merthiolate

Agua destilada c.b.p.....100 mL

Se debe filtrar antes de usar.

Colorante de Wright para la tinción de leucocitos en la cuenta diferencial

Pesar colorante de Wright 2 gramos.

Agregar metanos c.b.p.....1000 mL

Dejar reposar un mes para que madure y posteriormente filtrar antes de usarse, para cada colorante se debe ensayar y así conocer en tiempo de tinción adecuado ya que de uno a otro puede variar.

Reactivo para teñir reticulocitos

Azul de crecil brillante

Azul de crecil brillante en polvo.....5gramos

Oxalato de potasio..... 1.4 gramos

Cloruro de sodio0.8 gramos

Agregar agua destilada c.b.p.....100 mL

Unidades de conversión mas utilizadas en hematología :

1 mL = 0.001 del litro = 1×10^{-3} L

1 μ L (microlitro)= 0.000 001 del litro = 1×10^{-6} L

1 nlitro = 0.000 000 001 del litro = 1×10^{-9} L

1 plitro = 0.000 000 000 000 del litro = 1×10^{-12} L

1 flitro = 0. 000 000 000 000 001 del litro = 1×10^{-15} L

$\text{mm}^3 = 1 \mu\text{L}$ (microlitro)

Figuras

1. Esquema de las venas superiores para toma de muestra sanguinea
2. Postura de cubito dorsal
3. Toma de muestra del brazo en posición sentado
4. Grafico de Levey-Jennings Normal

5. Grafico de Levey-Jennings Aumento de precisión
6. Curva estándar de hemoglobina
7. Camara de Neubauer
8. Cuadrante de la camara de Neubauer para contar leucocitos
9. Estructura de eritroblasto
10. Estructura de eritroblasto
11. Cuadrante de la camara de Neubauer para contar plaquetas
12. Estructura de reticulocitos
13. Ilustración de la forma de leer el frotis para cuenta diferencial
14. Estructura Normal de eritrocitos
15. Membrana normal del eritrocito
16. Estructura de forma normal de plaquetas
17. Estructura de Anisocitosis
18. Microcitosis
19. Macrocitosis
20. Poiquilocitosis
21. Equinocitos
22. Keratocitos
23. Esquinocitos
24. Acantositos
25. Dracriocitos
26. Esferocitos
27. Eliptocitos
28. Drapanocitos

29. Estomatocitos
30. Codocitos
31. Pilas en moneda
32. Hipocromia
33. Policromasia
34. Cuerpos de Howel-Jolly
35. Anillos de Cabot
36. Pappenheimer
37. Cuerpos de Heinz
38. Punteado basófilo
39. Pelger-Huet
40. multilobulados
41. granulaciones tóxicas
42. Neutrófilos con vacuolas
43. Neutrófilos con MPS
44. Dx de MPS
45. Tipo de MPS
46. Linfocitos activados
47. Endocarditis
48. Factores de la coagulación y sistema fibrinolítico
49. vías extrínsecas

Cuadros

1. Interpretación de regals de Levey-Jennings
2. Volúmenes de estándar par una curva estándar
3. Concentración y lectura de Absorbancia
4. leucocitos Normales
5. Inclusiones que se encuentran en el eritrocito
6. Alteraciones que se pueden encontrar en el neutrófilos
7. Alteraciones que se pueden encontrar en el neutrófilos en el citoplasma
8. Reacciones histoquímicas en células normales y blastos y en células inmaduras de leucemias agudas
9. Reacciones Antigenos-Anticuerpos presentes en el eritrocitos
10. Alternativas de transfusión en orden de preferencia
11. Conservación de plasma y criocepitados

