





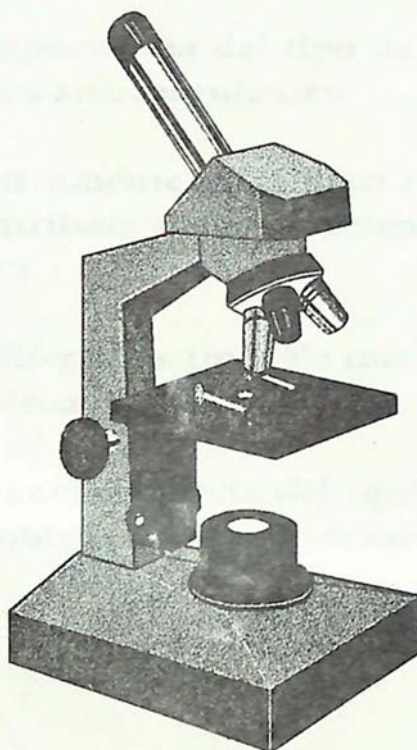
**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO HENRÍQUEZ UREÑA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA DE MEDICINA**

**MANUAL DE LABORATORIO DE**

**PATOLOGÍA CLÍNICA**



**Preparado por :**

**Dra. Rhina González**

**Santo Domingo, R.D.**

**1997**

**Publicaciones de la  
Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña**



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO HENRÍQUEZ UREÑA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE MEDICINA

LABORATORIO DE

PRIOLOGÍA CLÍNICA



**Colaboradoras:**

**Licda. María I. Robles**

**Licda. María Alt. Muñoz**

**© Agosto 1997**

**Impresos y Encuadernaciones Rodríguez**

**Santo Domingo, República Dominicana**

**Derechos Reservados**

**Dra. Rhina González**

**Diagramación y Digitación**

**Ing. José Horacio Cabrera Tejada**

**Primera Edición 250 Ejemplares**

# PRÁCTICA # 1

## TOMA DE MUESTRA

### OBJETIVOS GENERALES:

- 1.- Conocer la toma de muestra adecuada, según la prueba de laboratorio a realizar.
- 2.- Conocer la importancia del tipo de muestra y la acción de los anticoagulantes.
- 3.- Participar activamente en la discusión de criterios y/o contribuir voluntariamente a la toma de muestra.
- 4.- Ejecutar los diferentes tipos de toma de muestra con el anticoagulante adecuado.
- 5.- Conocer el manejo correcto del equipo necesario para la obtención y preservación de las muestras.

## PRÁCTICA # 1

### Introducción :

El laboratorio clínico es el conjunto de pruebas realizadas en un lugar específico, usando la metodología mas adecuada, tomando para ello como parámetros su sensibilidad, especificidad, rapidez y costo con el fin de:

- 1.- Ayudar al diagnóstico de ciertas enfermedades.
- 2.- Controlar el progreso de enfermedades.
- 3.- Determinar los factores pronósticos de las enfermedades de un paciente.
- 4.- Determinar valores de referencia.
- 5.- Determinar los niveles farmacológicos mas efectivos de un medicamento dado.
- 6.- Diagnosticar la mayoría de las enfermedades.
- 7.- Limitar poblaciones con probabilidades mayores de padecer una enfermedad.

Por lo que concluimos que el resultado reportado por el Laboratorio Clínico tiene un papel importantísimo en el área de la salud.



Todo laboratorio debe tener por lo menos cinco (5) departamentos o áreas. En los países subdesarrollados hay algunos que prescinden del Departamento de Banco de Sangre y del Departamento de Microbiología. Además, en éstos, la orina y las heces se analizan en una 6ta. Área denominada "Orina y Coprología". Pero en los países desarrollados se incluyen en Hematología y Microbiología respectivamente.

También en estos países, otros laboratorios tienen departamentos de Citogenética, Medicina Nuclear y hasta de Investigación.

Además de las áreas mencionadas que son las clínicas, están las no clínicas, que son, principalmente :

- 1.- Información
- 2.- Toma de Muestra
- 3.- Baños
- 4.- Oficinas

A éstas se incluirán : área de limpieza y esterilización, almacén, sala de conferencias, cocina-comedores, área de descanso y dormitorio para los que hacen servicio nocturno, en caso de que el laboratorio lo ofrezca.

Respecto a las subdivisiones y pruebas por área lo veremos en el siguiente cuadro :

CUADRO # 2

DEPARTAMENTO	SUBDIVISIÓN	PRUEBAS
1.- Hematología	Básica o Rutina	Hemograma, plaquetas, eritrosedimentación, falcemia, reticulocitos, gota gruesa, células L.E.
	Básica-Coagulación	Protrombina, tromboplastina, tiempo de sangría, tiempo de coagulación.
	Especializada	Electroforesis, hemoglobina, citoquímica, glucosa 6 fosfato, fosfatasa alcalina de leucocitos, ensayo de factores de coagulación, hemoglobina A <sub>2</sub> .

**CUADRO # 2**  
**(continuación)**

DEPARTAMENTO	SUBDIVISIÓN	PRUEBAS
2.- Inmunohematología o Banco de Sangre <sup>(1)</sup>	Básico	Tipificación, Du, Coombs directo e indirecto. Evaluación y sangría de donantes.
3.- Química	Básica o Rutina	Ácido úrico, colesterol, triglicéridos, creatinina, urea, glucosa, proteínas totales.
	Básica-Enzimas	Amilasa, CPK, fosfatasa ácida y alcalina, LDH, SGOT, SGPT.
	Básica-Electrolitos	Calcio, cloro, fósforo, litio, potasio, sodio.
	Especializada	Electroforésis de proteínas y lipoproteínas, gases, hormonas, tóxicos y medicamentos.
4.- Inmunoserología	Básica	Aglutininas frías, antígenos febriles, ASO, factor reumatoide, proteína C reactiva, prueba de embarazo (orina), VDRL.
5.- Microbiología	Básica o rutina	Coprocultivo, hemocultivo, urocultivo, misceláneos (garganta, oídos, heridas), blenorragia (vagina, uretra, líquido seminal).
	Básica-anaeróbicos	Heridas profundas.
	Especializadas	Hongos, mycobacterias, tinciones especiales (para BAAR y corynebacterias).



**CUADRO # 2**  
**(continuación)**

DEPARTAMENTO	SUBDIVISIÓN	PRUEBAS
6.- Coprológico y Orina	Básica	Análisis de Orina, heces y digestión de heces.

(1) Si el laboratorio no posee esta área, sólo se hace tipificación en hematología o serología.

En cuanto a los instrumentos o equipos, hay áreas que usan específicos como el hematocímetro de hematología, la microcentrífuga, el rotador mecánico, el espectrofotómetro y el SMA 6, 12 ó 24, gasómetro u otros sofisticados de química, la nevera y centrífuga de Banco de Sangre; la incubadora, balanza, mechero y autoclave (si no hay área de esterilización) de microbiología y el rotador de VDRL, y microscopio de inmunofluorescencia para pruebas que siguen el método de ELISA (si los hay) de serología.

Otros son comunes, aunque lo preferible es que cada área tenga por lo menos, los siguientes instrumentos :

- 1.- MICROSCOPIO : Se utiliza en todas las áreas, con excepción de química (en Banco de Sangre se usa para chequear aglutinaciones dudosas).
- 2.- LA CENTRÍFUGA : Se utiliza en todas las áreas.
- 3.- BAÑO DE MARÍA : Se utiliza en todas las áreas, con excepción de microbiología, orina y coprología.

Respecto a la cristalería y accesorios, en un laboratorio se necesita:

- 1.- Beakers, erlemeyers y aforos.
- 2.- Cámara de Neubauer para conteos manuales.
- 3.- Frascos esterilizados para urocultivos y coprocultivos.
- 4.- Gradillas de diferentes capacidades.
- 5.- Gasa, papel toalla y desinfectante.
- 6.- Microcapilares para pruebas manuales de hematocritos.
- 7.- Nevera para reactivos y horno para secar cristalería limpia.
- 8.- Pipetas para conteos manuales y de hemoglobina, pipetas Pasteur, serológicas y automatizadas.

- 9.- Porta y cubreobjetos.
- 10.- Tubos de 12mm x 75mm, 13mm x 100mm y 16mm x 150mm.
- 11.- Tubos de rosca y placas de petri para preparar medios microbiológicos.
- 12.- Tubos de Wintrobe para eritrosedimentación.

### Métodos de obtener diferentes muestras de Laboratorio

Toda determinación de laboratorio requiere muestras de fluidos corporales bajo condiciones específicas de cada método empleado.

Toda muestra debe cumplir con los requisitos señalados para que los resultados sean válidos y confiables. Por muy bien que sean realizados los análisis, si las muestras están mal tomadas, sólo llegaremos a resultados de pobre o ningún valor clínico.

### TOMA DE MUESTRA:

#### 1.- Sangre

#### 2.- Muestras para Cultivos

##### 1.- Sangre

- a) Punción capilar o periférica.
- b) Punción venosa.
- c) Sangre arterial.

##### a) Punción capilar o periférica.

#### Materiales necesarios :

- Algodón
- Alcohol isopropílico al 70%, pues aumenta la circulación
- Lancetas estériles
- Capilares heparinizados

#### Sitios de punción :

- Talón del pulgar del pie en recién nacidos
- Yemas del dedo anular o pulpejos de los dedos
- Lóbulo de la oreja

**Técnica :**

- 1) **Limpiar el sitio a puncionar con un algodón humedecido con alcohol al 70%.**
- 2) **Secar el área con un algodón seco.**
- 3) **Puncionar con lanceta estéril a 3mm de profundidad.**
- 4) **Limpiar la primera gota de sangre con algodón y aplicar presión moderada, 1cm por encima del área puncionada, para obtener la sangre, soltar para que refluya. Repetir esto hasta recolectar la cantidad requerida.**
- 5) **Presionar ligeramente la punta del dedo con algodón seco por unos minutos hasta que el sangrado cese.**

**b) Punción venosa****Materiales necesarios :**

- Algodón o gasa
- Solución antiséptica
- Torniquete
- Jeringuilla o tubos al vacío con su barril o holders
- Tubos con o sin anticoagulantes

**Anticoagulantes :**

Éstos actúan inhibiendo algunas etapas del proceso de coagulación. Los tubos al vacío están identificados con colores, los cuales van a representar un anticoagulante en particular. Entre los más usados se encuentran:

- 1) **EDTA (ácido etilendiaminotetracético)**. Es usado en concentraciones de 1-2mg por 1ml de sangre. Evita la coagulación, retirando iones de calcio. El tubo con tapón morado lo contiene.
- 2) **Citrato de Sodio al 3.8%**. Es el anticoagulante ideal para estudios de coagulación, remueve el calcio, formando complejos solubles, y protege ciertos procoagulantes. Se utiliza también en sangres que se van a usar en transfusiones. El tubo con tapón azul lo contiene.
- 3) **Fluoruro de Sodio**. Su principal acción es inhibir la glicólisis.
- 4) **Heparina**. Éste neutraliza la trombina y así evita la coagulación. Es el mejor anticoagulante para evitar la hemólisis y para pruebas de fragilidad osmótica. Es utilizado en pruebas químicas en las cuales se necesita plasma. El tubo con tapón verde lo contiene.

5) Oxalato de amonio. Éste se une al calcio formando complejos insolubles y es útil en estudios de coagulación.

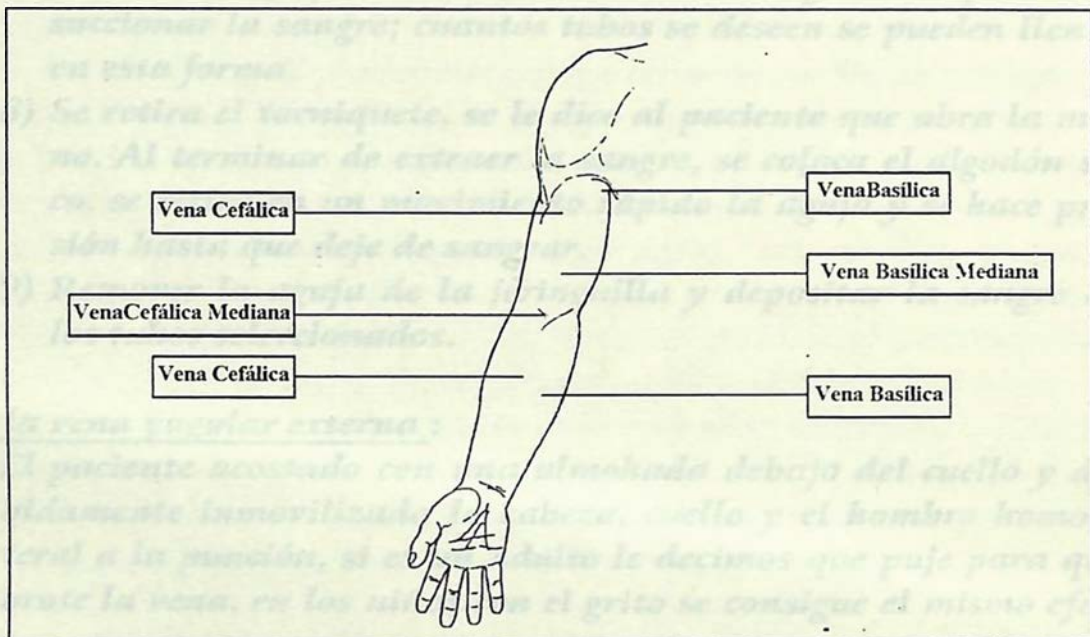
6) Mezcla de Oxalato de amonio y Oxalato de potasio. En una proporción de 6:4 y actúa retirando iones de calcio.

**Sitios de punción :**

Las venas son el principal recurso de sangre para la mayoría de las determinaciones. Suele usarse la cefálica (en la parte exterior del brazo), la cefálica mediana y basilica del pliegue del codo interno. La segunda es la más recomendada, pues está bien anclada en el tejido y no rueda.

Sin embargo, cuando éstas no se localizan pueden usarse las de las manos, muñeca, antebrazo y tobillos.

Aunque se recomienda que el paciente esté acostado, puede estar sentado si su brazo se sostiene en una mesa a la altura de la cintura y está cómodo. nunca de pie (!!!), pues podría desmayarse y algunas sustancias se elevan por el paso del agua de los compartimientos intravasculares a los intersticiales.



**Figura #1**

En recién nacidos e infantes usamos una de las siguientes venas:

- 1) Femoral
- 2) Yugular externa
- 3) Yugular interna
- 4) Yugular longitudinal superior, sólo en casos extremos

Técnica :

- 1) Rotular los tubos con el nombre del paciente y preparar la jeringuilla y los tubos a usar.
- 2) Colocar el torniquete por encima de la vena de elección, ligeramente apretado, para hacer presión venosa.
- 3) Pedir al paciente que abra y cierre varias veces la mano y finalmente la deje cerrada.
- 4) Palpar la vena con el dedo índice, haciendo presión sobre la vena, se selecciona la vena de mayor calibre.
- 5) Desinfectar el área y dejar secar.
- 6) Sujetar la jeringuilla o el barril entre el pulgar y los últimos tres dedos y el índice apoyado.
- 7) Con un movimiento continuo, se punciona directamente la vena con el bisel hacia arriba y en forma oblicua al brazo. En el momento de hacer la punción con el dedo índice de la mano libre, hacemos tensión en la piel debajo del sitio de punción, y tan pronto penetre sangre a la aguja, con la mano libre se hala el émbolo de la jeringuilla o se perfora el tapón del tubo al vacío, empujando el tubo en el barril, y así empezará a succionar la sangre; cuantos tubos se deseen se pueden llenar en esta forma.
- 8) Se retira el torniquete, se le dice al paciente que abra la mano. Al terminar de extraer la sangre, se coloca el algodón seco, se retira en un movimiento rápido la aguja y se hace presión hasta que deje de sangrar.
- 9) Remover la aguja de la jeringuilla y depositar la sangre en los tubos seleccionados.

Punción de la vena yugular externa :

El paciente acostado con una almohada debajo del cuello y debidamente inmovilizada la cabeza, cuello y el hombro homolateral a la punción, si es un adulto le decimos que puje para que brote la vena, en los niños con el grito se consigue el mismo efecto.

c) Sangre Arterial

Se usan los mismos materiales que en la punción venosa, con excepción del torniquete, que no se utiliza. Las arterias a puncionar se palpan sus pulsaciones y la punción se hace con la aguja perpendicular a la arteria.

## PRÁCTICA # 2

### 2.- Muestras para cultivos

#### Materiales necesarios :

- Recipientes estériles con medios o soluciones de transporte para que no ocurra desecación y muertes de las bacterias.
- Gasas estériles, jabón antiséptico, alcohol isopropílico al 70%, tintura de yodo.
- Transcul-culturete (depende la casa comercial).

#### Técnica :

1.- Con un isopo estéril recoger parte de las secreciones a cultivar y poner los isopos en medios de transporte estériles (culturete, transcul, etc.).

En casos de hongos se toman escamas por raspado y éstas se dejan caer en un envase estéril para luego sembrar en los diferentes medios de cultivos.

2.- En un frasco de hemocultivo, que tiene un medio de transporte, se toman 2ml, 5ml y 10ml de sangre, los depositamos en frascos y lo incubamos a una temperatura de 35° a 37°; los medios a utilizar, dependiendo del tipo de cultivo, serán los siguientes: agar sangre, agar chocolate, mackonkey (Mc), salmonella, shiguella (SS), Eosina Azul de Metileno (EMB), manitol sal agar (MSA). Después de identificada la bacteria, se realiza el antibiograma para obtener el antibiótico al cual será sensible o resistente ese microorganismo. Los antibióticos a usar son: amikin, ampicilina, gentamicina, carbenicilina, sulfazotrin, etc.. Hay bacterias que no se le realiza el antibiograma, porque el antibiótico está predefinido, ejemplo: estreptococo de todos los grupos.

#### PRUEBAS DONDE SE USAN ESTIMULANTES :

En todas ellas hay que tomar muestras en condiciones basales o pre-estímulo y luego una o mas muestras según lo requiera el caso.

Ejemplo: curva de tolerancia a la glucosa.

## PRÁCTICA # 2

### EXÁMEN GENERAL DE ORINA

Examen general de orina (Práctica 2)

La orina se forma en el proceso de filtración de la sangre que se produce en los glomerulos renales.

En cuanto a la composición de la orina, en la misma intervienen tres partes principales:

#### OBJETIVOS GENERALES:

1.- Neurones

2.- Metabolismo

3.- Capacidad del riñón para manejar selectivamente las sustancias que recibe.

**1.- Comprender las generalidades del examen de orina.**

**2.- Conocer los fundamentos y técnicas de las partes que componen el examen completo de la orina.**

**3.- Realizar un examen completo de orina e interpretar los resultados.**

**4.- Conocer el manejo del equipo a utilizar en un examen completo de orina y cuidar debidamente.**

**5.- Conocer condiciones patológicas que sean detectables por medio de un examen completo de orina.**

## PRÁCTICA # 2

### Exámen General de Orina (Uroanálisis).

La orina se forma en el proceso de filtración de la sangre que se produce en los glomérulos renales.

En cuanto a la composición de la orina, en la misma intervienen tres partes principales :

- 1.- Nutrición
- 2.- Metabolismo
- 3.- Capacidad del riñón para manejar selectivamente las sustancias que recibe.

### Recogida de la Orina.

#### -Materiales necesarios.

- 1.- Recipiente con tapa, químicamente limpio y seco.
- 2.- Colectores de orina, en niños y en personas que no tienen controles de sus esfínteres.

#### -Cómo obtener correctamente una muestra de orina.

- 1.- Limpieza de genitales externos, con jabón de cuaba.
- 2.- En adultos, eliminar la primera porción de la micción y recoger la siguiente porción en el recipiente a usar, en infantes colocar el colector de orina.
- 3.- Guardar la orina refrigerada a 5°C, hasta el momento de realizar la prueba.
- 4.- Durante la menstruación y hasta dos ó tres días después de la misma no deberán llevarse a cabo análisis de orina en la mujer.



## Primera Parte

### Parámetros del Exámen Físico

Dentro de éstos estudiaremos su:

- a) Color
- b) Aspecto
- c) Olor
- d) Densidad
- e) Volumen

a) Color:

Varía según la concentración de la orina; normalmente es amarillo. El color de la orina puede ser rojo debido a la presencia de sangre fresca, u oscuro como café debido a sangre degradada, tal como se observa en la glomérulo nefritis aguda. La bilis puede determinar un color amarillo o amarillo marrón. Una abundante eliminación de uratos puede determinar la producción de una orina color rojo ladrillo.

La orina normal, agitada levemente, produce cierta cantidad de espuma blanca. La espuma amarilla puede ser diluída a pigmentos biliares en la orina para formar espuma.

b) Aspecto:

Las orinas normales pueden mostrar un sedimento si se dejan reposar después de enfriarse al dejar la temperatura corporal. El aspecto es, generalmente, compacto, blando y cristalino, constituido, principalmente, por fosfato inorgánico; en la orina ácida puede deberse a cristales naranjas de urato y a material amorfo de uratos. También puede aparecer mucus provenientes de los aparatos urinarios y genitales, el cual aparece como pequeñas manchas nubosas.

He aquí un listado de causas que confieren aspectos turbio, ligeramente turbio y hasta muy turbio y lechoso.

ASPECTOCAUSAS

**Turbio, ligeramente turbio, muy turbio**

**Fosfatos, carbonatos, uratos, ácido úrico, leucocitos, hematíes, bacterias hongos, espermatozoides, líquido prostático, arenilla de cálculos, filamentos mucosos.**

**Lechoso**

**Contaminación fecal. Muchos polimorfonucleares (piuria). Grasa. Lipuria opalescente. Quiluria, lechosa.**

c) Olor:

El olor es importante para reconocer la orina no apta para ser examinada.

La orina tiene un olor característico "sui generis" al cabo de un tiempo de su emisión, la descomposición de la urea transforma dicho olor en amoniacal.

La presencia de acetona en la orina, como por ejemplo en la acidosis diabética, produce olor a frutas. En orinas fétidas y amoniacales por contaminación bacteriana.

d) Densidad:

La cantidad de sólido disuelto en la orina.

Los adultos normales, con dietas normales y una ingesta de líquido normal, producirán orina de una densidad entre 1.016 y 1.022, durante un período de 24 horas.

En la medición de la densidad se emplea, habitualmente, el urinómetro. Éste es un hidrómetro adaptado para medir la densidad de la orina a la temperatura ambiente.

Procedimiento

El cilindro del urinómetro se llena tres cuartos de su capacidad con orina (el volumen mínimo requerido de orina es de 15ml), se imprime al urinómetro un movimiento de rotación para es-

tar seguros de que flota libremente (cuando se lea el urinómetro, debería asegurarse de que no toque los lados o el fondo del cilindro. Evitar las burbujas de la superficie que ocultan el menisco) leer en el fondo del menisco.

Otro instrumento utilizado para leer la densidad de la orina es el refractómetro. Éste se ha constituido en un instrumento popular para determinar la densidad urinaria. Sólo se requiere unas gotas de orina y el método es fácil, rápido y coinciden bien con las lecturas del urinómetro.

El método depende de la relación entre el índice de refracción de una solución y su contenido de sólidos disueltos.

### Valores Normales<sup>(1)</sup>

<b>Recién Nacidos (primeros días)</b>	<b>1.012</b>
<b>Lactantes</b>	<b>1.002-1.006</b>
<b>Adultos</b>	<b>1.001-1.035</b>

(1) Con una ingesta de líquidos normal 1.016-1.022

#### e) Volumen:

La medición del volumen de orina durante intervalos de tiempos medidos puede ser una ayuda valiosa en el diagnóstico clínico.

El volumen medio diario de un adulto normal es de 1,200 a 1,500 ml, siendo la oscilación normal entre 600 y 2,000 ml.

Las variaciones dentro de estos valores normales se debe a que varía según el volumen corporal y, considerablemente, según el consumo de líquidos, sudoración y temperatura ambiente.

En los niños, la diuresis es considerablemente mayor que en el adulto en proporción al volumen corporal.

Puede hallarse un aumento de la diuresis o poliuria. Puede ocurrir en hipertiroidismo., diabetes mellitus y diabetes insípida. Oliguria, disminución de la diuresis, puede aparecer en las fases terminales de la uremia diluída a enfermedad renal crónica, o en fases agudas de una glomerulonefritis inicial. Anuria: el cese completo de la formación de orina (isquemia renal o nefrosis del nefrón distal). Polaquiurea: frecuencia en la micción.

Segunda Parte  
Exámen Químico

El análisis rutinario de la orina mediante tiras reactivas, para el exámen químico completo, constituye el primer paso hacia un diagnóstico en el laboratorio; toda prueba positiva en la tirilla deberá confirmarse con un método específico para cada caso.

Pruebas, determinaciones o parámetros que comprenden el exámen químico de rutina en un uroanálisis:

<u>Pruebas</u>	<u>Enfermedades</u>
a) pH	<i>Afecciones renales y del tracto genitourinario.</i>
b) Glucosa (mg/dl)	<i>Trastornos del metabolismo de los carbohidratos.</i>
c) Ácido Ascórbico	<i>Se debe a la ingesta de grandes cantidades de vitamina C.</i>
d) Cuerpos Cetónicos	<i>Trastornos del metabolismo de los carbohidratos.</i>
e) Nitritos	<i>Afecciones renales y del tracto genitourinario.</i>
f) Proteínas (mg/dl)	<i>Afecciones renales y del tracto genitourinario.</i>
g) Bilirrubina	<i>Hepatopatías y enfermedades hemolíticas.</i>
h) Urobilinógeno (mg/dl)	<i>Hepatopatías y enfermedades hemolíticas.</i>
i) Hematuria y Hemoglobinuria	<i>Afecciones renales y del tracto genitourinario.</i>

## Interpretación clínica, causas, fundamentos de reacción y valores normales de los parámetros mencionados anteriormente

### a) pH

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

El adulto medio sometido a dieta normal excreta orina con un pH aproximado de 6.0. Puede variar desde 5.0 a 7.0. Una ingesta alta de proteínas, se producen más fosfatos y sulfatos que se traducen en una orina más ácida.

Valores alcalinos (pH 7.0-8.0) persistentes en la orina fresca durante todo el día, son indicio de una infección de las vías urinarias. Orinas persistentemente ácidas (pH menor de 7.0), son indicios de una diátesis idiopática de cálculo de ácido úrico.

#### Fundamento:

La determinación del pH urinario se realiza mediante el uso de tirillas reactivas, consistentes en indicadores que cambian de color entre pH 5.0 y pH 9.0.

### b) Glucosa

La glucosa del filtrado glomerular se reabsorbe por los túbulos. La máxima capacidad de reabsorción tubular para la glucosa suele ser de alrededor de 160 mg/dl de  $\pm 20$  mg/dl.

La glucosuria es el signo que primeramente se detecta en una diabetes mellitus; pero hay que tener presente que la glucosuria puede tener, también, otras causas como son:

- Glucosuria Renal (disminución significativa del umbral renal)
- Glucosuria Alimentaria (se presenta a veces después de comidas ricas en carbohidratos en pacientes de metabolismo sano y con umbral renal normal).

- **Glucosuria en lesiones renales** (con una función renal disminuída al 30% o menos del rendimiento total, se presenta en glucosuria renal asintomática).

### Fundamento:

La prueba de glucosuria por tirillas se basa en la reacción específica de glucosa oxidasa-peroxidosa.

La D-glucosa se oxida enzimáticamente por el oxígeno del aire a 8-D-gluconolactona. El peróxido de hidrógeno resultante oxida, bajo catálisis de la peroxidosa, al indicador, el cual se convierte en un colorante pardo. La reacción positiva produce un viraje de color del amarillo al pardo; la lectura con las tirillas, al cabo de 60 segundos, permite una valoración semi-cuantitativa.

La prueba confirmatoria convencional más usada en los laboratorios, se conoce con el nombre de "*Método de Benedict*".

### c) Ácido Ascórbico:

Una excreción aumentada de ácido ascórbico, como consecuencia de la ingestión de grandes cantidades de vitamina C, puede acondicionar una reacción más débil.

En casos de duda, se recomienda repetir la prueba, por lo menos, 10 horas después de la última ingestión de vitamina C. En orinas conteniendo cuerpos cetónicos, se ha observado, a veces, una disminución de la sensibilidad.

No se recomienda la adición de preservativo a la orina, porque puede perturbar la prueba.

### d) Cuerpos Cetónicos:

La determinación de los cuerpos cetónicos (ácido acetacético y acetona), en la orina, es importante para el diagnóstico de una descompensación del metabolismo en la diabetes mellitus. Los estados precomatosos y comatosos casi siempre van acompañados de una cetoacidosis y una cetonuria. Las cetonurias también pueden observarse en los estados de caren-

cia de alimentos, en las curas de adelgazamiento con carencia de hidratos de carbono y alimentación rica en proteínas, en la hiperémesis gravídica, en los vómitos acetónicos de los niños pequeños y en los estados febriles.

**Fundamento:**

La comprobación de cuerpos cetónicos se basa en el principio de la prueba de Legal; el ácido acetacético y la acetona reaccionan con nitroprusiato sódico y glicina en medio alcalino y producen un complejo colorante violeta. La reacción es específica para estas dos cetonas.

El hallazgo positivo se manifiesta por un viraje de color de crema a violeta. La intensidad de la coloración violeta aumenta con la concentración de cuerpos cetónicos en la orina. La glucosa, proteína, ácido ascórbico y agentes de conservación de orina en concentraciones habituales no perturban la reacción.

e) **Nitritos**

Es la presencia significativa de bacterias en la orina. Un resultado positivo de la prueba significa una infección urinaria que requiere tratamiento.

**Fundamento:**

Se basa en el principio de la prueba de Griess, una amina aromática reacciona en presencia de un tampón ácido con nitritos formando un compuesto diazonio, que a su vez reacciona con el 3-hidroxi - 1,2,3,4 - tetrahidrobenceno - |H - quinolina para formar un colorante azóico.

A toda prueba positiva debe realizársele un urocultivo para determinar qué tipo de bacteria está presente. La más frecuente es la *Escherichia coli*, que causa la mayoría de las infecciones de las vías urinarias y casi todos los otros gérmenes patógenos de la orina, reducen los nitratos contenidos en la orina a nitritos; además de *E. coli*, están *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Aerobacter*, *Salmonella*, *Enterococos*, *Estafilococos*, *Pseudomonas*.

Para realizar dicho cultivo debemos de asearnos bien, con jabón antiséptico (jabón de cuaba). Usar recipiente químicamente limpio y estéril; en niños, colectores estériles.

La asepsia en la recogida de las muestras de orina para urocultivo es de gran importancia.

#### f) Proteínas

La orina normal contiene una pequeña cantidad de proteína aunque el glomérulo normal bloquea la mayor parte del paso de albúmina y de las proteínas plasmáticas más grandes, desde el plasma al filtrado glomerular.

La concentración de proteína en una orina normal y con un flujo normal, debe ser negativa.

Los recién nacidos, a veces, tienen valores más altos durante los primeros tres días.

Por regla general, una proteinuria es un síntoma frecuente pero inespecífico de la nefropatía. Puede también encontrarse en la glomerulonefritis, nefritis del lupus, enfermedad amiloidea en la congestión venosa severa del riñón, y en mieloma múltiple; para esta última se realiza la prueba de Bences Jones, que se determina con orina de 24 horas.

#### Fundamento:

La determinación de proteinuria en un análisis por tirillas, en presencia de proteína y con valores de pH constantes, vira del amarillo al verde, pasando por el verde claro.

Resultados falsos positivos pueden obtenerse en el caso de :

- Infusión de polivinilpirrolidina (sustitutivo sanguíneo)
- Residuos de desinfectantes en el recipiente.

Las pruebas confirmatorias más usadas en los laboratorios se conocen con el nombre de método de Robert y método de Calor y Acidificación.



### g) Bilirrubina

Resulta de la degradación de la hemoglobina. En el individuo sano es demostrable la bilirrubina en orina. Prácticamente sólo es susceptible de excreción la bilirrubina conjugada (bilirrubina directa que es hidrosoluble) y se presenta en la orina en casos de ictericia obstructiva intra y extra hepática, así como en hepatitis aguda o crónica y cirrosis hepática.

#### Fundamento:

La determinación de bilirrubina en orina empleando tirillas reactivas, se fundamenta en la reacción de aquella con una sal de diozonio estable, produciendo un colorante ozoico rojo violeta hasta violeta.

La intensidad de la coloración aumenta con la creciente concentración de la bilirrubina. Resultados falsos negativos pueden encontrarse por grandes cantidades de ácido ascórbico presente y también de la luz al dejar reposar la orina por períodos prolongados.

### h) Urobilinógeno

Luego de excretada la bilis en el intestino, la bilirrubina conjugada se reduce por acción bacteriana a mesobilirrubina, estercobilinógeno.

Fisiológicamente, el urobilinógeno se reabsorbe por completo por la circulación portal para ser excretado por el hígado, parte del urobilinógeno es excretado por la orina. La urobilina, forma oxidada del urobilinógeno, también se encuentra en la orina normal.

El límite superior de urobilinogenuria normal es de 1 mg/dl en orina puede ser debido a:

- 1.- Función hepática perturbada.
  - a) Como consecuencia de una hepatopatía primaria.
  - b) Secundariamente a causa de participación del hígado en otras enfermedades.

**2.- Degradación aumentada de hemoglobina.**

- a) Debido a afección primaria hemolítica.
- b) Secundariamente en otras dolencias.

La ausencia de urobilinógeno en la orina puede ser debida, entre otras causas, a:

- 1.- Obstrucción completa del conducto coledoco sin infección de las vías biliares.
- 2.- Ausencia de la flora bacteriana intestinal.

**Fundamento:**

La determinación de urobilinógeno se basa en la reacción de éste con una sal de diazonio que, en un medio ácido, origina un colorante azoico rojo. La intensidad de la coloración rojo constituye una medida de la concentración del urobilinógeno presente.

Hallazgos falsos negativos pueden producirse al dejar la orina, por período prolongado, bajo la acción de la luz solar. Método o prueba confirmatoria es el de Erlich's.

i) **Hematuria y hemoglobinuria**

Una hematuria, es decir la excreción de eritrocitos en orina, puede ser síntoma de muchas enfermedades. El minucioso estudio de sus posibles causas es, por esta razón, absolutamente necesario.

Las causas principales de una hematuria son las afecciones renales y del tracto genitourinario y las diálisis hemorrágicas. En particular, deben tenerse en cuenta, para el diferencial, las siguientes afecciones:

- Cálculos
- Tumores
- Glomerulonefritis
- Pielonefritis
- Diálisis hemorrágica

La hemoglobinuria se manifiesta por la excreción de hemoglobina libre. Ésta aparece en la orina cuando ha tenido lugar una hemólisis de eritrocitos, que puede ser intravascular, intrarenal o bien ha tenido lugar en la misma orina. Puede tener su origen en las siguientes causas:

- Grave anemia hemolítica
- Graves intoxicaciones
- Graves enfermedades infecciosas
- Quemaduras
- Esfuerzo físico intensivo
- Infarto de miocardio
- Lesiones musculares
- Enfermedades musculares progresivas

### Fundamento:

La determinación se basa en efecto de la peroxidasa de la hemoglobina o mioglobina. Éstas catalizan la oxidación del indicador cromático, mediante un hidroperóxido orgánico, produciendo un colorante azul verdoso que, sobre el sector reactivo amarillo, produce un cambio cromático hacia el verde.

Los eritrocitos intactos se hemolizan sobre el papel reactivo. La hemoglobina resultante inicia la reacción cromática alrededor de los eritrocitos, originando puntos verdes bien visibles.

Resultados demasiados bajos o falsos negativos se obtienen en presencia de grandes cantidades de vitamina C.

Resultados falsos positivos pueden ser causados por detergentes fuertemente oxidantes en el recipiente de orina.

## Procedimiento para el Análisis Químico mediante Tiras Reactivas

### Instrucciones: (Orina emitida bien mezclada y no centrifugada)

- 1.- Sumergir la tira reactiva (1 segundo como máximo) en la orina, de manera que todas las zonas de reacción queden húmedas.
- 2.- Al retirar la tira, rozar el canto lateral en el borde del recipiente para eliminar el exceso de orina.
- 3.- Transcurridos 30-60 segundos, comparar las zonas de reacción con la escala cromática de la etiqueta ; la zona de leucocitos se compara a los 15 minutos.

***Nota:*** Los tiempos de lectura variarán de acuerdo al fabricante de las tirillas.

### Observaciones:

Después de sacar la tira reactiva, debe cerrarse inmediatamente el envase contenedor de las tiras, pues éstas son muy sensibles a la acción prolongada de la humedad del aire. Conservar el envase a una temperatura inferior a 30°C.

## Estudio Microscópico del Sedimento Urinario (Estudio Cualitativo)

Es sumamente importante examinar al microscopio el sedimento con una luz atenuada.

Observar, primero, con el pequeño aumento (Objetivo-Ocular 10x10) y luego con el Objetivo 10x40 para una identificación más precisa de los elementos.

El exámen cualitativo o semicuantitativo del sedimento urinario, es adecuado para la mayoría de los propósitos.

### Procedimiento:

Después de mezclar bien la muestra, se depositan en un tubo 13x100 ml, la  $\frac{3}{4}$  parte de orina y centrifugue a 1,500-2,000 rpm durante 5 minutos.

Se descarta el sobrenadante, invirtiendo el tubo completamente. Luego se resuspende el sedimento y se coloca una gota de éste en el portaobjeto, se cubre con un cubreobjeto y se lleva al microscopio.

Enfocar con luz atenuada, primero usar lente y objetivo 10x10 y luego pasar a 10x40 para identificación y reporte.

Deberán ser observados en 10x40 por lo menos unos 10 campos y promediar los hallazgos.

**En una orina normal podremos encontrar:**

■ <b>Glóbulos blancos o leucocitos</b>	<b>3-5/campo</b>
■ <b>Glóbulos rojos o eritrocitos</b>	<b>0-1/campo</b>
■ <b>Cilindros hialinos</b>	<b>0-1/campo</b>
■ <b>Células epiteliales</b>	<b>Escasas</b>
■ <b>Fibras mucosas</b>	<b>Escasas o moderadas</b>
■ <b>Cristales de fosfatos (orinas alcalinas)</b>	<b>Escasos o moderados</b>
■ <b>Cristales de uratos (orinas ácidas)</b>	<b>Escasos o moderados</b>
■ <b>Cristales de oxalato de calcio (orinas neutras)</b>	<b>Escasos o moderados</b>
■ <b>Bacterias</b>	<b>Escasas</b>

**Dos formas de Reporte del Estudio Microscópico del Sedimento Urinario**

Los glóbulos blancos o leucocitos, glóbulos rojos y cilindros, se reportan en números por campo. Los demás mencionados, de las dos siguientes formas:

A

B

*Escasas*

*Escasas*

*Moderadas*

*Algunas*

*Numerosas Abundantes*

**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO HENRÍQUEZ UREÑA**  
**Facultad de Ciencias de la Salud**  
**Escuela de Medicina**  
**Manual de Laboratorio de Patología Clínica**

**Reporte de Exámen de Orina**

**Nombre del Paciente:**

**Edad:**

**Sexo:**

Exámen Físico-Químico			Sedimento Urinario		
	Resultados	V. Normales		Resultados	V. Normales
Color			Glóbulos Blancos		
Aspecto			Glóbulos Rojos		
Densidad Esp			Cél. Epiteliales		
pH			Cél. Ep.Renales		
Glucosa			Bacterias		
Proteína			Levaduras		
C. Cetónicos			Parásitos		
Bilirrubina			Cristales		
Urobilonógeno					
Sangre Oculta			Cilindros		
Hemoglobina					
Nitrito			Fibras Mucosas		
Ácido Ascórbico					

**Observaciones:** \_\_\_\_\_

**Nombre del Estudiante:**

**Matrícula** :

:

**Fecha:**

**Grupo** :

:

**Profesor(a):**

## PRÁCTICA # 3

### HEMOGLOBINA Y HEMATÓCRITO

#### Hemoglobina (Hb)

La hemoglobina se encuentra en el interior de los hematocitos, constituye el 90% del peso seco de los eritrocitos. Está formada por una proteína: la globina y cuatro grupos hemo. La principal función de la hemoglobina es el transporte, a nivel celular, de oxígeno y bióxido de carbono hacia los pulmones.

#### OBJETIVOS GENERALES:

Para su síntesis se requiere de ciertos nutrientes, como son: ácido fólico, cobre, cobalto, nitrógeno, porfirinas. Esta se inicia en el eritroblasto y finaliza en el eritrocito maduro. El eritroblasto convierte el ácido arábico en ácido ortotártárico, el cual se modifica hasta formar la hemoglobina definitiva.

El 65% del hierro absorbido en el intestino en su estado férrico, por la acción de la vitamina C, se utiliza para formar la hemoglobina y forma parte de la mioglobina. El hierro se absorbe en el intestino en su estado férrico, por la acción de la vitamina C, se utiliza para formar la hemoglobina y forma parte de la mioglobina. El hierro se absorbe en el intestino en su estado férrico, por la acción de la vitamina C, se utiliza para formar la hemoglobina y forma parte de la mioglobina.