LISTA DE REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Fernández C, Mazziotta D. Gestión de la Calidad en el laboratorio clínico. Buenos Aires: Panamericana: 2005; páginas 411-415, 421
2. Henry JB. Todd-Sanford-Davidshon. Diagnóstico y tratamiento clínico para el laboratorio. 7ª ed. México: Salvat: 1984; páginas 855,857
3. Lynch M, Stanley R, Mellor LD, Spare P, Inwood MJ. Métodos de Laboratorio. 2ª ed. México: Interamericana :1994; páginas 752, 753
4. Freire J, Alcover R, Zabala I, Rivera JO. La nueva ISO-9000-2000. 3ª ed. España: Fundación Confemetal: 2004; páginas 23, 27.
5. Manual del Analizador semi-automatico sysmex KX-21N
6. John D, Bauer MD. Análisis clínicos. Métodos e interpretación. 2ª Ed. España: Reverte; 1986. p. 193-5.
7. Widmann F. Interpretación de las pruebas de laboratorio. 2ª ed. Barcelona: Jims: 1981. Páginas 18-19
8. Muralli D. Control de calidad en los laboratorios clinicos. Barcelona: Reverté:2002; páginas 144- 150
9. Pagana KD, Pagana TJ. Mosby Guía de pruebas diagnosticas y de Laboratorio. St.Louis: Mosby: 1994; páginas 450-451,230-234, 714-716, 356, 445-446, 485-487, 649-650, 661-662.
10. Mejía GA, Ramelli MA, Interpretación clínica del laboratorio. 7ª ed. Bogota: panamericana: 2007; páginas 317,318.
11. Ruiz-Argüelles G. Fundamentos de Hematología 3ª ed. México: Panamericana: 2003; páginas 46, 59, 34,35.
12. Carrillo-Farga J, Pérez-Vega S. El Atlas de Hematología. México: CyberCell:1997
13. Hillman RO. Manual de hematología. 2ª ed. México: El Manual Moderno:1997; páginas 39,42.
14. Rapaport SI. Introducción a la Hematología. 2ª ed. México:Salvat:1994; paginas 53-54.
15. Diggs L, Sturm D, Bell A. La morfología de las celulas de la sangre. Abbott laboratories: U.S.A:1971; página 17,18
16. Miale JB. Hematología. 16ª Ed. España: Reverte: 1985. páginas 230, 233,235

17. Ruiz G. Fundamentos de Interpretación Clínica de los Exámenes de Laboratorio. Bogotá: Panamericana: 2004; páginas 76-78, 83-85, 96-97.
18. McKenzie S. Hematología clínica. 2ª ed. México: Manual Moderno, 2000: 633-638.
19. Ángel MG. Interpretación Clínica del Laboratorio. 4ª ed. Buenos Aires: Panamericana: 1993; páginas 40, 301-304.
20. Hillman RS, Boggs DR, Thomson AR. Manual de Hematología. 2ª ed. México: Ed. Manual Moderno. 1998.
21. Carillo FJ. Casos Clínicos. México: Interamericana: 1992; páginas 72-75.
22. McDonald GA, Paul J, Cruickshank B. Atlas de hematología. 5ª ed. España: Panamericana: 1998; páginas 10-12, 18-29, 85.
23. Muñoz MZ, Moran CC. Manual de procedimientos en técnicas básicas de hematología. Lima-Perú: Instituto Nacional de Salud: 2005; páginas 25, 72-73.
24. Wintrobe MM. Hematología clínica. 4ª ed. Buenos Aires: Inter-medica: 1979; páginas 11.
25. Jawetz E. Microbiología Médica. 13ª ed. México: El Manual Moderno: 1990, 341, 385-386.
26. Manual del proveedor Rocher del equipo STAR-4.
27. Balcells A. La clínica y el laboratorio. 7ª ed. México: Salvat, 1993: 192-196.
28. Fischbach F. Manual de pruebas diagnósticas. 5ª ed. México: McGraw-Hill, 1997: 130-135, 147, 148.
29. González JM. Técnicas y métodos de laboratorio clínico. 2ª ed. México: Masson, 2005: 337-347.
30. Rodríguez H, Quintanar E, Mejía M. El Banco de Sangre y la Medicina Transfusional. México: Medica Panamericana: 2004; páginas 37, 39.
31. Linares GJ. Inmunohematología y Transfusión. Principios y Procedimientos. Caracas-Venezuela: Cromotip CA: 1986; páginas 179-180, 350-353
32. Albarrán C, Albarrán BL. Manual de Banco de Sangre. México: Prensa Medica Mexicana S.A: 1985
33. Mollison PL. Transfusión de sangre en medicina clínica. Barcelona, España: Reverté, S.A. 1987.
34. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA2-1993, "Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos" 18 de Julio de 1994
35. Diario Oficial de la Federación. NORMA Oficial Mexicana NOM-166-SSA1-1997, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.