- 1.- Conducir las pruebas de hemoglobina y hematócrito, y determinar el valor diagnóstico de los resultados.
- 2.- Mantener y organizar el equipo utilizado en condiciones óptimas.
- 3.- Identificar las situaciones clínicas que alteran los resultados de hemoglobina y hematócrito.

El hierro se vuelve a utilizar en la síntesis, y la bilirrubina se elimina, por transformación bacteriana, en el intestino, como estercobilina (heces) o como urobilinógeno en orina, ambos productos, por acción del aire, se convierten en esterobilina y urobilina, respectivamente.

La molécula de Hb, es un tetramero, es decir, está formada por dos pares de cadenas de polipéptidos proteicos. La combinación y proporción de aminoácidos varía con cada especie animal. Las hemoglobinas humanas normales son: Gower I y Gower II, las cuales se encuentran en los tres primeros meses de la embriogénesis; luego, la hemoglobina fetal (HbF); y en el adulto la HbA y HbA<sub>2</sub>. (Fig. #2).

## PRÁCTICA # 3

### Hemoglobina (Hb)

La hemoglobina se encuentra en el interior de los hematíes, constituye el 90% del peso seco de los eritrocitos. Está formada por una proteína: la globina y cuatro grupos hem. La principal función de la hemoglobina es el transporte, a nivel celular, de oxígeno y bióxido de carbono hacia los pulmones.

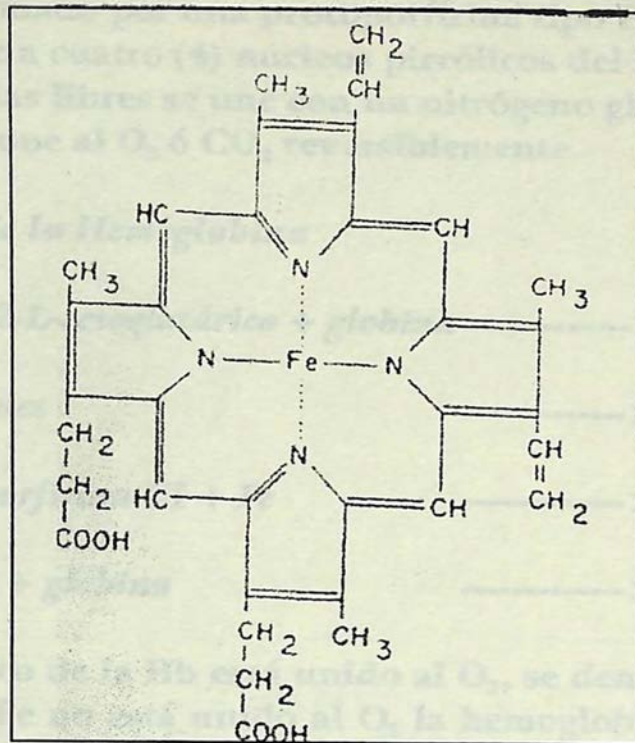
Para su síntesis se requiere de ciertos nutrientes, como son: ácido fólico, cobre, cobalto, nitrógeno, peridoxina. Ésta se inicia en el eritroblasto y finaliza en el eritrocito maduro. El eritroblasto convierte el ácido acético en ácido cetoglutárico, el cual se modifica hasta formar la hemoglobina definitiva.

El 66% del hierro orgánico se encuentra en los eritrocitos, por eso un déficit en la ingesta del hierro lleva los eritrocitos pobres en hemoglobina o hipocrómicos. El hierro se absorbe en el intestino en su estado ferroso, por medio de transporte activo, éste se une a una hemoglobina y forma transferrina, siendo ésta la forma en que se transporta o circula en la economía. A nivel hepático, se combina con una apoferritina y forma ferritina, para así almacenarse hasta que se vaya a utilizar y en ese momento se libera de la apoferritina y vuelve a circular como transferrina, cuando el eritrocito es destruido, la hemoglobina es englobada por el sistema reticuloendotelial y es digerida por una serie de enzimas intracelulares, degradando la hemoglobina (Hb) en hierro (Fe) y bilirubina.

El hierro se vuelve a utilizar en la síntesis, y la bilirrubina se elimina, por transformación bacteriana, en el intestino, como estereobilinógeno en heces y como urobilinógeno en orina, ambos productos, por acción del aire, se convierten en esterobilina y urobilina, respectivamente.

La molécula de Hb es un tetrámero, es decir, está formada por dos pares de cadenas de polipéptidos protéicos. La combinación y proporción de aminoácidos varía con cada especie animal. Las hemoglobinas humanas normales son: Gower I y Gower II, las cuales se encuentran en los tres primeros meses de la embriogénesis, luego, la hemoglobina fetal (HbF) y en el adulto la HbA y HbA<sub>2</sub>. (Fig. #2)





**Figura #2**  
**Tetrámero**

Cuando el hierro de la Hb se oxida al O<sub>2</sub>, se denomina Oxihemoglobina. Cuando el hierro se oxida al O<sub>2</sub>, la hemoglobina está en estado oxidado. En ambos casos se encuentra en estado ferroso (Fe<sup>2+</sup>), cuando el Fe se oxida a estado férrico (Fe<sup>3+</sup>) u oxidado, este pierde su capacidad de unirse al O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> y se forma: Metahemoglobina, Carboxihemoglobina (HbCO) y Sulfhemoglobina, principalmente. Estas hemoglobinas constituyen del 2-12% de la Hb total. Cuando el Hb se oxida de la globina, el grupo proteico se transforma en hematina, pudiendo aislarse de la Hb, con cristales de hematina que son un clorhidrato de hematina. La hemoglobina inactiva sólo se convierte en hematina en soluciones alcalinas; por el contrario, la hemoglobina fetal es resistente a la desnaturalización con álcalis fuertes.

La hemoglobina, en soluciones alcalinas, tiene una carga neta negativa y por lo tanto se mueve hacia el ánodo en un sistema electroforético y su velocidad de migración es proporcional a su carga eléctrica, a mayor carga más lejos migrará.

Para la electroforesis de Hb se usan soluciones tampónes (buffer) y medios de soporte, como son papel, agar y acetato de celulosa. (Fig. #3)

Una vez separadas, las hemoglobinas se pueden manifiestar cada una de ellas con el uso del densitómetro. (Fig. #4)

Hemoglobinemia es la medida de la concentración de hemoglobina en la sangre, expresada por 100 ml (100 ml = 1 decilitro = dl). Los resultados de Hb total en por ciento (%) se hacen cuando arbitrariamente la relación de Hb con el agua es igual a 100%.

El hem está formado por una protoporfirina tipo III y un átomo de Fe, el hierro se une a cuatro (4) núcleos pirrólicos del anillo porfirínico y en sus dos valencias libres se une con un nitrógeno globínico y en la valencia restante se une al  $O_2$  ó  $CO_2$  reversiblemente.

### *Síntesis de la Hemoglobina*

- 1.- *Ácido 2-L-cetoglutarico + globina ----- > pirrol*
- 2.- *4 pirroles ----- > protoporfirina III*
- 3.- *Protoporfirina III + Fe ----- > Hem*
- 4.- *4 Hem + globina ----- > Hemoglobina*

Cuando el hierro de la Hb está unido al  $O_2$ , se denomina Oxihemoglobina. Cuando el Fe no está unido al  $O_2$  la hemoglobina está en estado reducido. En ambos casos el Fe se encuentra en estado ferroso ( $Fe^{++}$ ), cuando el Fe se encuentra en estado férrico ( $Fe^{+++}$ ) u oxidado, éste pierde su capacidad de unirse al  $O_2$  ó  $CO_2$ , y se forma: Metahemoglobina, Carboxihemoglobina (HbCO) y Sulfahemoglobina, principalmente. Estas hemoglobinas constituyen del 2-12% de la Hb total. Cuando el Hem se separa de la globina, el grupo protéico se transforma en hematina, pudiendo aislarse de la Hb, esos cristales de hematina que son un clorhidrato de hematina. La hemoglobina inactiva sólo se convierte en hematina en soluciones alcalinas; por el contrario, la hemoglobina fetal es resistente a la desnaturización con álcalis fuertes.

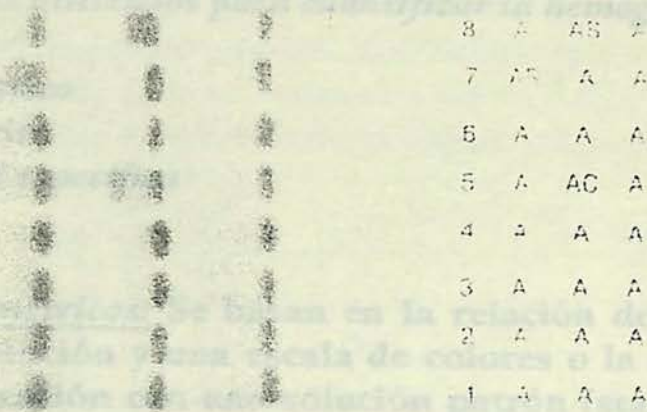
La hemoglobina, en soluciones alcalinas, tiene una carga neta negativa y por lo tanto se moverá hacia el ánodo en un sistema electroforético y su velocidad de migración es proporcional a su carga eléctrica, a mayor carga más lejos migrará.

Para la electroforésis de Hb se usan soluciones tampones (buffer) y medios de soporte, como son: papel, agar y acetato de celulosa. (Fig. #3)

Una vez separadas, las hemoglobinas se pueden cuantificar cada una de ellas con el uso del densitómetro. (Fig. #4)

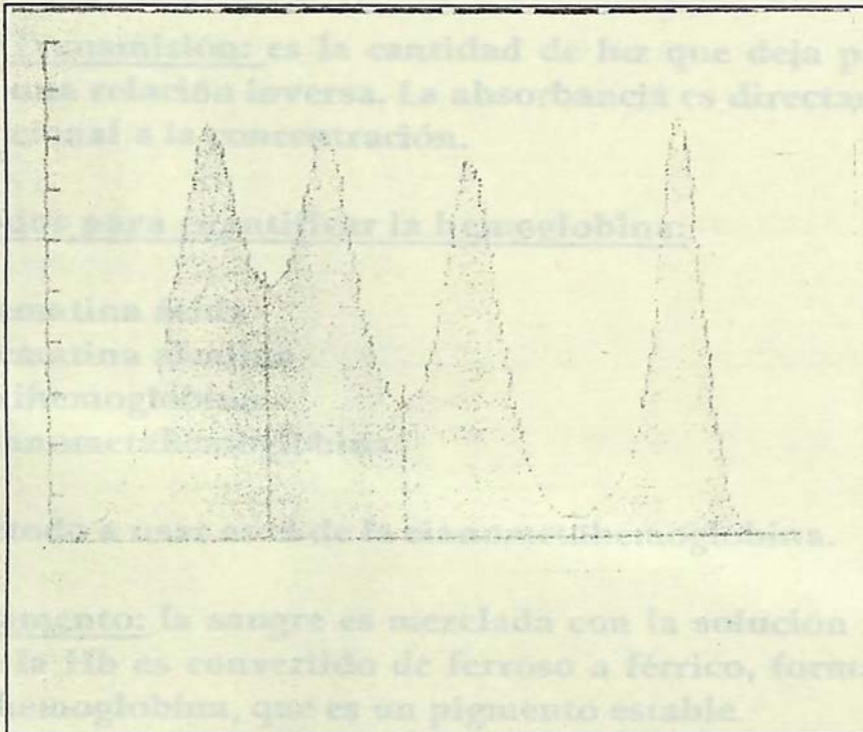
Hemoglobinametría: es la medida de la concentración de hemoglobina en la sangre, expresada por 100ml (=gr./dl 100ml = 1 decilitro = dl). Los resultados de Hb total en por ciento (%) se hacen tomando arbitrariamente la relación de 5 gm/dl son igual a 100%.

HEMOGLOBIN SCREEN — B-2 BUFFER  
CLEARED 30 MIN AT 250 VOLTS



KEY TO  
SEPARATIONS

**Figura #3**  
**Medio de Soporte (Acetato de Celulosa)**



**Figura #4**  
**Patrón Electroforético de Hemoglobina**

El valor clínico del método dependerá de cuatro consideraciones fundamentales: seguridad del método, responsabilidad, rapidez de la determinación y sencillez, desde el punto de vista económico.

*Los principios utilizados para cuantificar la hemoglobina son:*

- 1.- Colorimétrico
- 2.- Gasométrico
- 3.- Gravedad específica
- 4.- Químicos

**Colorimétricos:** Se basan en la relación del color de la sangre en una solución y una escala de colores o la medida de ese color en comparación con una solución patrón (standard) en una celda fotoeléctrica, ya sea por absorción o transmisión.

**Absorción:** es la cantidad de luz que una solución absorbe al incidir sobre ella un rayo de luz, a un largo de onda determinado, en el espectro de la luz.

**Transmisión:** es la cantidad de luz que deja pasar y ésta es una relación inversa. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración.

**Métodos para cuantificar la hemoglobina:**

- 1.- Hematina ácida
- 2.- Hematina alcalina
- 3.- Oxihemoglobina
- 4.- Cianometahemoglobina

El método a usar es el de la cianometahemoglobina.

**Fundamento:** la sangre es mezclada con la solución Drabkins y el Fe de la Hb es convertido de ferroso a férrico, formándose cianometahemoglobina, que es un pigmento estable.

**Muestra:** sangre capilar, sangre venosa con anticoagulante (EDTA).

**Materiales:**

- 1.- Pipetas de sahli (0.02 ml = 20  $\mu$ l)
- 2.- Pipetas serológicas (5 ml ó 10 ml)
- 3.- Gasa y papel parafilm
- 4.- marcadores de ceras

- 5.- Tubos de ensayo (13 x 100 mm)
- 6.- Goma para succión y boquillas
- 7.- Cubetas

### Equipos:

Un colorímetro o espectrofotómetro con una escala de absorción que va desde 0 de absorbancia hasta 2.0, y la transmitancia que va de 0 a 100%, expresado de la siguiente manera: (Fig. #5)

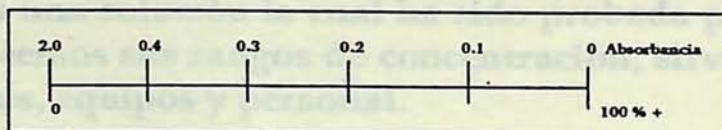


Figura #5

La lectura se anota tres cifras después del punto.

### Reactivo:

Solución de Drabkins.

(Composición)

- 1.- Agua destilada .....1,000 ml
- 2.- Bicarbonato de sodio ..... 1.0 gm
- 3.- Cianuro de potasio (tóxico) ..... 0.05 gr.
- 4.- Ferrocianuro de potasio .....0.20 gr.

### Técnica:

En cuatro tubos de ensayo, Blanco (B), Standard (Std), Control (C), Muestra (M), distribuir:

	Blanco	Std	Control	Muestra
Reactivo de Drabkins	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml
Standard	-	20 $\mu$ l	-	-
Control	-	-	20 $\mu$ l	-
Muestra	-	-	-	20 $\mu$ l

Después de depositar Std, C, M en el fondo del tubo con la pipeta de Sahli, subir y enjuagar la pipeta tres veces en la superficie del reactivo, tapar con el papel parafilm y mezclarlo, dejarlo en reposo por 5 ó 10 minutos.

Leer en cubeta pequeña (10 x 75 mm) en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm (filtro verde).

Con el blanco llevar a cero absorbancia, además sirve para restar o anular la absorción del reactivo. Luego se leerá la absorción del Std, C y M respectivamente.

**Standard o Patrón:** es una solución químicamente pura, de la cual conocemos su concentración y sirve para realizar los cálculos, su concentración viene impresa, según la casa fabricante, en gr./dl.

**Control:** es una solución la cual ha sido probada para varias pruebas y conocemos sus rangos de concentración, sirve para controlar los reactivos, equipos y personal.

**Muestra:** es una sustancia de la cual no conocemos su concentración y por eso la analizamos.

**Datos:**

[ ] = Concentración  
 Abs = Absorbancia  
 [Std] = Concentración Std  
 F = Factor  
 Abs Std = Absorbancia Std  
 Abs C = Absorbancia Control  
 Abs M = Absorbancia Muestra

**Fórmulas:**

(1) Factor

$$F = \frac{[Std]}{Abs Std}$$

(2) Regla de tres

$$\frac{[Std] \times Abs C \text{ ó } M}{Abs Std}$$

**Cálculos:**

(1)

$$[C] = F \times Abs C$$

$$[M] = F \times Abs M$$

(2)

$$[C] = \frac{[Std] \times Abs C}{Abs Std}$$

$$[M] = \frac{[Std] \times Abs M}{Abs Std}$$

Para calcular la Hb en % se ha determinado, arbitrariamente, que 15.0 gr./dl corresponde a 100%.

Ej.: Si un paciente X tiene 12.5 gr./dl de Hb y queremos saber qué % corresponde, hacemos lo siguiente:

15.0 gr./dl -----> 100%  
 12.5 gr./dl -----> X = Hb de ese paciente X

**Valores de referencia de Hb:**

**Recién nacidos = 15-20 gr./dl**

**Al año de nacido = 9-14 gr./dl**

**Adulto hombre = 13-18 gr./dl**

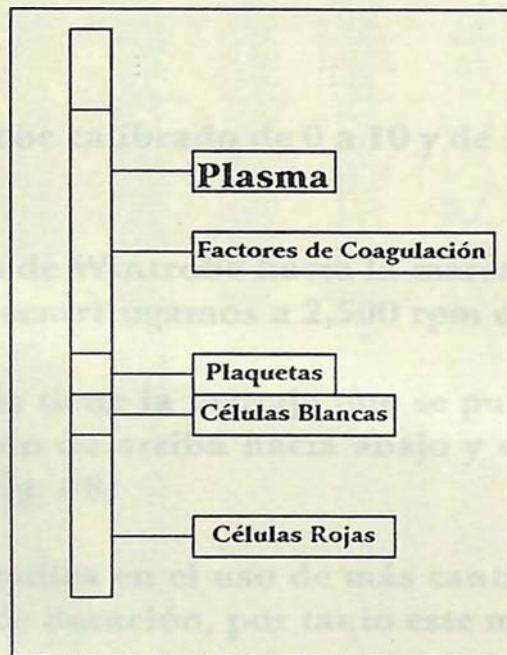
**Adulto mujer = 12-15 gr./dl**

**Hematócrito (Hcto)**

**Hematócrito:** es el volumen de eritrocitos expresados como % del volumen total en una muestra de sangre completa.

**Fundamento:** la sangre es centrifugada y los elementos más pesados se van al fondo del tubo y los más ligeros quedan sobre éstos.

**Sedimentación de abajo hacia arriba:** células rojas, células blancas, plaquetas, factores de la coagulación y plasma. (Fig. #6)



**Figura #6**  
**Microhematócrito Centrifugado**

**Micrométodo:****Materiales:**

- 1.- Tubos capilares con o sin anticoagulantes
- 2.- Masillas para taponar capilares

**Equipo:**

Microcentrífuga calibrada a 2,500 rpm

**Técnica:**

Llenar el capilar las tres cuarta partes del tubo, taponar el extremo inferior con masilla una o dos veces, asegurarse que está bien masillado para que no se derrame la sangre.

Llenar dos capilares y llevar a la microcentrífuga a 5,000 rpm por 5 minutos, luego leer en la tabla para lectura de hematócrito y sacar una media.

**Nota:** entre un capilar y otro no debe pasar de 1.5 la lectura. La lectura se realiza llevando a cero el inicio de los hematócritos y a 100 el final del plasma. El Hcto será el final de la capa de hematíes y se reporta en %.

**Macrométodo:****Equipo:**

Centrífuga.

Tubo de Wintrobe calibrado de 0 a 10 y de 10 a 0 mm. (Fig- #7)

**Técnica:**

Se lleva el tubo de Wintrobe hasta la marca 0-10, se le pone un tapón de goma y centrifugamos a 2,500 rpm durante 30 minutos.

El macrométodo tiene la ventaja que se puede leer también la eritrosedimentación de arriba hacia abajo y el hematócrito de abajo hacia arriba. (Fig. #8)

La desventaja radica en el uso de más cantidad de muestra y tiene mayor tiempo de duración, por tanto este método está obsoleto.

**Valores de Referencia para Micrométodo**

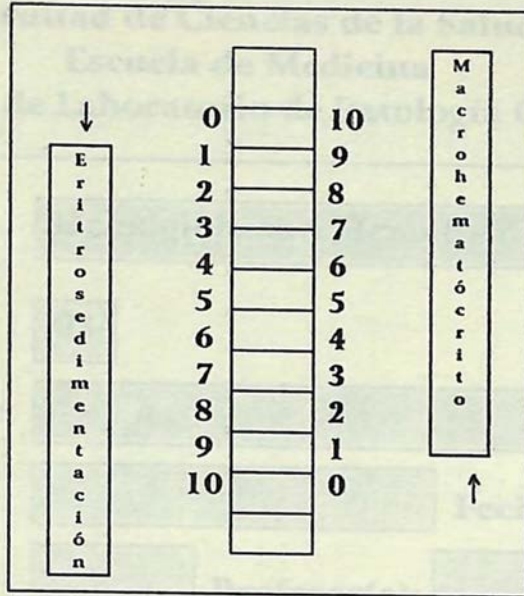
*Recién nacidos = 45-60 %*

*Al año = 27-44 %*

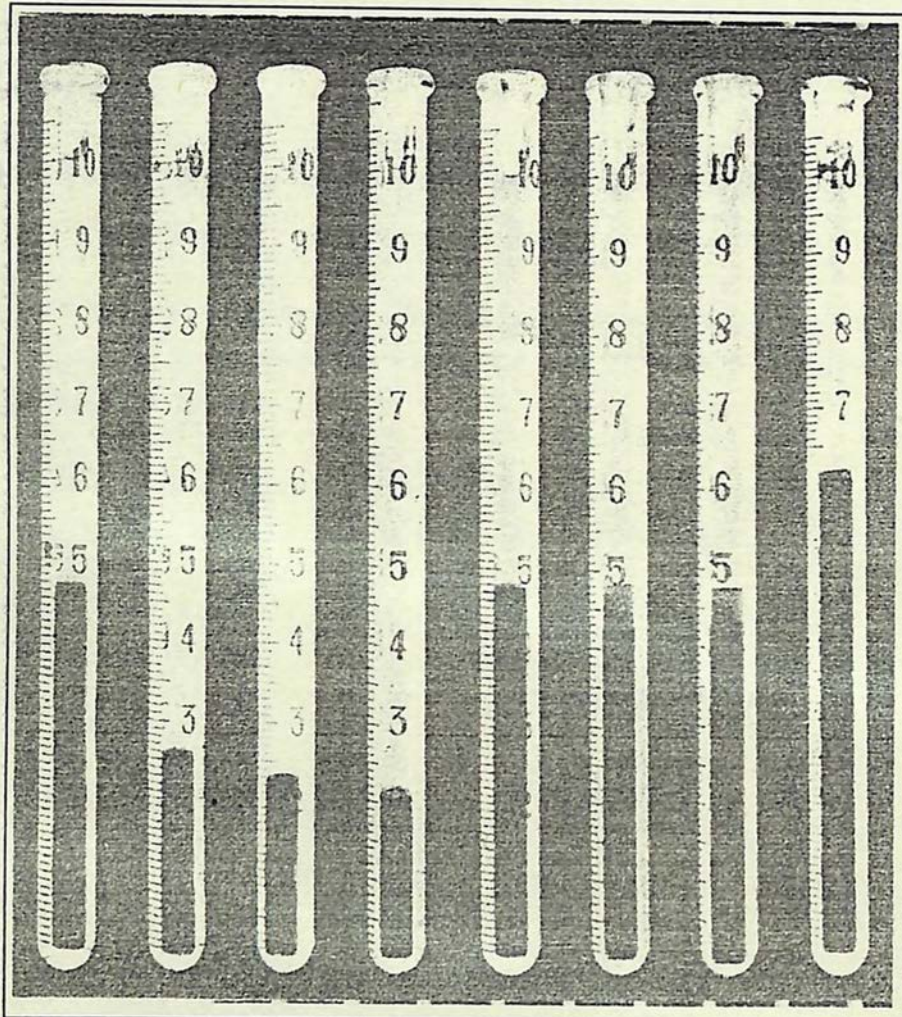
*Adulto hombre = 40-55 %*

*Adulto mujer = 36-48 %*





**Figura #7**  
**Macrohematócrito (Tubo de Wintrobe)**



**Figura #8**  
**Macrohematócritos Centrifugados**  
**Tubos de Wintrobe**

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO HENRÍQUEZ UREÑA  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Escuela de Medicina  
Manual de Laboratorio de Patología Clínica

Nombre de la Práctica : Hemoglobina y Hematócrito

No. de la Práctica : 03

Nombre del Estudiante:

Matrícula :

Fecha:

Grupo :

Profesor(a):

Día :

Hora:

Reactivo(s):

Equipo(s):

- 3- Realizar el conteo del eritrocitos según instrucciones y establecer el valor diagnóstico de los resultados.
- 4- Identificar las situaciones clínicas que alteran los resultados del conteo de eritrocitos.

## PRÁCTICA # 4

### ERITROCITOS O GLÓBULOS ROJOS

#### OBJETIVOS GENERALES:

- 1.- Señalar la importancia clínica del conteo de eritrocitos.
- 2.- Formular los fundamentos de la prueba de eritrocitos.
- 3.- Realizar el conteo del eritrocitos según instrucciones y establecer el valor diagnóstico de los resultados.
- 4.- Identificar las situaciones clínicas que alteran los resultados del conteo de eritrocitos.

#### 1.- Anisocitosis:

Es la variación en el tamaño de las células en una población.

- a) Microcíticas: células de menor tamaño que la población normal.
- b) Macroscíticas: células de mayor tamaño que la población normal.

## PRÁCTICA # 4

### Los Eritrocitos ó Globulos Rojos

El eritrocito maduro es una célula que ha perdido su núcleo, de forma bicóncava o discoidea, con un diámetro promedio de 7 micras, un espesor de 1.3 micras y un volumen corpuscular medio que varía entre 80 y 99 micras cúbicas.

Los eritrocitos poseen una membrana semipermeable y flexible que les permite cambiar de forma, adaptándose al calibre de los pequeños vasos sanguíneos, por donde éstos atraviesan.

Están compuestos por una gran variedad de ácido grasos, fosfolípidos, proteínas aminoácidas, coenzimas y enzimas entre otros. Su vida media es de 120 días y finalmente éstos son removidos de la circulación por el sistema reticuloendotelial, principalmente por el bazo.

La formación de los eritrocitos está regulada por la necesidad de oxigenación de los tejidos y la eritropoyetina, ésta es la hormona responsable de la estimulación de la eritropoyesis. La eritropoyetina se produce, principalmente, en los riñones y en menor grado en el hígado y otros tejidos.

### Las Anemias

Son circunstancias en los que la concentración de hemoglobina y/o conteo de eritrocitos están por debajo de los límites normales. Las causas de las anemias son: hemorragias, deficiencias nutricionales, anomalías morfológicas de los hematíes, eritropoyesis defectuosa y destrucción excesiva de células, ya sea por anomalías intrínsecas o extrínsecas a los eritrocitos.

#### 1.- Anisocitosis:

Es la variación en el tamaño de las células en una población.

- a) Microcíticas: células de menor tamaño que la población normal.
- b) Macrocíticas: células de mayor tamaño que la población normal.

**2.- Poiquilositosis:**

Es la variación en la forma de las células de una población.

- a) **Ovalocitos:** glóbulos rojos de forma ovalada, debido a alteraciones en la membrana eritrocitaria.
- b) **Esferocitos:** glóbulos rojos de forma esferoidal.

**Técnica****Muestra:**

- **Sangre con anticoagulante (EDTA)**
- **Tubo tapón morado**

**Equipos:**

- **Cámara de Neubauer o hematímetro**
- **Cubre hematímetro**
- **Contador normal**
- **Microscopio**
- **Pipeta de Thoma**
- **Boquilla y goma succionadora**

**Reactivos:**

- **Solución de Gower (diluyente)**
- **Salina isotónica 0.9%**

**Métodos:**

- 1.- Normal con cámara de Neubauer
- 2.- Semi-automatizado
- 3.- Automatizado

**Procedimiento:**

- 1.- Limpie la cámara de Neubauer
- 2.- Aspire sangre hasta la marca 0.5, limpie la pipeta y aspire diluyente hasta la marca 101. Mientras se llena la pipeta no deben formarse coágulos ni burbujas. Tape la punta de la pipeta y retire la goma, sujete la pipeta por sus extremos entre los dedos mayor y pulgar de una mano. En posición horizontal, mezcle moviendo hacia arriba y hacia abajo durante tres minutos. Inmediatamente agarre la pipeta y con el dedo índice de esa misma mano, tape el extremo superior de la pipeta y en esa posición vertical descarte la 5 primeras gotas.
- 3.- Aproxime la punta de la pipeta al espacio entre la cámara y

su cubreobjeto y deje penetrar la dilución hasta que cubra la cuadrícula, el líquido no debe llegar a los surcos laterales ni deben formarse burbujas en la cámara, si esto sucede limpie la cámara y vuelva a llenarla. Llene los dos lados de la cámara. Deje la cámara en reposo 1 minuto para que las células se sedimenten.

- 4.- Coloque la cámara en el microscopio y enfoque usando objetivo y ocular 10X. Examine si la distribución de las células es uniforme, en caso contrario repita el llenado del hematímetro.
- 5.- El gran cuadro central está dividido en 400 cuadrados pequeños dispuestos en 25 grupos de 16 cuadrados cada uno, limitado por líneas triples o dobles, cada uno de los 25 grupos. (Ver Figura #9).

Cuente los cuatro cuadrados de las esquinas y el cuadrado del centro del gran cuadrado central.

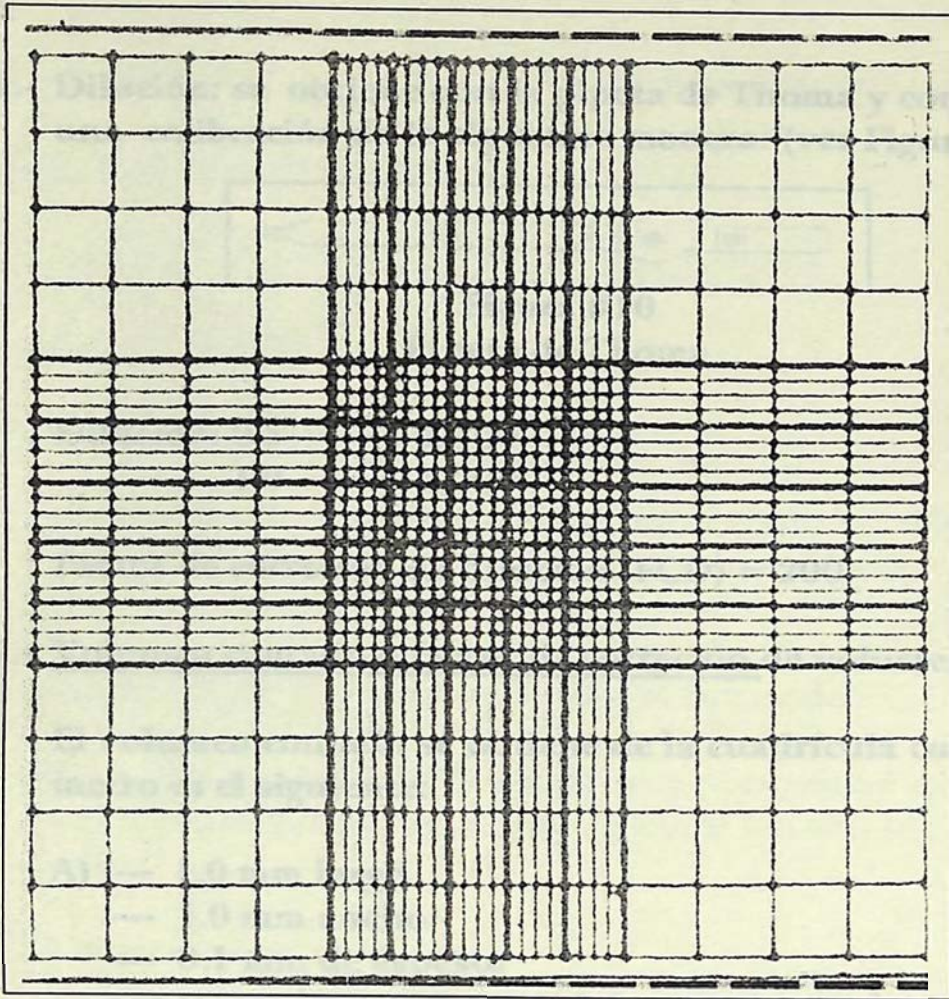
Identifique los 5 cuadrados de la siguiente forma:

- A- Cuadrado superior izquierdo (CSI)
- B- Cuadrado superior derecho (CSD)
- C- Cuadrado inferior derecho (CID)
- D- Cuadrado inferior izquierdo (CII)
- E- Cuadrado Central (CC)

Se contarán en este orden:  $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E$

Se comenzará contando en el extremo superior e izquierdo de la primera fila, se cuentan las células dentro de ese cuadro y las que toquen las líneas izquierda y superior del cuadro. Avanzando hasta el último cuadro de la derecha de la primera fila, bajamos a la segunda fila contando ahora de derecha a izquierda hasta llegar al extremo izquierdo de donde bajamos hacia la tercera fila y contamos igual que como se hizo en la primera fila. En cada cuadrado contamos las células de su interior y las que tocan las líneas izquierda y superior correspondiente a ese cuadrado. Así obtenemos el total de células en A. Repetimos el mismo procedimiento en los 4 cuadrados restantes. Entre grandes cuadrados no debe haber una diferencia mayor de 10 células y entre una cámara y otra de 16 células.

Sume A, B, C, D y E que es el número de células en una camarilla. Repita el mismo procedimiento del otro lado de la cámara y halle el valor promedio de esos 2 conteos.



**Figura #9**  
**Interior**  
**Cámara de Neubauer**

B)  $0.1\text{mm}^3 / 25 = 0.004\text{mm}^3$  es el volumen de cada uno de los grupos.

C) Solo nos interesa 5 cuadrados, tendremos:

D)  $5 \times 0.004\text{mm}^3 = 0.02\text{mm}^3$  será el volumen real contado.

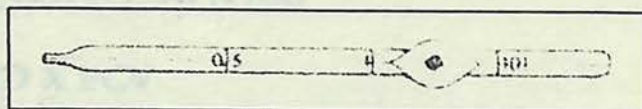
E) Debemos obtener el resultado en  $1\text{mm}^3$  de sangre, por lo tanto realizamos la siguiente operación:

F)  $0.02\text{mm}^3 \rightarrow$  volumen real contado  
 $1\text{mm}^3 \rightarrow$  ?

G)  $\frac{1\text{mm}^3 \times \text{volumen real contado}}{0.02\text{mm}^3} = \text{glóbulos/mm}^3$

Cálculos:

- 1.- Dilución: se obtiene con la pipeta de Thoma y consta de una calibración de la siguiente manera: (ver Figura #10)



**Figura #10**  
**Pipeta de Thoma**

Dilución: 0.5 ----- 1/100

1.0 ----- 1/200

Factor de corrección de dilución (FCD) = 200

- 2.- Volumen contado o factor de corrección de volumen (FCV)

El volumen contado se obtiene de la cuadrícula cuyo perímetro es el siguiente:

A) ---- 1.0 mm largo

---- 1.0 mm ancho

---- 0.1 mm de espesor

por tanto:  $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3$

de donde  $0.1\text{mm}^3$  es el volumen de los 25 grupos de cuadrados.

B)  $0.1\text{mm}^3/25 = 0.004\text{mm}^3$  es el volumen de cada uno de los grupos.

C) Sólo nos interesa 5 cuadrados, tendremos:

D)  $5 \times 0.004\text{mm}^3 = 0.02\text{mm}^3$  será el volumen real contado.

E) Debemos obtener el resultado en  $1\text{mm}^3$  de sangre, por lo tanto realizamos la siguiente operación:

F)  $0.02\text{mm}^3 \rightarrow$  volumen real contado  
 $1\text{mm}^3 \rightarrow$  ?

G)  $\frac{1\text{mm}^3 \times \text{volumen real contado}}{0.02\text{mm}^3} = \text{glóbulos/mm}^3$



$$\frac{1\text{mm}^3}{0.02\text{mm}^3} = 50$$

50 será el factor de corrección de volumen.

### 3.- Factor de corrección (F.C.)

$$\text{F.C.} = \text{FCD} \times \text{FCV}$$

$$\text{F.C.} = 50 \times 200$$

$$\text{F.C.} = 10,000$$

### 4.- Resultado final

(Promedio de eritrocitos contados)  $\times 10,000 = \text{GR/mm}^3$  de sangre. El resultado final se expresa en millones.

Nota: En anemia severa, debemos tomar sangre hasta la marca 1.0 de la pipeta y calcular el factor de F.C.D. y F.C..

En policetemia debemos tomar menos cantidad de muestra y calcular el F.C.D. y F.C. para reducir los errores en ambos casos.

Valores de referencia:

Recién nacidos  $\rightarrow 4.8 \text{ --- } 7.1 \text{ millones GR/mm}^3$

Adultos masculinos  $\rightarrow 4.5 \text{ --- } 6.3 \text{ millones GR/mm}^3$

Adultos femeninos  $\rightarrow 4.2 \text{ --- } 5.5 \text{ millones GR/mm}^3$

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO HENRÍQUEZ UREÑA  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Escuela de Medicina  
Manual de Laboratorio de Patología Clínica

Nombre de la Práctica : Eritrocitos o Glóbulos Rojos

No. de la Práctica : 04

Nombre del Estudiante:

Matrícula :

Fecha:

Grupo :

Profesor(a):

Día :

Hora:

Reactivo(s):

Equipo(s):

1.- Enunciar el principio básico del control de leucocitos.

2.- Aplicar las instrucciones técnicas para la realización del control de leucocitos y analizar los resultados.

3.- Identificar las situaciones clínicas que alteran los resultados del control de leucocitos.

## PRÁCTICA # 5

### LEUCOCITOS O GLÓBULOS BLANCOS

#### OBJETIVOS GENERALES:

- 1.- Describir el carácter clínico del conteo de leucocitos.
- 2.- Enunciar el principio básico del control de leucocitos.
- 3.- Aplicar las instrucciones técnicas para la realización del conteo de leucocitos y analizar los resultados.
- 4.- Identificar las situaciones clínicas que alteran los resultados del conteo de leucocitos.

## PRÁCTICA # 5

### Leucocitos o Glóbulos Blancos

La sangre es un tejido constituido por dos porciones fundamentales: los elementos formes (glóbulos blancos, glóbulos rojos, plaquetas) y el plasma donde se encuentran suspendidos estos elementos figurados.

En el embrión, la sangre es el primer tejido que puede reconocerse y aparece en los islotes sanguíneos del saco vitelino, formando puntos sanguíneos. Posteriormente se inicia la actividad hematopoyética en el hígado y bazo, sucesivamente, hasta llegar a etapas fetales más avanzadas, donde la médula ósea se convierte en el principal centro de actividad hematopoyética. Existen, además, otros focos de hematopoyesis.

Después del nacimiento, y en condiciones normales, la médula sigue siendo el sitio formador de células hemáticas más importante, de ahí se deriva el valor de los estudios medulares en el diagnóstico de enfermedades hematológicas.

Las muestras medulares se obtienen, principalmente, del esternón, crestas ilíacas y en niñas de las caras anterointernas de las tibias. La punción medular debe hacerse después de tener estudios en sangre periférica, exámenes físicos e historia hematológica completos que justifiquen su indicación ya que este procedimiento envuelve ciertos riesgos.

Un hemograma consta de las siguientes determinaciones: hemoglobina, hematócrito, conteo de glóbulos rojos y blancos, conteo diferencial leucocitario, morfología de los hematíes y chequeo de las plaquetas.

El hemograma nos da una visión general de cómo está funcionando el organismo.

El conteo de glóbulos blancos es útil para seguir el curso de ciertas enfermedades. El término leucopenia se utiliza para señalar una disminución de la cantidad total de leucocitos en relación a los valores normales; por el contrario, una leucocitosis denota el aumento de leucocitos por encima de los valores normales de cada caso específico.

Toda leucocitosis súbita nos señala un proceso agudo, mientras los aumentos paulatinos son señales de procesos crónicos por su evolución.

Hay estados patológicos que característicamente cursan con leucocitosis como son: las infecciones bacterianas, enfermedades hemolíticas del recién nacido, úlceras, uremias, apendicitis y leucemias.

Las leucopenias son comunes en pacientes inmunodeprimidos, infecciones virales, artritis reumatoide, lupus eritematoso, cirrosis hepática, etc..

El conteo de glóbulos blancos nos dice la cantidad de células, no nos diferencia el tipo de células como en el recuento diferencial.

### Técnica

#### Muestra:

- Sangre con anticoagulante (EDTA)
- Tubo tapón morado

#### Equipos:

- Cámara de Neubauer o hematímetro
- Cubre hematímetro
- Contador normal
- Microscopio
- Pipeta de Thoma
- Boquilla y goma succionadora

#### Reactivos:

- Solución diluyente (ácido acético 3%, ácido clorhídrico 1%, diluyente de TURK).

#### Métodos:

- 1.- Manual con cámara de Neubauer
- 2.- Semi-automatizado
- 3.- Automatizado

### Procedimiento:

- 1) Limpie la cámara de Neubauer con agua destilada, séquela suavemente con una gasa y coloque el cubrehematímetro sobre las dos cuadrículas de la cámara.

- 2) La pipeta de glóbulos blancos tiene marcas en el tallo capilar de 0.1 hasta 1.0 y luego del bulbo en su unión con el otro tallo capilar llega hasta la marca 11. Con la pipeta unida al tubo de goma y la boquilla, aspire sangre hasta la marca 0.5, limpie el exterior de la pipeta, introduzca la pipeta en el diluyente seleccionado y aspire hasta la marca 11.

Mientras se llena la pipeta no deben formarse ningún tipo de burbujas. Tape la punta de la pipeta y retire la goma, sujete la pipeta por sus extremos entre los dedos mayor y pulgar de la mano. En posición horizontal, mezcle moviendo hacia arriba y hacia abajo durante 3 minutos. Inmediatamente agarre la pipeta entre el mayor y el pulgar, con el índice de esa misma mano, tape el extremo superior de la pipeta y en posición vertical descarte las 3 primeras gotas.

- 3) Aproxime la punta de la pipeta al espacio entre la cámara y su cubre-hematímetro y deje penetrar la dilución hasta que se cubra la cuadrícula, el líquido no debe llegar a los surcos laterales ni deben formarse burbujas en la cámara, si esto sucede limpie la cámara y vuelva a llenarla. Llene los dos lados de la cámara. Deje la cámara en reposo 1 minuto para que las células se sedimenten.

- 4) Coloque la cámara en el microscopio y enfoque usando objetivo y ocular de 10x, los leucocitos en foco se ven como pequeños puntos negros. Para su conteo debe pasarse a objetivo de 40X.

La cámara de Neubauer es un cuadrado de 3mm por lado, dividido en 9 cuadros grandes separados entre sí por líneas dobles o triples.

Cada cuadrado grande mide 1mm por lado. Los cuatro grandes cuadrados de las esquinas están divididos a su vez en 16 cuadrillos.

El gran cuadrado central está dividido en 400 cuadrados pequeños dispuestos en 25 grupos de 16 cuadrados cada uno, limitados por líneas triples o dobles, cada uno de los 25 grupos. (Ver figura #11)

Identifique los 4 grandes cuadrados de las esquinas de la siguiente forma:

- A- Cuadrado superior izquierdo
- B- Cuadrado superior derecho
- C- Cuadrado inferior derecho
- D- Cuadrado inferior izquierdo

Se comienza en este orden A → B → C → D

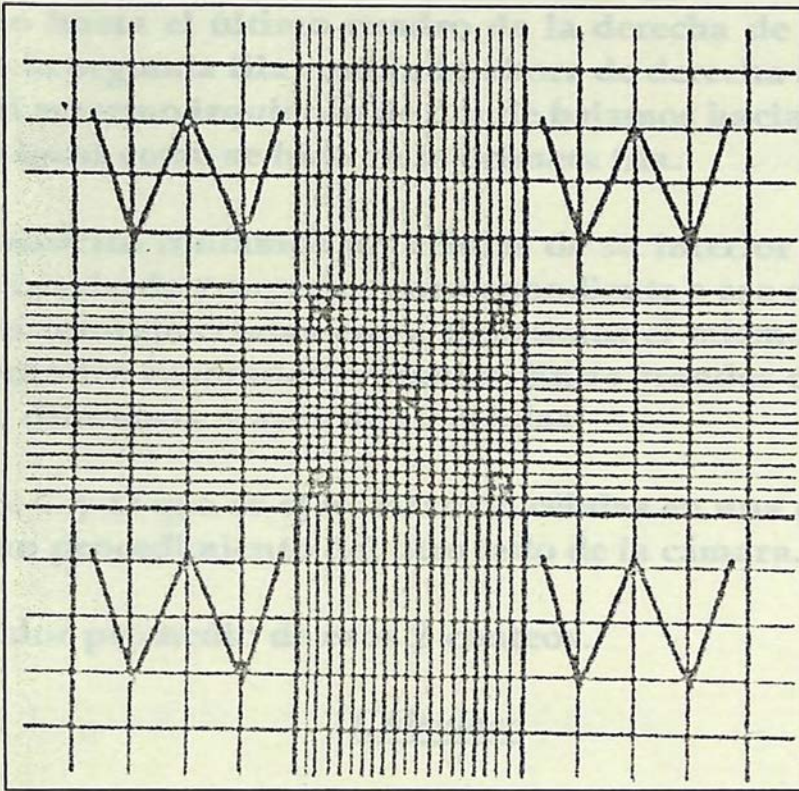
Se comienza contando en el extremo superior e izquierdo de la primera fila, se cuentan las células dentro de ese cuadro y las que tocan las líneas izquierda y superior del cuadro.

Avanzamos  
hacemos  
la línea  
contando

En cada  
las líneas  
contando  
en los 3  
hacer un

Suma A,  
ta el más

Hayte el



a primera fila,  
izquierda, has-  
la tercera fila y

las que tocan  
adrito. Así ob-  
procedimiento  
adros no debe

marilla. Rept-

**Figura #11**  
**Cámara de Neubauer**



**Figura #12**  
**Pipeta de Thoma**

Dilución: 0.5 — 1/10  
1.0 — 1/20

Factor de corrección de dilución (FCD) = 20

Volúmen contado o factor de corrección de volúmen (FCV)

El volúmen contado se obtiene de la cuadrícula, cuyo perímetro es el siguiente:

Se contarán en este orden  $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$

Se comenzará contando en el extremo superior e izquierdo de la primera fila, se cuentan las células dentro de ese cuadro y las que toquen las líneas izquierda y superior del cuadro.

Avanzando hasta el último cuadro de la derecha de la primera fila, bajamos a la segunda fila contando ahora de derecha a izquierda hasta llegar al extremo izquierdo de donde bajamos hacia la tercera fila y contamos igual como se hizo en la primera fila.

En cada cuadrado contamos las células de su interior y las que tocan las líneas izquierda y superior correspondiente a ese cuadrado. Así obtenemos el total de células en A. Repetimos el mismo procedimiento en los 3 grandes cuadrados restantes. Entre grandes cuadros no debe haber una diferencia mayor de 10 células.

Sume A, B, C y D que es el número de células en una camarilla. Repita el mismo procedimiento del otro lado de la cámara.

Halle el valor promedio de esos 2 conteos.

### Cálculos:

- 1) Dilución: se obtiene con la pipeta de Thoma y consta de una calibración de la siguiente manera: (Ver Figura #12)

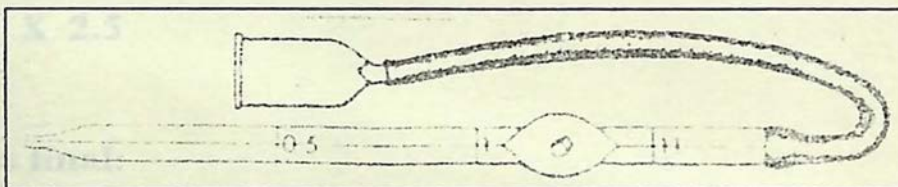


Figura #12  
Pipeta de Thoma

Dilución: 0.5 ----- 1/10  
1.0 ----- 1/20

Factor de corrección de dilución (FCD) = 20

- 2) Volumen contado o factor de corrección de volumen (FCV)  
El volumen contado se obtiene de la cuadrícula, cuyo perímetro es el siguiente:



- a) -- 1.0mm de largo  
 -- 1.0mm de ancho  
 -- 0.1mm de profundidad

Por tanto  $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3$

De donde  $0.1\text{mm}^3$  es el volumen de los 25 grupos de cuadrados

- b) Sólo nos interesa 4 cuadrados grandes, entonces tendremos:

- c)  $4 \times 0.1\text{mm}^3 = 0.4\text{mm}^3$  será el volumen real contado.

- d) Debemos obtener el resultado en  $1\text{mm}^3$  de sangre, por lo tanto, realizamos la siguiente operación:

- e)  $0.4\text{mm}^3 \rightarrow$  Volumen real contado  
 $1.0\text{mm}^3 \rightarrow$  X

$$\frac{1.0\text{mm}^3 \times \text{Volumen real contado}}{0.4\text{mm}^3} = \text{Glóbulos Blancos/mm}^3$$

$$\frac{1.0\text{mm}^3}{0.4\text{mm}^3} = 2.5$$

2.5 será el factor de corrección de volumen.

### 3) Factor de corrección (FC)

$$\text{FC} = \text{FCD} \times \text{FCV}$$

$$\text{FC} = 20 \times 2.5$$

$$\text{FC} = 50$$

### 4) Resultado final:

$$\text{Promedio de GB contado} \times 50 = \text{GB/mm}^3 \text{ de sangre}$$

### Nota:

Si variamos la dilución y/o el volumen contado debemos buscar el factor de corrección apropiado.

Estos se deben variar en leucocitosis y leucopenias para aminorar el error de conteo.

- **Leucopenia:** debemos tomar mayor cantidad de muestra en una pipeta de blanco. Tomamos sangre hasta la marca I y diluyente hasta la marca II.
- **Leucocitosis:** utilizamos una pipeta de rojo, tomamos muestra hasta la marca 0.5 y diluyente ácido acético al 3% hasta la marca 101 y calculamos el FCD y FC.

Para corregir los leucocitos en los cuales aparecen células anormales se debe utilizar la siguiente fórmula:

$$\# \text{ Leucocitos corregido} = \frac{\# \text{ leucocitos/mm}^3 \times 100}{100 \times \# \text{ eritrocitos nucleados}}$$

Valores de referencia:

Recién nacidos	→	5,000 --- 30,000 GB/mm <sup>3</sup>
2 años de edad	→	6,200 --- 17,000 GB/mm <sup>3</sup>
Adultos	→	4,000 --- 11,000 GB/mm <sup>3</sup>

**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO HENRÍQUEZ UREÑA**  
**Facultad de Ciencias de la Salud**  
**Escuela de Medicina**  
**Manual de Laboratorio de Patología Clínica**

**Nombre de la Práctica :**

**No. de la Práctica :**

**Nombre del Estudiante:**

**Matrícula :**  **Fecha:**

**Grupo :**  **Profesor(a):**

**Día :**  **Hora:**

**Reactivo(s):**

**Equipo(s):**

3.- Participar activamente en la discusión de criterios, luego de leer el material correspondiente.

4.- Efectuar un recuento diferencial del extendido y determinar el carácter diagnóstico de los hallazgos.

5.- Mantener y organizar el equipo utilizado en condiciones óptimas.

6.- Identificar las condiciones clínicas que alteran los resultados y hallazgos encontrados en el recuento diferencial.

## PRÁCTICA # 6

### RECuento Diferencial

#### OBJETIVOS GENERALES:

- 1.- Analizar el valor diagnóstico del recuento diferencial del extendido de sangre.
- 2.- Expresar los principios del recuento diferencial.
- 3.- Participar activamente en la discusión de criterios, luego de leer el material correspondiente.
- 4.- Efectuar un recuento diferencial del extendido y determinar el carácter diagnóstico de los hallazgos.
- 5.- Mantener y organizar el equipo utilizado en condiciones óptimas.
- 6.- Identificar las condiciones clínicas que alteran los resultados y hallazgos encontrados en el recuento diferencial.

## PRÁCTICA # 6

### Recuento Diferencial

El recuento diferencial de los leucocitos se realiza para determinar el número relativo de cada tipo de leucocitos presentes en la sangre. Un diferencial completo también incluye el estudio de la morfología de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas, y un estimado del número de leucocitos y plaquetas presentes.

Cuando se hace un hemograma el recuento diferencial debe ser lo último en realizarse para que sirva de chequeo del conteo de leucocitos y eritrocitos, así como también de la hemoglobina y el hematócrito.

Para hacer el diferencial es necesario preparar y teñir frotis de sangre.

### Preparación y tinción de las extensiones de sangre

Hay dos procedimientos para hacer frotis de sangre:

- 1) El método de los cubreobjetos: tiene la ventaja de una distribución más uniforme de los leucocitos, pero por su tamaño y fragilidad son difícil de manejar.
- 2) El método de los portaobjetos: es el más comunmente utilizado, y si es bien realizado la distribución de las células es uniforme.

### Método de los Portaobjetos

#### Material necesario:

- Portaobjetos
- Tubos capilares o aplicadores de madera
- Sangre capilar o venosa colectada con anticoagulante

#### Técnica:

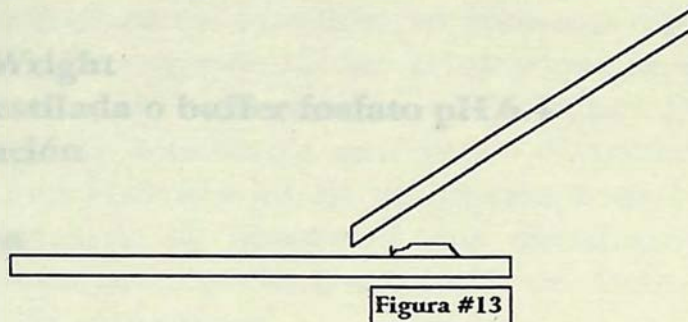
- 1) Obtenga dos láminas de vidrio o portaobjetos limpios. Uno de ellos se utilizará como deslizador, por lo que se debe tener las esquinas redondeadas para que la sangre se pueda esparcir uniformemente.

- 2) Con ayuda de dos aplicadores de madera o un tubo capilar, coloque una gota pequeña de sangre capilar (sin tocar la piel con el portaobjeto) o sangre venosa colectada con anticoagulante y que ha sido bien mezclada, en el centro del portaobjeto aproximadamente a 1cm de los extremos.
- 3) Coloque la lámina sobre una superficie plana y firme de forma tal que la gota de sangre quede colocada a la derecha.
- 4) Sujete el portaobjeto en su extremo izquierdo entre los dedos índice y pulgar de la mano izquierda. Sujete el deslizador con la mano derecha, colocando el dedo pulgar en un borde lateral y los cuatro dedos restantes en el otro borde. Ponga el deslizador enfrente de la gota de sangre, formando un ángulo de aproximadamente  $25^{\circ}$  con el portaobjeto.
- 5) Lleve el deslizador hacia atrás, donde está la gota de sangre. Tan pronto como entre en contacto con ésta, la sangre se esparcirá en los bordes del deslizador. Si esto no ocurre, mueva un poco el deslizador, teniendo el cuidado de que no pase sangre al frente del deslizador.
- 6) Manteniendo el deslizador en un ángulo de  $25^{\circ}$  y el borde del deslizador firmemente contra la laminilla horizontal, empuje el deslizador rápidamente sobre la longitud de la laminilla.
- 7) Los frotis deben secarse rápidamente agitándolos en el aire para prevenir la distorsión de las células. Luego de seco, se identifica escribiendo en su parte más gruesa la identificación del paciente, con un lápiz de grafito o sobre el vidrio con lápiz de cera.

#### Precauciones para hacer buenos frotis:

- 1) Los portaobjetos deben estar bien limpios, libres de grasa, lo que se consigue sumergiéndolos en alcohol. Si no es así, quedarán con agujeros.
- 2) Luego de colocada la gota de sangre en la laminilla, no se debe tardar en hacer el frotis, pues esto ocasiona una distribución anormal de las células blancas, acumulándose las más grandes en los bordes del frotis. También puede ocasionar la formación de fenómeno de Rouleaux y empaquetamiento de las plaquetas.

- 3) La gota de sangre no debe ser ni muy grande ni muy pequeña, lo que trae como consecuencia frotis muy largos o muy cortos, respectivamente.
- 4) El deslizador debe empujarse con una velocidad constante para que el frotis no quede escalonado.
- 5) Debe mantenerse el deslizador formando un ángulo de  $25^\circ$  pues si se aumenta el frotis quedará muy grueso y si se disminuye quedará muy fino. (Ver figura #13)



- 6) El deslizador debe deslizarse por la laminilla completa, si no es así, el frotis terminará en un borde grueso.
- 7) El deslizador debe tener el borde bien pulido para que el frotis quede bien distribuido y no termine en cola de caballo.
- 8) El frotis no debe tocar los bordes del portaobjetos; y debe tener la forma de una lengua. Lo ideal es que el frotis vaya disminuyendo de grosor quedando formado por tres partes de diferente grosor que son:
  - a) Cabeza
  - b) Cuerpo
  - c) Cola
- 9) Si la sangre ha sido colectada con EDTA el frotis se debe hacer en las primeras dos horas después de la colección.

### Tinción de extendidos de sangre:

Para obtener mejores resultados los extendidos deben teñirse dentro de las dos horas después de haberse hecho el frotis. El colorante más comúnmente utilizado es el colorante de Wright, pero se puede utilizar también una mezcla de Wright y Giemsa.

El colorante de Wright es policromático porque produce varios colores; es una mezcla de eosina y azul de metileno. La eosina tiñe los componentes básicos de las células de un color rojo anaranjado, mientras que el azul de metileno tiñe las estructuras ácidas en tonos de azul claro a violeta.

### Técnica de Tinción de Wright

#### Material necesario:

- Colorante de Wright
- Agua recién destilada o buffer fosfato pH 6.4
- Bandeja de tinción
- Goteros
- Gasa o algodón

#### Procedimiento:

- 1) Coloque el frotis seco e identificado en la bandeja de tinción.
- 2) Cubra bien el portaobjetos con colorante. Deje actuar por cinco (5) minutos.
- 3) Luego de los cinco (5) minutos, añada al portaobjetos igual cantidad de buffer o agua recién destilada, evitando que el líquido se desparrame. Mezcle, soplando el líquido suavemente y deje actuar por siete (7) minutos. Debe formarse una película verde brillante sobre el líquido.
- 4) Lave bien el portaobjetos con agua destilada o corriente.
- 5) Limpie la cara posterior de la laminilla con una gasa o algodón, para quitar el colorante que se le haya adherido.
- 6) Deje secar los frotis al aire en posición vertical

**Nota:** Los tiempos de tinción pueden variar entre un frasco de colorante y otro, por lo que hay que determinarlo probando diferentes tiempos.



## Procedimiento para el examen de frotis teñidos:

1) Examine el frotis sanguíneo usando objetivo de bajo poder (10x).

a) Los leucocitos deben estar distribuidos uniformemente.

b) Realice un estimado de los leucocitos.

c) Examine el borde fino del frotis. Si hay un número aumentado de leucocitos en esta área, el recuento diferencial será inexacto. La mayoría de las células que se encuentran en esa área son las más grandes, es decir, neutrófilos y monocitos, lo que demuestra una pobre distribución de los leucocitos en el frotis. Si en esa misma zona hay agregación plaquetaria, se observará una disminución de plaquetas. En estos casos el frotis debe ser descartado y se debe realizar uno nuevo.

d) Es importante anotar cualquier hallazgo irregular, como son las células anormales, formación de Rouleaux.

e) Seleccione el área del frotis donde realizará el recuento diferencial. El lugar ideal es donde se une el cuerpo y la cola del frotis, donde los eritrocitos se superponen ligeramente. Coloque una gota de aceite de inmersión sobre la lámina y cambie el objetivo de inmersión (100x).

2) Realice el recuento diferencial y el examen morfológico de los leucocitos:

a) Comience en la parte fina del frotis, donde los eritrocitos se superponen ligeramente. El movimiento a seguir es gradual y en el sentido indicado por la flecha en el siguiente esquema: (Figuras 14, 15, 16 y 17)

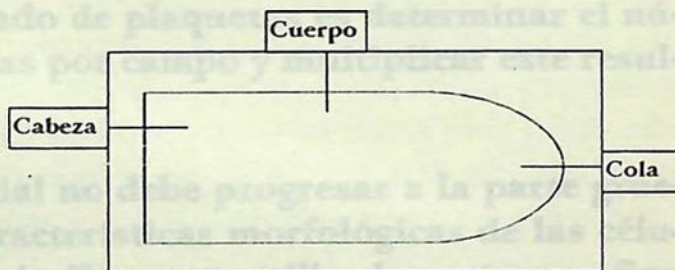
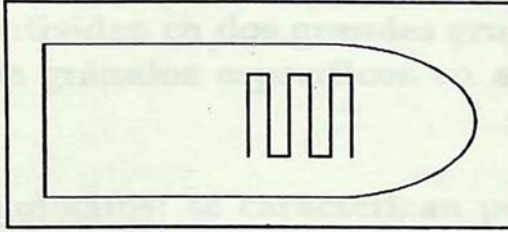


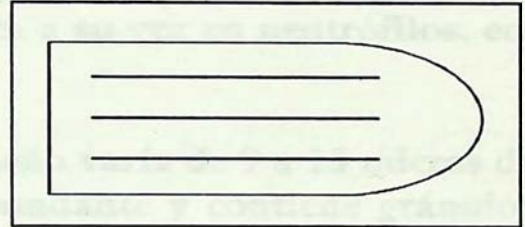
Figura #14

**Método por sección para el conteo diferencial**



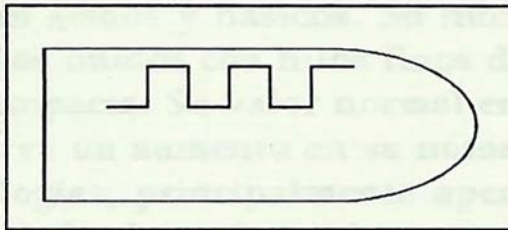
**Figura #15**

**Forma de contar en un diferencial**



**Figura #16**

**Forma de contar en un diferencial**



**Figura #17**

- b) Cuente cada leucocito que observe diferenciándolos hasta contar 100 leucocitos. Anote cualquier anomalía presente en las células.
- 3) Observe la morfología de los eritrocitos en un área fina donde no se encuentren superpuestos pero se encuentren cerca unos de otros. Examine su tamaño, forma, contenido relativo de hemoglobina, policromatofilia, inclusiones y formación de Rouleaux.
  - 4) Examine la morfología y el número de plaquetas presentes. Una forma de calcular el estimado de plaquetas es determinar el número promedio de plaquetas por campo y multiplicar este resultado por 20,000.
  - 5) Cuando realice el diferencial no debe progresar a la parte gruesa del frotis porque las características morfológicas de las células son difíciles de distinguir. Tampoco utilice la parte muy fina donde los eritrocitos aparecen completamente llenos de hemoglobina y sin halo central.

## Características Morfológicas de los Leucocitos

Los leucocitos se dividen en dos grandes grupos, de acuerdo a la presencia o ausencia de gránulos específicos en su citoplasma; estos grupos son:

1) **Los granulocitos:** se caracterizan por la presencia de gránulos específicos en su citoplasma y, según la afinidad de dichos gránulos con los colorantes, se dividen a su vez en neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

1.1 **Neutrófilo segmentado:** su tamaño varía de 9 a 15 micras de diámetro. Su citoplasma es abundante y contiene gránulos específicos de color rosa-violeta que se tiñen tanto con la eosina como con el azul de metileno, es decir, con los colorantes ácidos y básicos. Su núcleo está formado por 2 a 5 lóbulos unidos con hilos finos de cromatina y la cromatina es compacta. Su valor normal en el adulto es de 25-40%. Se observa un aumento en su número o neutrofilia en diversas patologías, principalmente apendicitis, leucemias mielógenas e infecciones bacterianas.

1.2 **Neutrófilo en banda:** siguiendo el orden de maduración del neutrófilo, esta célula es el estado de madurez anterior al neutrófilo segmentado. Presenta de 9 a 15 micras de diámetro, su citoplasma es de moderado a abundante y tiene gránulos específicos. El núcleo tiene forma de bastón o banda porque todavía no se ha dividido o segmentado en lóbulos. La cromatina es gruesa y compacta. Su valor normal en el adulto es de 0-1% y se observa aumento en algunas leucemias mielógenas e infecciones bacterianas.

1.3 **Eosinófilo:** mide de 9 a 15 micras de diámetro, su citoplasma está lleno de gránulos gruesos que se tiñen con la eosina tomando un color rojo anaranjado. Su núcleo usualmente no presenta más de dos lóbulos con cromatina gruesa y compacta. El valor normal en el adulto varía de 1-3% observando eosinofilia (aumento de eosinófilos) en las alergias, leucemia eosinofílica y en las infecciones parasitarias.

**1.4 Basófilo:** mide de 9 a 15 micras de diámetro, su citoplasma es de ligeramente rosado e incoloro y contiene gránulos específicos que se tiñen de color violeta oscuro con el azul de metileno. Estos gránulos son solubles en agua y tienden a desaparecer al teñirse. El núcleo del basófilo no tiene cromatina tan gruesa como la del neutrófilo y el eosinófilo, no está segmentado, pero usualmente presenta una indentación. Los basófilos se encuentran normalmente de 0-1%, aumentan en algunos tipos de leucemia y en intoxicaciones con plomo.

**2) Los agranulocitos:** se caracterizan porque no presentan gránulos específicos en su citoplasma. A este grupo pertenecen los linfocitos y monocitos.

**2.1 Linfocitos.** Se presentan en tres tamaños: pequeño, mediano y grande, variando también la cantidad relativa de citoplasma (mientras más grande es el linfocito mayor cantidad de citoplasma contiene).

**2.1.1 Linfocito pequeño:** tiene un diámetro de 8 a 10 micras, el citoplasma es azul oscuro y escaso. La cromatina del núcleo es densa y apretada y el núcleo puede ser redondo, oval y puede presentar una ligera indentación.

**2.1.2 Linfocito mediano:** mide de 10 a 12 micras de diámetro. El citoplasma es más abundante que el del linfocito pequeño, se tiñe de color pálido a azul y puede o no presentar gránulos inespecíficos (azurófilos). El núcleo es redondo u oval y puede presentar una ligera indentación. La cromatina nuclear es apretada pero no tan densa como la del linfocito pequeño.

**2.1.3 Linfocito grande:** mide de 12 a 16 micras de diámetro. Su citoplasma es esmerilado, de color azul pálido y puede o no contener gránulos azurófilos. Su núcleo puede ser excéntrico y la cromatina es compacta.

En algunas enfermedades como son sarampión, hepatitis, mononucleosis, infecciones y otras infecciones virales hay aumento de linfocitos, los cuales, además, pueden presentar

**cambios morfológicos. Éstos son los llamados linfocitos atípicos que presentan una o mas de las siguientes características:**

- **Forma del núcleo irregular.**
- **Mejor separación entre la cromatina y la paracromatina, es decir, cromatina menos densa.**
- **Aumento en el número de gránulos azurófilos.**
- **Citoplasma más abundante y basofílico. La basofilia puede que no sea uniforme, apareciendo radialmente o en las orillas de la célula.**

Un adulto normal presenta de 25-40% de linfocitos. Se observa linfocitosis (aumento del número de linfocitos) en: leucemias linfocíticas, infecciones virales, mononucleosis infecciosa, etc..

**2.2 Monocito:** Es la célula más grande en sangre periférica, midiendo de 14 a 20 micras de diámetro. Su citoplasma es abundante, de color azul grisáceo y contiene gránulos azurófilos finos que le dan aspecto de vidrio esmerilado. En algunas ocasiones se pueden observar vacuolas ya que la principal función del monocito es la fagocitosis. El núcleo puede tener forma arriñodada o presentar lobulaciones. La cromatina es difusa y abierta. Los valores normales en el adulto varían de 4-10%. Se observa monocitosis en: brucelosis, tuberculosis y leucemia monocítica.

Un hemograma completo debe contener los índices hemáticos que se utilizan para definir el tamaño y contenido de hemoglobina de los eritrocitos. Estos índices se usan para diferenciar y clasificar las anemias. Estos índices son los siguientes:

**1) Volumen Corpuscular Medio (VCM).**

Es el volumen promedio de los hematíes individuales en micras cúbicas.

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hematíes X 100}}{\text{Primeros 2 dígitos de GR.}} = \text{micras}^3$$

**Valores normales: 81-105 micras<sup>3</sup>.**

El VCM indica si los eritrocitos son normocíticos, si el VCM es normal, macrocíticos si el VCM es mayor de 105 micras<sup>3</sup> y microcíticos si el VCM es menor de 81 micras<sup>3</sup>.

**2) Hemoglobina Corpuscular Media (HCM).**

Es el contenido peso promedio de hemoglobina en eritrocitos.

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hemoglobina X 100}}{\text{Primeros 2 dígitos de GR.}} = \mu \mu\text{grs (pico pico gramo)}$$

Valores normales: 27-31  $\mu \mu\text{grs}$

Valores menores de 27  $\mu \mu\text{grs}$  se observan en anemia microcítica y en eritrocitos normocíticos hipocrómicos.

Valores elevados de HCM ocurren en anemias macrocíticas y en algunos casos de esferocitosis.

**3) Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM).**

Es una expresión de la concentración promedio de hemoglobina de los eritrocitos.

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hemoglobina X 100}}{\text{Hematócrito}} = \%$$

Valores normales: 32-36 %

El CHCM indica si las células son normocrómicas (CHCM dentro del rango normal), hipocrómicas (CHCM menor de 32%).

**Nota:** Para obtener el conteo absoluto de las diferentes células blancas, se usará la siguiente fórmula:

$$\text{Conteo absoluto} = \frac{\text{Conteo de Glóbulos blancos X \% Células deseado}}{100}$$

**Valores de referencia del recuento diferencial:**

<b>Células</b>	<b>Al Nacer</b>	<b>4 Semanas</b>	<b>4 Años</b>	<b>6 Años</b>	<b>Adultos</b>
<b>Neutrófilos</b>	<b>37-57%</b>	<b>25-35%</b>	<b>25-45%</b>	<b>45-50%</b>	<b>50-70%</b>
<b>Banda</b>	<b>0-1 %</b>	<b>0-1 %</b>	<b>0-1 %</b>	<b>0-1 %</b>	<b>2-6 %</b>
<b>Eosinófilos</b>	<b>1-3 %</b>	<b>1-3 %</b>	<b>1-3 %</b>	<b>1-3 %</b>	<b>0-4 %</b>
<b>Basófilos</b>	<b>0-1 %</b>	<b>0-1 %</b>	<b>0-1 %</b>	<b>0-1 %</b>	<b>0-2 %</b>
<b>Linfocitos</b>	<b>25-35%</b>	<b>45-65%</b>	<b>40-60%</b>	<b>40-45%</b>	<b>20-44%</b>
<b>Monocitos</b>	<b>4-8 %</b>	<b>5-9 %</b>	<b>4-8 %</b>	<b>4-8 %</b>	<b>2-9 %</b>

Nombre del Estudiante:

Número de la Prueba:

Fecha:

Categoría:

Profesor(a):

Hora:

Hora:

Reservado(s):

Español:

**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO HENRÍQUEZ UREÑA**  
**Facultad de Ciencias de la Salud**  
**Escuela de Medicina**  
**Manual de Laboratorio de Patología Clínica**

**Nombre de la Práctica :**

Recuento Diferencial

**No. de la Práctica :**

06

**Nombre del Estudiante:**

[Redacted]

**Matrícula :**

[Redacted]

**Fecha:**

[Redacted]

**Grupo :**

[Redacted]

**Profesor(a):**

[Redacted]

**Día :**

[Redacted]

**Hora:**

[Redacted]

**Reactivo(s):**

pruebas de hemostasia y coagulación.

**Equipo(s):**

Conocer los fundamentos y técnicas de cada una de las pruebas de hemostasia y coagulación.

1.- Realizar las pruebas de coagulación y comprender sus resultados.

2.- Conocer el valor del equipo a utilizar en las pruebas de hemostasia y coagulación y la importancia del uso adecuado.

3.- Elegir las pruebas de hemostasia y coagulación adecuadas según caso clínico.



## PRÁCTICA # 7

### HEMOSTASIS Y COAGULACIÓN

#### OBJETIVOS GENERALES:

- 1.- Conocer las generalidades del contenido de las pruebas de hemostasis y coagulación.
- 2.- Conocer los fundamentos y técnicas de cada una de las pruebas de hemostasis y coagulación.
- 3.- Realizar las pruebas de coagulación y comprender sus resultados.
- 4.- Comprender el valor del equipo a utilizar en las pruebas de hemostasis y coagulación y la importancia del uso adecuado.
- 5.- Elegir las pruebas de hemostasis y coagulación adecuadas según caso clínico.

## PRÁCTICA # 7

### Hemostasis y Coagulación

#### Hemostasis

Hemostasis es el proceso que retiene la sangre dentro del sistema vascular. Cuando se lesiona un vaso sanguíneo, el proceso hemostático está diseñado para reparar el daño y detener la hemorragia.

Ocurre en cuatro fases:

- 1) Vasoconstricción de los vasos dañados.
- 2) Aglutinación y adherencia de las plaquetas a los vasos dañados.
- 3) Coagulación de la sangre.
- 4) Fibrinolisis del coágulo formado.

La respuesta más inmediata al sangrado es la vasoconstricción, que disminuye el flujo de sangre a través del vaso sanguíneo herido. Las plaquetas, entonces, se agrupan y se adhieren al vaso sanguíneo en el área lesionada para formar un tapón y después inhibir el sangrado.

Los factores de coagulación presentes interactúan formando una malla o coágulo de fibrina y parar el sangrado completamente. Comienza una lisis lenta del coágulo y la reparación final del sitio dañado toma lugar.

La hemostasis y coagulación son mecanismos altamente complejos, los cuales hoy están sólo parcialmente entendidos.

#### Coagulación

La complejidad del proceso de coagulación se ha hecho más difícil, por el gran número de nombres diferentes dados a los 14 factores de coagulación. Para evitar esta confusión un "Comité Internacional de Nomenclatura de los Factores de Coagulación Sanguínea", ha establecido que

cada uno de los 14 factores estén dados en números romanos. También por sus nombres comúnmente utilizados.

- Factor I (Fibrinógeno)
- Factor II (Protrombina)
- Factor III (Tromboplastina tisular, Trombokinas)
- Factor IV (Calcio)
- Factor V (Proacelerina, Factor Lábil)
- Factor VII (Proconvertina, Factor estable)
- Factor VIII (Factor antihemofílico A, Globulina antihemofílica)
- Factor IX (Factor antihemofílico B, componente de tromboplastina plasmática, Factor Christmas)
- Factor X (Factor Stuart, Factor Stuart-Prower)
- Factor XI (Antecedente de tromboplastina plasmática)
- Factor XII (Factor de Hageman, Factor de Contacto)
- Factor XIII (Factor estabilizante de fibrina, fibrinasa)
- Factor Fletcher (Precalicroína)
- Factor Fitzgerald (Kininógeno de alto peso molecular, KAPM)

El proceso de coagulación está dividido en dos (2) sistemas: el intrínseco y el extrínseco. Todos los factores del sistema intrínseco están contenidos en la sangre. El sistema extrínseco libera tromboplastina, la cual proviene de las células y tejido dañado.

Las reacciones del sistema intrínseco son iniciadas por varios estímulos que no están claramente definidos; entre ellos, el daño tisular y el contacto con colágeno. Luego de iniciarse el sistema intrínseco, ocurren dos eventos importantes, que son: la alteración de las plaquetas y la activación del factor XII. La alteración de las plaquetas resulta en agregación plaquetaria irreversible y liberación de diferentes componentes, entre ellos: fosfolípidos (factor III). El factor XII forma complejos con el factor XI, luego los factores IX, VIII, los fosfolípidos y los iones de calcio activan el factor X. El factor X activado, más el factor V, fosfolípidos e iones de calcio, convierten la protrombina en trombina. Luego intervienen los factores I y XIII para formar un coágulo de fibrina estable.

El sistema extrínseco es activado por el daño tisular. Cuando las células sufren un trauma, se libera un extracto tisular llamado factor III. Este extracto contiene fosfolípidos, los cuales, conjuntamente con el factor VII e iones de calcio, activan el factor X, el cual junto con los fosfolípidos e iones de calcio convierten la protrombina en trombina. Luego actúan los factores I y XIII formando, como resultado, un coágulo de fibrina estable.

Como se puede observar, ambos sistemas culminan en la formación de un coágulo de fibrina y tienen una vía común a partir de la activación del factor X (Ver esquema).

El proceso de la coagulación también puede ser dividido en tres etapas:

- 1.- **Generación de tromboplastina plasmática.** En el sistema intrínseco incluye desde la activación del factor XII hasta la activación del factor X. En el sistema extrínseco consiste en la activación del factor X partiendo de la acción de la tromboplastina tisular.
- 2.- **Formación de trombina a partir de la protrombina.**
- 3.- **Formación de fibrina a partir del fibrinógeno.**

Es importante señalar que en el sistema extrínseco se requieren, aproximadamente, 20 segundos para coagular, mientras en el sistema intrínseco se necesitan de 2 a 3 minutos para la formación de trombina.

### Factores de Coagulación

Los factores de coagulación pueden ser divididos en tres grupos funcionales, basados en sus propiedades.

- 1.- Grupo fibrinógeno o Grupo sensible a la trombina: estos son I, V, VIII y XIII. Se consumen durante el proceso de coagulación, por lo que están presentes en el plasma y ausentes en el suero. Los factores V y VIII son susceptibles a la desnaturalización. La vitamina K no es necesaria para la síntesis de los factores que pertenecen a este grupo. Se ha observado aumento en las concentraciones de estos factores en las respuestas inflamatorias y en el embarazo. Éstos se producen en el hígado, aunque el factor VIII puede ser producido en varios sitios, incluyendo al mismo hígado, y el factor XIII talvez sea producido por éste órgano.
- 2.- Grupo protrombina o grupo dependiente de la vitamina K: éstos son II, VII, IX y X. Se producen en el hígado, para lo cual es necesario la vitamina K. Las drogas que contienen cumarina inhiben la vitamina K, lo que causa disminución de estos factores. Se preservan bien en plasma almacenado. Los factores VII, IX y X no se consumen en la coagulación, por lo que están presentes en suero.

- 3.- **El grupo de contacto**: incluye los factores XI y XII los cuales no dependen de la vitamina K y no se consumen durante el proceso de coagulación. Éstos se producen en el hígado, aunque el sitio donde se produce el factor XII no se conoce.

### **Procedimientos de Coagulación**

Para que las pruebas de coagulación arrojen resultados confiables y exactos es necesario observar los siguientes requisitos:

- 1.- El punto final de muchas pruebas de coagulación es la formación de un pequeño coágulo de fibrina, por esto, un área iluminada es muy importante, con un contraste negro, para facilitar la lectura.
- 2.- La cristalería debe estar escrupulosamente limpia y libre de polvo y ralladuras. Dentro de las posibilidades, se prefieren descartables. Los residuos de detergentes tienden a dejar una película en las paredes, que provoca alargamiento de la formación del coágulo.
- 3.- Las pipetas usadas deben tener punta ancha para facilitar el rápido pipeteo.
- 4.- Muchos estudios de coagulación son llevados a cabo a 37°C, por lo que debe esperarse que las muestras alcancen la temperatura. Un sobrecalentamiento o prolongado a 37°C pueden destruir algunos factores y prolongar el tiempo de coagulación debido al deterioro, principalmente, del factor V.
- 5.- La exacta proporción de anticoagulantes es muy importante, el citrato de sodio a 3.8%, por su habilidad para preservar los factores II y VIII, es usualmente el de elección.
- 6.- La venipuntura debe ser muy buena, evitando trauma excesivo, ya que la contaminación de la sangre con tromboplastina tisular traería como consecuencia resultados erróneos.
- 7.- La medida del tiempo debe ser exacta. Muchos de los procedimientos ocurren en 1/10 de segundo, por lo que el tiempo de inicio y de detener el cronómetro debe ser muy preciso.

- 8.- Nunca debe usarse plasma hemolizado para estudios de coagulación ya que tienden a dar tiempos de coagulación acortados.
- 9.- Las muestras deben ser centrifugadas tan pronto sea posible y descartado el plasma; esto debe hacerse dentro de los 30 minutos iniciales. El plasma, como regla general, debe ponerse en hielo y la prueba realizarse prontamente.
- 10.- Usar un control normal de plasma.
- 11.- Chequear antes de centrifugar con aplicadores de madera para asegurar que no existen coágulos.
- 12.- No usar superficies heparinizadas ya que la heparina inhibe la formación de trombina y provoca tiempos de coagulación muy alargados.

### Tiempo de Sangría

Es una medida de hemostasis y coagulación. Depende de la eficiencia del líquido tisular en la aceleración del proceso de coagulación, la función capilar y plaquetas. Especialmente las plaquetas: el número de plaquetas sanguíneas presentes y su habilidad para formar un tapón plaquetario. Los tiempos de sangría prolongados generalmente se encuentran en conteos de plaquetas por debajo de  $50,000/\text{mm}^3$  y cuando hay disfunción plaquetaria como el caso de la enfermedad de Von Willebrand. Hay tres métodos: Método de Duke, Método de Mielke y el Método de Ivy, que es el de elección.

### Reactivos y Equipos

Esignomanómetro, lanceta estéril descartable, capaz de hacer una herida de 1mm de largo y 3mm de espesor, cronómetro, papel de filtro, alcohol, gasa y algodón.

### Principio

Dos punciones estandarizadas en el antebrazo y el tiempo requerido para realizar el sangrado es registrado.

## Procedimiento

- 1.- Ponga el esfignomanómetro en el brazo del paciente por encima del codo. Aumente la presión hasta 40mm de mercurio y fíjelo para todo el procedimiento.
- 2.- Limpie el área del antebrazo con alcohol y deje secar.
- 3.- Escoja el área, aproximadamente de 3 dedos por debajo del pliegue del codo. Agarre el brazo fuertemente. Haga dos (2) heridas estándares (3mm de profundidad) evitando venas subcutáneas. Ponga en marcha el cronómetro tan pronto sangre una de las heridas.
- 4.- Seque la sangre de las heridas c/30 segs. El papel de filtro no debe tocar la piel en ningún momento.
- 5.- Cuando el sangrado cese, detenga el cronómetro y quite la presión.
- 6.- Registre el tiempo de sangrado y reporte el resultado.

El método de Ivy tiene un rango normal de 1 a 7 mins. y un sangrado de 7 a 11 mins. es considerado como el límite superior. Si un sangrado continúa más de 15 mins., se debe detener el procedimiento. Debe repetirse en el otro brazo. Si ocurre igual, se reporta "Mayor de 15 mins."; si es menor de 1 min. O mayor de 6 mins. también debe repetirse. Muchas veces las irregularidades se deben a la no estandarización de las heridas.

## Método de Duke

Se escoge el lóbulo de la oreja y se hace una herida con una lanceta estéril y se registra el tiempo de sangrado.

El tiempo de sangrado normal por el método de Duke es de 1 a 3 mins. y de 3 a 6 mins. se considera el límite superior.

## Método de Mielke

Es el Ivy estandarizado con 1 mm de profundidad y el tiempo de sangrado normal por el método de Mielke es de 3.5 a 10 mins..

### Significado Clínico

El tiempo de sangría está incrementado en:

- 1) Cualquier desorden vascular, como la púrpura alérgica y la púrpura simple.
- 2) Cualquier desorden plaquetario (trombocitopenias) y cualquier desorden cualitativo de las plaquetas, como la enfermedad de Von Willebrand y la enfermedad de Glanzmann.
- 3) Coagulación intravascular diseminada.
- 4) Afibrinogenemia congénita (50% de los casos).

### Tiempo de coagulación de sangre total

Teóricamente se miden todas las etapas de coagulación en el sistema intrínseco. Su uso como prueba de rastreo es limitada. En esta prueba de coagulación, la mayor parte del tiempo es consumido en la producción del activador de protrombina (tromboplastina plasmática), requiere algunos segundos para convertir protrombina a trombina y fibrinógeno a fibrina, por esto, deficiencias moderadas de las etapas 2 y 3 de la coagulación no significarán que el tiempo de coagulación se prolongue, sólo es influenciado, principalmente, por defectos en la etapa 1 del proceso de coagulación.

### Significado Clínico

El tiempo de coagulación estará aumentado en:

- 1) Hemofilia A
- 2) Hemofilia B
- 3) Estados fibrinolíticos severos
- 4) Afibrinogenemia
- 5) Anticoagulantes circulantes (inhibidores)

Es usado como monitor de la terapia con heparina, usado en el tratamiento de desórdenes tromboembólicos.

### Método Lee y White

Reactivos y equipos:



- Baño de agua a 37°C
- Tubos de 12 x 75mm
- Cronómetro
- Jeringuillas

### Muestra

- Sangre fresca, 4ml

### Principio

El tiempo de coagulación de la sangre total es el tiempo requerido para que una cantidad fija de sangre se coagule "In Vitro", bajo ciertas condiciones específicas, mide la actividad de los procoagulantes.

### Procedimiento

- 1) Marcar 3 tubos de 12 x 75mm #1, #2 y #3.
- 2) Realizar una extracción aséptica y sacar 4ml de sangre. Active el cronómetro tan pronto la sangre entre a la jeringuilla (si es de vidrio).
- 3) Una vez extraída la sangre, quite la aguja a la jeringuilla y ponga 1ml de sangre en el tubo #3, luego en el #2 y por último en el tubo #1. Si ha utilizado jeringuilla plástica, active el cronómetro al colocar la sangre en el tubo #3.  
El mililitro de sangre restante debe ser descartado.
- 4) Coloque los tres tubos a 37°C.
- 5) Luego de, exactamente, 5 minutos, mueva el tubo #1 suavemente. Repita este procedimiento cada 30 segs., hasta que el tubo #1 se pueda invertir sin que se derrame el contenido, es decir, hasta que la sangre que contiene haya coagulado completamente.
- 6) 30 segundos después que la sangre del tubo #1 ha coagulado incline suavemente el tubo #2 cada 30 segundos hasta que se coagule su contenido. Luego repita este procedimiento con el tubo #3, hasta que la sangre que contiene se coagule, detenga el cronómetro inmediatamente.

- 7) Como la manipulación y agitación aceleran el proceso de coagulación, el tiempo de coagulación de sangre total, es decir, el resultado de la prueba, queda determinado por el tiempo que tarde en coagularse el tubo #3. Este tubo es en el que se coloca la sangre primero y se activa el cronómetro, es el que pasa más tiempo en reposo, por lo tanto es el que está menos afectado por la manipulación.

Es muy importante colocar 1ml exacto, ya que cantidades mayores prolongan y menos de 1ml acortan el tiempo de coagulación.

Muestras hemolizadas acortan el tiempo a causa de la tromboplastina tisular, igualmente agitación innecesaria.

Temperatura por debajo de 37°C retarda el tiempo de coagulación.

Se sugiere que uno de los tubos quede a 37°C para chequear, después de 2 y 4 horas, para la retracción del coágulo. También puede dejarse toda la noche y chequearse, al otro día, una lisis anormal del coágulo.

Los valores normales van de 5 a 15 minutos.

Hay otros métodos en desuso como la técnica de portaobjetos para observar el hilo de fibrina y la técnica del capilar sin anticoagulante con el mismo fin.

### Significado Clínico

El tiempo de coagulación estará aumentado en: hemofilia severa, estado fibrinolítico severo, afibrinogenemia, hemofilia A, hemofilia B.

### Tiempo de protrombina

Esta prueba de coagulación es muy usada como procedimiento de elección para deficiencias de los factores II, V, VII y X envueltos en el mecanismo extrínseco. Puede ser utilizado para seguir el curso de la terapia con anticoagulantes en pacientes que están recibiendo drogas cumarinas, las cuales inhiben los factores II, VII, IX y X.

### Método de Quick: Tiempo de protrombina en una etapa

### Reactivos y equipos

- Baño a 37°C
- Mezcla de cloruro de calcio y tromboplastina
- Plasma control normal
- Tubos de 12 x 75mm
- Pipetas de 0.2ml y 0.1ml

### Muestra

Sangre colectada con citrato de sodio al 3.8%. Luego de centrifugada a 2,500 r.p.m. durante 10 mins. (la proporción de sangre: citrato es de 9:1). Se separa el plasma de las células y se coloca en la nevera o en agua con hielo.

### Fundamento

El calcio de la sangre total del paciente se une al citrato de sodio, evitando la coagulación. La tromboplastina tisular a la que se ha añadido calcio se mezcla con el plasma y se anota el tiempo que el plasma tarda en coagular.

### Procedimiento

- 1) Para cada paciente o control, incube 0.7ml de tromboplastina a 37°C, entre 5 a 10 mins..
- 2) En otro tubo de 12 x 75mm incube 0.1ml de plasma a 37°C durante 1 a 2 mins..
- 3) Pasado el tiempo de la incubación, agregue 0.2ml de tromboplastina al tubo que contiene 0.1ml de plasma, simultáneamente ponga a caminar el cronómetro.
- 4) Mezcle la muestra e inmediatamente saque el tubo del baño y mueva el tubo hasta que se observen los hilos de fibrina, en ese momento detenga el cronómetro.

Hágase la prueba en triplicado y se reporta el promedio.

Valor normal = 11 a 15 segs.

Diferencia entre triplicado = 0.5 segs.

### Significado Clínico

El tiempo de protrombina estará aumentado en:

- 1) Enfermedades hepáticas como la hepatitis
- 2) Deficiencia de vitamina K
- 3) Deficiencia de factores V, II, VII y X.
- 4) En la coagulación intravascular diseminada
- 5) En terapias con drogas cumarinas
- 6) Inhibidores.

### Tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT)

Esta es una prueba sencilla muy usada como procedimiento de rutina en desórdenes de coagulación. Mide los factores de coagulación que intervienen en el sistema intrínseco, exceptuando el factor XIII y las plaquetas, ya que uno de los reactivos es un sustituto de las plaquetas.

### Significado Clínico

El tiempo estará aumentado en:

- 1) Hemofilia A
- 2) Hemofilia B
- 3) Deficiencia factores XII y XI
- 4) La coagulación vascular diseminada
- 5) Enfermedades hepáticas como la cirrosis y la hepatitis
- 6) Deficiencia de vitamina K

### Reactivos y Equipos

- Baño a 37°C
- Tubos de ensayo de 12 x 75mm
- Cronómetro
- Cloruro de calcio 0.025 m
- Tromboplastina parcial activada
- Plasma control normal
- Pipetas 0.2ml

### Muestra

Sangre colectada con citrato de sodio al 3.8%, la proporción sangre: anticoagulante es de 9:1. Luego se centrifuga a 2,500 r.p.m., durante 10 mins.. Se separa el plasma de las células y se coloca en la nevera o en agua con hielo.

## Fundamento

El calcio de la sangre total se une con el anticoagulante para prevenir la coagulación. Luego de la centrifugación, el plasma contiene todos los factores del sistema intrínseco de la coagulación, excepto el calcio y las plaquetas.

Se añade al plasma calcio, un fosfolípido (sustituto de las plaquetas) y tromboplastina parcial activada. El tiempo requerido para que el plasma se coagule es el tiempo de tromboplastina parcial activada.

## Procedimiento

- 1) Incube de 5 a 10 mins. 0.7ml de cloruro de calcio por cada paciente o control en un tubo 12 x 75mm y déjele la pipeta dentro del tubo.
- 2) En otro tubo mezcle 0.1ml de plasma con 0.1ml de trombofax o la casa comercial que se esté usando, e incube de 3 a 5 min..
- 3) Pasado el tiempo de incubación añada 0.1ml de cloruro de calcio a la mezcla de trombofax-plasma y active el cronómetro. Mezcle el contenido y deje 20 segs. a 37°C.
- 4) Saque del baño y mueva hasta observar la formación de los hilos de fibrina y detenga el cronómetro.

Hágase la prueba en triplicado y se reporta el promedio.

Valor Normal = de 35 a 45 segs.

Diferencia entre triplicado = 1.5 segs.

## Conteo de plaquetas

Las plaquetas mantienen la integridad capilar. En ausencia de las plaquetas los glóbulos rojos sangrarán a través de las paredes de los vasos en gran número. Por esto las plaquetas juegan un papel mayor en el proceso hemostásico. Dentro de los dos primeros segundos después de la herida del vaso, las plaquetas se ponen en contacto y se adhieren al tejido dañado. El ADP que liberan las plaquetas y el tejido dañado causa que éstas se peguen unas a otras (In vivo: cohesión, In vitro: agregación plaquetaria) hasta que el sitio del daño es sellado.

El conteo de plaquetas es de mucha ayuda en el diagnóstico de los desórdenes de coagulación.

Los valores normales varían de 150,000-400,000 por  $\text{mm}^3$  de sangre. Un aumento en el conteo de plaquetas es llamado trombocitosis y se puede observar en: policitemia vera, trombocitemia idiopática, leucemia mielógena crónica y deficiencia de hierro y luego de esplenectomía. Trombocitopénica es la disminución en el número de plaquetas y ocurre en: púrpura trombocitopénica, anemia aplásica, leucemias agudas, enfermedad de Gaucher, anemia megaloblástica como la anemia perniciosa y, en algunos casos la coagulación intravascular diseminada, luego de quimioterapia y radioterapia. Cuando hay marcada trombocitopenia hay una retracción del coágulo pobre y un tiempo de sangría prolongado.

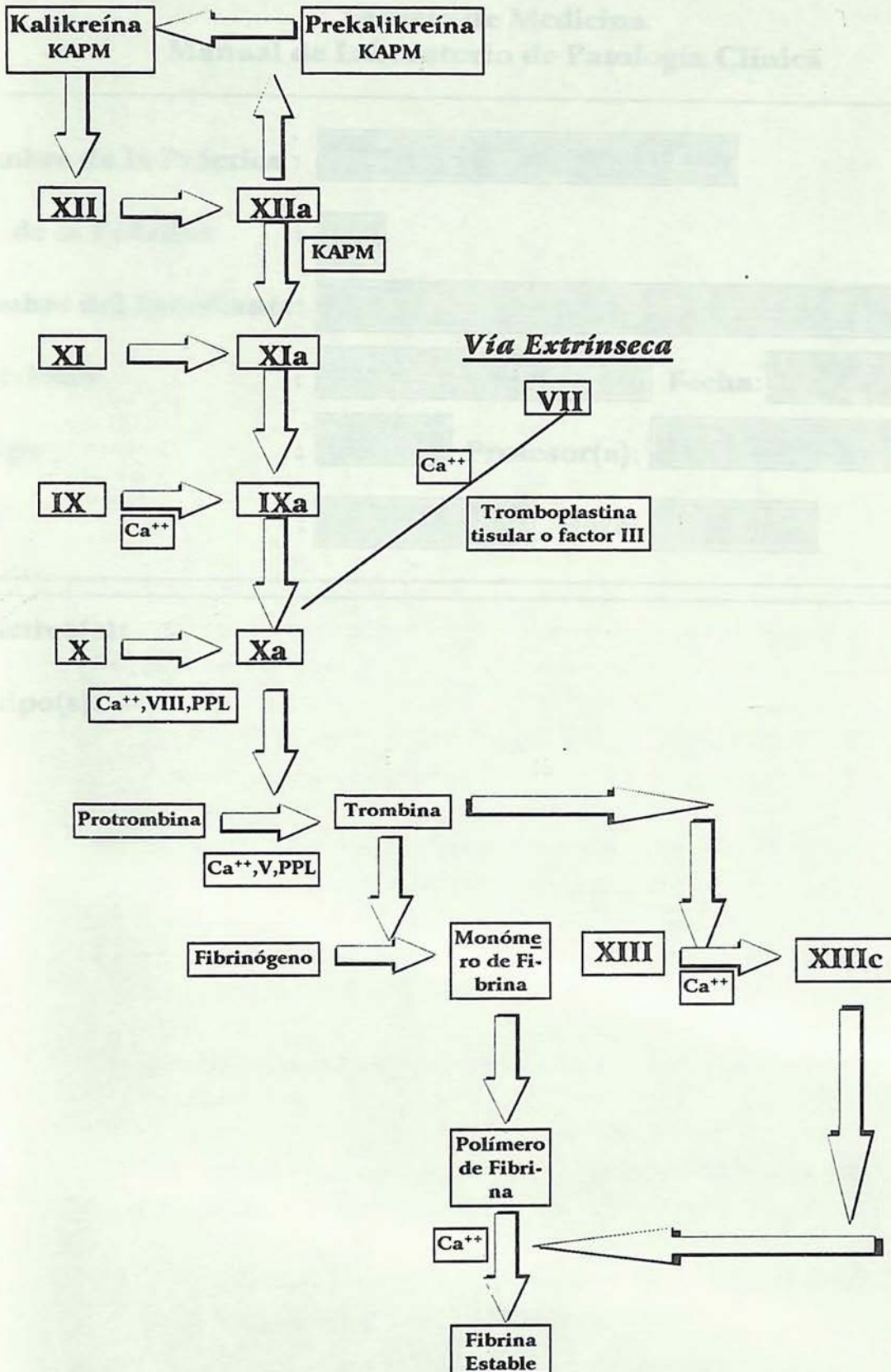
Las plaquetas son difíciles de contar porque son pequeñas, se desintegran fácilmente, son difíciles de distinguir del sucio, se unen unas a otras (agregación) y se adhieren a cuerpos extraños (adhesividad).

Hay métodos manuales en los que se hacen diluciones de la sangre y se cuentan en la cámara de Neubauer. Entre estos métodos tenemos el de Camco y el de Rees y Ecker. También hay métodos automáticos.

El conteo de plaquetas también es útil para seguir la evolución de la leucemia, anemia aplásica y otros procesos relacionados a insuficiencia de la médula ósea.

### Otras pruebas de coagulación

Retracción del coágulo, lisis del coágulo, tiempo de recalcificación del plasma, tiempo de trombina, título de fibrinógeno, prueba de consumo de protrombina, prueba de sustitución, tiempos de protrombina y tromboplastina parcial, prueba del torniquete (fragilidad capilar), prueba del sulfato de protamina (mide presencia de monómeros de fibrina en el plasma) ayuda al diagnóstico de CID, la prueba de la gelatinización del etanol y pruebas que miden los productos de la degradación de la fibrina.

Vía Intrínseca

PPL = Fosfolípidos plaquetarios

Mecanismo de coagulación intrínseca y extrínseca

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO HENRÍQUEZ UREÑA  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Escuela de Medicina  
Manual de Laboratorio de Patología Clínica

Nombre de la Práctica : **Hemostasis y Coagulación**

No. de la Práctica : **07**

Nombre del Estudiante:

Matrícula :

Fecha:

Grupo :

Profesor(a):

Día :

Hora:

Reactivo(s):

Equipo(s):



## PRÁCTICA # 8

### DETERMINACIÓN DE GLICEMIA

#### OBJETIVOS GENERALES:

- 1.- **Determinación de glicemia: Método de Folin-Wu, Somogy-Nelson, Ferricianuro, Dubowsky. Curva de tolerancia, glucosa post-prandial y glucosa en orina.**
- 2.- **Especificar el valor diagnóstico general de la prueba de la glicemia.**
- 3.- **Formular los diferentes fundamentos de la prueba de glicemia y comparar los mismos.**
- 4.- **Participar activamente en la discusión de criterios luego de leer la literatura correspondiente.**
- 5.- **Realizar la prueba de glicemia e interpretar los resultados.**
- 6.- **Mantener y organizar el equipo utilizado en condiciones óptimas.**
- 7.- **Determinar el uso apropiado de la determinación de glicemia en la situación clínica.**

## PRÁCTICA # 8

### Determinación de Glicemia

Los carbohidratos en el humano son la fuente principal de energía, siendo la glucosa el más cuantioso en concentración en los tejidos corporales y el más utilizado. Existe un mecanismo glandular que, predominantemente, está regido por el páncreas, el cual regula el nivel sanguíneo de glucosa, siendo la insulina la hormona más activa en este proceso. Esta actividad consiste, de manera primordial, en promover la transformación de la glucosa ingerida con los alimentos en glucógeno para ser almacenado en forma de glucógeno en el hígado y los músculos. Por eso la insulina puede llamarse hormona hipoglucemiante, los trastornos pancreáticos que tienen como consecuencia la formación insuficiente de insulina o formación de una insulina deficiente (en cantidades suficientes, pero incapaces de funcionar) trae como consecuencia la enfermedad conocida como diabetes, en la cual el paciente que la sufre presenta niveles sanguíneos de glucosa elevados con relación a lo normal y escaso o ningún almacenamiento de glucógeno.

Existen otras hormonas como glucagón y cortisol que son llamadas "Hormonas diabetógenos" o "Hiperglucemiantes" porque promueven la elevación del nivel sanguíneo de glucosa.

### Niveles normales de glucosa en sangre completa y suero

La concentración normal de glucosa en sangre completa, determinada por métodos, varía de 60 a 110 mg/dl.

Hacemos la salvedad de que cuando se emplean métodos no específicos, como son el de Folin-Wu y el de Ferricianuro alcalino, basados en el poder reductor de la glucosa, interfieren en la determinación otras sustancias reductoras presentes normalmente en la sangre como son: creatinina, ácido úrico, vitamina C y otras, dando resultados ligeramente más elevados que lo real.

Es por esto que hablamos de glucosa verdadera, aquella determinada por métodos específicos con valores normales de 70 a 110 mg/dl, y glucosa no verdadera, determinada por reacciones no específicas, adonde se suma la reacción cromogénica de los sacaroides mencionados en el

párrafo anterior. Los valores normales para glucosa no verdadera son de 80 a 120 mg/dl.

Hoy día la tendencia en el laboratorio es de usar determinaciones que midan glucosa verdadera. Además de ser mas específicos, la técnica es mas sencilla, disminuyendo así el % de error inevitable en técnicas muy laboriosas.

### Estabilidad de la glucosa en sangre completa y suero

Cuando se extrae sangre, se deja coagular y se deja sin centrifugar a temperatura ambiente, la disminución media de glucosa en suero es aproximadamente de 7% en una hora. En suero separado sin hemolizar, la concentración de glucosa es, en general, estable hasta durante 8 horas a 25°C y hasta 72 horas a 4°C. Durante períodos de almacenamiento mas largos se observa estabilidad variable, relacionada con contaminación bacteriana. El plasma separado de las células, después de moderada centrifugación, contiene leucocitos que también metabolizan glucosa. El plasma exento de células no muestra actividad glucolítica. De estos datos se deduce que las determinaciones de glucosa en sangre completa habrán de efectuarse con prontitud después de la recogida de la muestra. Plasma o suero sin preservativos habrá de separarse de las células o coágulo dentro de una media hora después de extraída la sangre si han de obtenerse de modo consecuente valores de glucosa dentro de 10 mg/dl del valor original.

Se puede prevenir la glicólisis y estabilizar la glucosa hasta 24 horas a temperatura ambiente, tomando la muestra con fluoruro de sodio y oxalato de potasio. Puede analizarse sangre completa o plasma. El ión fluoruro inhibe la actividad de la ureasa, por consiguiente, las muestras así tratadas serán inadecuadas para determinaciones de urea por métodos que requieran ureasa.

### METODOLOGIA PARA DETERMINAR GLUCOSA EN SANGRE COMPLETA Y/O SUERO

Métodos que determinan glucosa NO verdadera. (Hoy día están en desuso)

#### Método de Folin-Wu

Muy utilizado antiguamente. Es un método indirecto, ya que hay que realizar un filtrado libre de proteínas previamente.

El fundamento del método está basado en la reducción del cobre ión cúprico a cuproso en medio alcalino y caliente con un cambio de coloración de azul intenso a rojo.

Luego el óxido cuproso a su vez reduce las sales de molibdeno (ácido molibdico) a óxidos de molibdeno que son de color azul y colorimétricamente medibles.

*Valores normales = 80 - 120 mg/dl*

#### Método de Ferricianuro alcalino

Se basa en que la glucosa reduce el ión Ferricianuro (de color amarillo) a ferrocianuro (incolore) en medio alcalino y caliente.

La disminución de la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra; por lo que se denomina colorimetría inversa. La colorimetría inversa es poco sensible para niveles bajos de glucosa.

Este método es directo y mide glucosa no verdadera.

*Valores normales = 80 - 120 mg/dl*

#### Métodos que determinan glucosa verdadera

##### Método de Somogy-Nelson

Es un método indirecto ya que utiliza un filtrado libre de proteínas (FLP) con hidróxido de Bario ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ) y sulfato de Zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ). A diferencia del método de Folin-Wu, este método mide glucosa verdadera porque el sulfato de Bario ( $\text{BaSO}_4$ ) formado, al precipitar, absorbe las sacaroides evitando así la interferencia ulterior de éstos en la reacción final.

Este método ya está en desuso ya que ha sido reemplazado por métodos más sencillos y más específicos como es el de glucosa oxidasa el cual veremos más adelante.

*Valores normales = 70 - 110 mg/dl*

##### Método de Dubowsky

Se basa en que la glucosa en medio acético y caliente reacciona con aminas aromáticas para producir glicosilaminas. Este método emplea como amina la 0-toluidina formándose una glicosilamina color verde directamente proporcional a la concentración de glucosa presente y colorimétricamente medible a 630nm.

A pesar de ser un método relativamente sencillo y muy específico, está cayendo en desuso ya que la 0-toluidina es carcinogénica.

**Valores normales = 70 - 110 mg/dl**

### **Método de glucosa-oxidasa**

Este método se fundamenta en que la glucosa es oxidada enzimáticamente por la glucosa oxidasa formándose ácido glucónico y agua oxigenada.

En presencia de una peroxidasa se libera oxígeno del  $H_2O_2$ , el cual será aceptado por un aceptor de  $O_2$  como es el caso de la O-dianisidina que al oxidarse toma un color rosado en pH ácido y amarillo en pH alcalino. Este método es muy sencillo, altamente específico y utiliza volúmenes de suero pequeños; lo cual le ha hecho de uso muy popular hoy día.

### **Método de glicemia enzimática (Wiener)**

La glucosa es oxidada enzimáticamente por la glucosa-oxidasa (GO1)-BD-glucosa-oxígeno 1-ácidorreductasa, EC1.1.3.4) a ácido glucónico y agua oxigenada; el  $H_2O_2$  en presencia de peroxidasa (POD, donador hidrógeno-peróxido-óidorreductasa; EC 1.11.1.7) produce la copulación oxidativa del fenol con la 4 aminofenazona (4-AF), dando lugar a la formación de un cromógeno rojo-cereza, con un máximo de absorción a 505 nm.

### **Pruebas de tolerancia a la glucosa**

Los pacientes de diabetes leve o controlada por la dieta pueden tener en ayunas niveles de glucosa en sangre que están dentro del intervalo normal, pero, sin embargo, no poder producir suficiente insulina para metabolizar pronto los carbohidratos ingeridos. Como resultado de ello, la concentración de glucosa en sangre en estos pacientes sube a niveles anormales altos y se retarda el retorno al valor normal. Dicho de otro modo, el paciente tiene menor tolerancia para glucosa.

Por ello, las pruebas de tolerancia a la glucosa son de máxima ayuda para establecer un diagnóstico de un caso de diabetes leve.

Cuando se administra por vía bucal una dosis estándar de 100 gr. de glucosa, ocurre absorción rápidamente y aumenta la concentración de glucosa en sangre. Esto estimula al páncreas a producir mas insulina, con el resultado de que, después de 30 a 60 minutos, el nivel de glucosa en sangre empieza a aumentar. Como en ese momento existe mas insulina de la necesaria, la glucosa en sangre tiende a bajar por debajo del nivel en ayunas al transcurrir de 1 a 2 horas, para volver a niveles normales aproximadamente hacia las 3 horas. En la figura #18 se muestra la respuesta a glucosa en varias condiciones. Los valores se refieren a concentraciones de glucosa en suero o plasma. Como antes se mencionó

estos valores son aproximadamente 12% mas altos que los niveles de glucosa verdadera en sangre completa.

En una respuesta normal, el nivel de glucosa en sangre en ayunas está dentro de límites normales; la concentración pico se alcanza hacia los 30 a 60 minutos y no pasa de 170mg/100ml; y el nivel de glucosa a las 2 horas desciende por debajo de 120mg/100ml. Los valores correspondientes a glucosa verdadera en sangre completa son 100 y 110mg/100ml.

El paciente ha de someterse a una dieta que contenga de 1.75 gr. de carbohidrato por kg. de peso del cuerpo, durante 3 días antes de someterse a una prueba de tolerancia a glucosa. Si antes de procederse a la prueba la ingestión de carbohidratos ha sido demasiado baja, podría obtenerse una curva falsa de tipo diabético.

#### Prueba de tolerancia a glucosa por vía bucal

La prueba suele efectuarse en la mañana temprano. El paciente no deberá haber comido después de la cena del día antes de la prueba aunque podrá beber agua. El paciente permanecerá en reposo durante la prueba y se abstendrá de fumar y de comer. Se obtiene una muestra de sangre y una muestra de orina en ayunas. A los adultos se les administra una solución de 100 gr. de glucosa; para niños, es satisfactoria la administración de 1.1 gr. de glucosa por kilogramo de peso del cuerpo. Se dispone de varios preparados comerciales; en otro caso, se disuelven 100grs de glucosa en 200ml de agua, aproximadamente, y se da sabor a la solución con jugo de limón.

Se recogen muestras de sangre al transcurrir  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 3, 4 y 5 horas después de la ingestión de glucosa. Se recogen al mismo tiempo muestras de orina, que se analizan para determinar glucosa semicuantitativamente. Lo normal será que estas muestras de reacción negativa. El nivel de glucosa en plasma, con el cual aparece glucosa en la orina, se llama el umbral renal y es aproximadamente de 180mg/100ml. Algunos individuos exhiben umbrales renales mas bajos y eliminan glucosa en la orina aún cuando la curva de tolerancia de glucosa sea normal. Aunque ello pudiera no guardar ninguna relación con cualquier condición patológica, aproximadamente un tercio de estos individuos se vuelven diabéticos finalmente.

Una prueba de 3 horas es de ordinario suficiente para la evaluación rutinaria de diabetes. Si se sospecha hipoglucemia, se toman más muestras, a las 4 y 5 horas. Los pacientes con insuficiencia adrenal o con tumores en las células de los islotes del páncreas suelen tener niveles ba-

jos de glucosa en sangre en ayunas. La respuesta a la prueba de tolerancia a glucosa podría aparecer normal durante las primeras 3 horas y, sin embargo, continuar bajando los valores durante la cuarta y quinta horas. Algunos pacientes con diabetes latente muestran también hipoglucemia durante este período, probablemente asociada con secreción retardada de insulina.

### Prueba de tolerancia a glucosa por vía intravenosa

La mala absorción de glucosa administrada por vía bucal puede dar como resultado una curva de tolerancia "plana". En este caso, se puede administrar la glucosa por vía intravenosa; la preparación del paciente es exactamente la misma que para la prueba por vía bucal. Se obtiene una muestra de sangre y una muestra de orina en ayunas. A continuación, el médico inyecta por vía intravenosa una solución de glucosa al 50% (p/v). La dosis recomendada es de 0.333grs de glucosa por Kg. de peso del cuerpo. Un método sencillo para determinar la cantidad de glucosa al 50% que deberá ser inyectada es dividir el peso del paciente en kilogramos por 1.5. Por ejemplo,  $75\text{Kg}/1.5 = 50\text{ml}$ . No habrán de inyectarse en este caso más de 50ml, se recogen muestras de sangre y de orina en períodos de  $\frac{1}{2}$ , 1, 2 y 3 horas, como para la prueba por vía bucal. La interpretación es similar, salvo que el valor pico de glucosa en sangre ocurre con la muestra tomada a la  $\frac{1}{2}$  hora y tiene poca importancia numérica. Ver figura #18.

### Glucosa a las 2 horas de estado post-prandial

Como la muestra tomada a las 2 horas en una prueba de tolerancia a glucosa tiene la máxima importancia en la evaluación de diabetes, se puede abreviar la prueba para fines eliminatorios a una sola determinación. El paciente consume su desayuno, almuerzo, o la solución de glucosa, con un contenido de 100gr. de carbohidratos. Dos horas después de la comida, se le extrae sangre para una determinación de glucosa. Habrá que instruir al paciente para que ingiera la cantidad especificada de carbohidratos y para que permanezca en reposo durante un período de 2 horas después de la comida. Ahora muchos médicos piden determinaciones de glucosa a las 2 horas de estado post-prandial, como cosa rutinaria, en vez de niveles de glucosa en ayunas, como guía para la administración del requerimiento de insulina. En las condiciones usuales de hospital, a menudo es difícil, sin embargo, controlar el intervalo de 2 horas con mucha exactitud, pues podría empezar a medirse el tiempo al comienzo, hacia la mitad o al final de la comida de prueba. Para asegurar la uniformidad de la ingestión de carbohidratos y el cronometraje exacto, se recomienda usar los 100gr. de glucosa en solución

rutinariamente como comida de prueba para la determinación de glucosa en sangre post-prandial.

La interpretación, al igual que con las otras determinaciones de glucosa, varía con el método y depende de si se usa para el análisis sangre completa o plasma. En general, las concentraciones la glucosa en plasma o suero a las 2 horas de estado post-prandial han de ser menos de 120mg/100ml; la glucosa verdadera en sangre completa ha de tener una concentración menor de 110mg/100ml. (Ver figura #18).

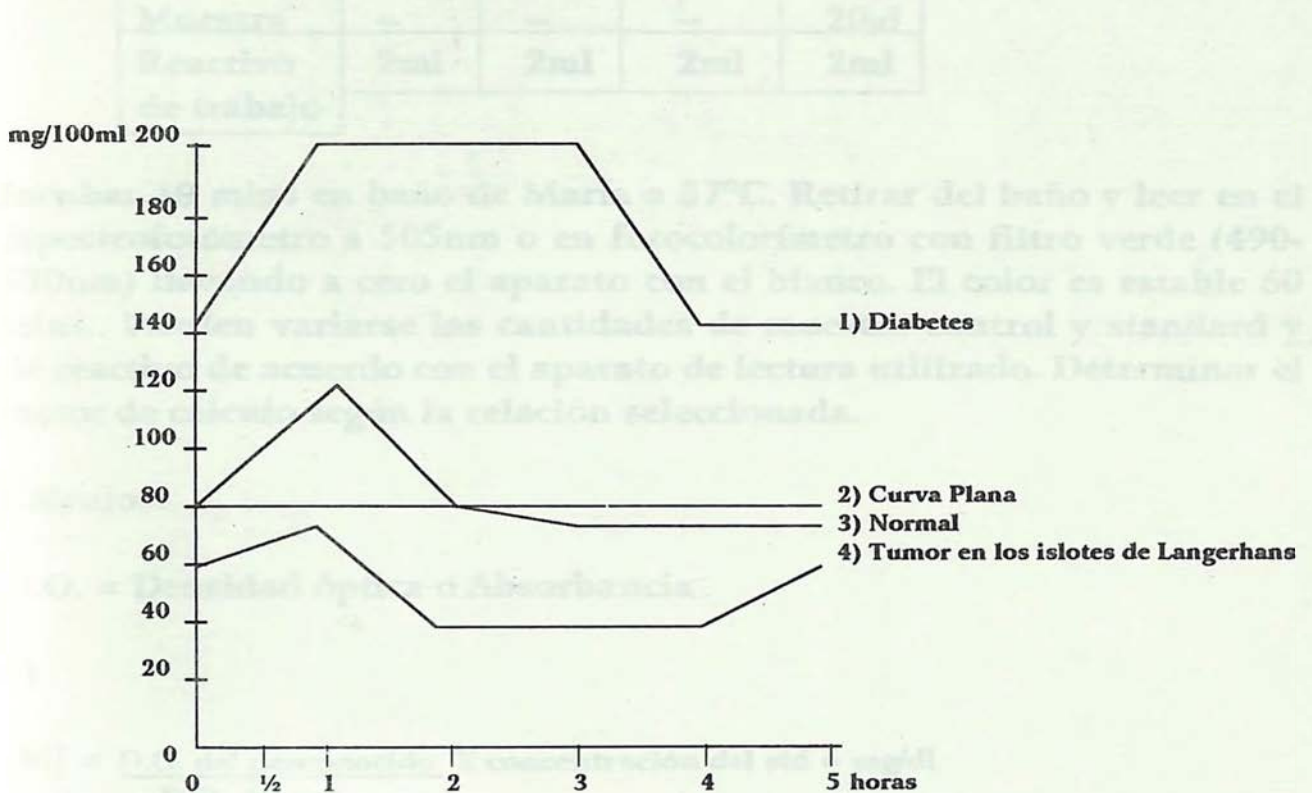


Figura #18



**Técnica:**

En cuatro tubos marcados:

(B) blanco, (std) standard, (C) control y (M) muestra, distribuir

	B	std	C	M
Standard	--	20 $\mu$ l	--	--
Control	--	--	20 $\mu$ l	--
Muestra	--	--	--	20 $\mu$ l
Reactivo de trabajo	2ml	2ml	2ml	2ml

Incubar 10 mins en baño de María a 37°C. Retirar del baño y leer en el espectrofotómetro a 505nm o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530nm) llevando a cero el aparato con el blanco. El color es estable 60 mins.. Pueden variarse las cantidades de muestra control y standard y de reactivo de acuerdo con el aparato de lectura utilizado. Determinar el factor de cálculo según la relación seleccionada.

Cálculos:

D.O. = Densidad óptica o Absorbancia

1)

$$[M] = \frac{\text{D.O. del desconocido}}{\text{D.O. del std}} \times \text{concentración del std} = \text{mg/dl}$$

2) Factor

$$\text{glucosa mg/dl} = D \times F$$

$$F = \frac{100 \text{ mg/dl}}{\text{std}} \rightarrow \text{concentración del std.}$$

$$\text{std} \rightarrow \text{absorbancia del std.}$$

De donde:

D.O. = densidad óptica = absorbancia

mg/dl = miligramos por decilitro

D = absorbancia de los desconocidos

F = Factor

■ La concentración del std es de 100 mg/dl

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO HENRIQUEZ UREÑA  
 Facultad de Ciencias de la Salud  
 Escuela de Medicina  
 Laboratorio de Diagnóstico Clínico

**Valores de referencia:**

**Suero o plasma** : 70 -- 110 mg/dl

**Sangre total** : 60 -- 100 mg/dl

**Líquido Céfaloraquídeo** : 40 -- 74 mg/dl

Nombre del Estudiante: \_\_\_\_\_

Matrícula: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Cupo: \_\_\_\_\_ Profesor(a): \_\_\_\_\_

Via: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

Resultado(s): \_\_\_\_\_

Comentario(s): \_\_\_\_\_

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO HENRÍQUEZ UREÑA  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Escuela de Medicina  
Manual de Laboratorio de Patología Clínica

Nombre de la Práctica : **Determinación de Glicemia**

No. de la Práctica : **08**

Nombre del Estudiante:

Matrícula :

Fecha:

Grupo :

Profesor(a):

Día :

Hora:

Reactivo(s):

Equipo(s):

## PRÁCTICA # 9

### DETERMINACIÓN DE UREA Y CREATININA

#### CREATININA:

La creatinina es un compuesto nitrogenado no proteico derivado del metabolismo de los aminoácidos.

#### **OBJETIVOS GENERALES:**

La determinación de creatinina sérica es el mejor procedimiento para evaluar el diagnóstico de enfermedad renal, ya que todo aumento de fondo de la misma implica siempre un considerable descenso de la filtración glomerular. Por ser de origen endógeno es más dependiente en su función renal que la urea sanguínea, cuyo nivel, por depender de muchos factores, puede ser normal, o aun bajo, en casos de insuficiencia renal. El nivel de creatinina sérica, no son influenciados por el volumen de la dieta.

**1.- Discutir el valor clínico de la determinación de urea y creatinina.**

**2.- Definir los fundamentos de la prueba de urea y creatinina.**

**3.- Observar la realización de la prueba de urea y creatinina.**

**4.- Identificar las situaciones clínicas que alteran los resultados de urea y creatinina.**

*Neftrosia crónica:* La enfermedad renal es, probablemente, irreversible. Valores superiores a 20mg/dl configuran un cuadro con pocas probabilidades de reversión.

*Neftrosia Aguda:* En los procesos agudos, los valores hallados pueden ser tan elevados como 20mg/dl, los que se normalizan si la lesión se resuelve.

*Obstrucción Urinaria:* Está asociada con retención de creatinina, y si el grado de compresión es suficiente, los valores hallados pueden estar por encima de 30mg/dl. Una vez eliminada la obstrucción, los valores retornan a la normalidad.

*Nivel Sanguíneo:* La creatinina es el parámetro más adecuado para evaluar los efectos de las drogas potencialmente nefrotóxicas. Así mismo se de gran importancia como indicador, más preciso aún que la urea, para evaluar la efectividad del tratamiento con riñón artificial o para evaluar la terapia con antihipertensivos simpáticos.

## PRÁCTICA # 9

### Determinación de urea y creatinina

#### CREATININA:

La creatinina es un compuesto nitrogenado no protéico derivado del metabolismo de los aminoácidos.

La determinación de creatinina sérica es el mejor procedimiento para establecer el diagnóstico de enfermedad renal, ya que todo aumento definido de la misma implica siempre un considerable desmedro de la filtración glomerular. Por ser de origen endógeno es más dependiente en la función renal que la urea sanguínea, cuyo nivel, por depender de muchos factores, puede ser normal, o aún bajo, en casos de insuficiencia renal. El nivel sérico y la excreción urinaria de creatinina son muy constantes y, a diferencia de la urea, no son influenciados por el volumen urinario ni la dieta.

#### Alteraciones Patológicas de los Valores de Creatinina

- 1) **Nefritis Crónica:** El aumento de creatinina sérica es de pronóstico serio, dado que el daño renal es, probablemente, irreversible. Valores superiores a 50mg/ml configuran un cuadro con pocas probabilidades de sobrevivir.
- 2) **Nefritis Aguda:** En los procesos agudos, los valores hallados pueden ser tan elevados como 200mg/ml, los que se normalizan si la lesión se subsana.
- 3) **Obstrucciones Urinarias:** Están asociadas con retención de creatinina, y, si el grado de compresión es suficiente, los valores hallados pueden estar por encima de 30mg/ml. Una vez eliminada la obstrucción, los valores retornan a la normalidad.
- 4) **Control Terapéutico:** La creatinina es el parámetro más adecuado para evaluar los efectos de las drogas potencialmente nefrotóxicas. Así mismo es de gran importancia como indicador, más preciso aún que la urea, para evaluar la efectividad del tratamiento con riñón artificial o como control en la terapia con antihipertensivos simpatomolíticos.

## Depuración de Creatinina Endógena

La D.C.E. es la prueba más sensible y sencilla para estudiar la disminución de la filtración glomerular, ya que pequeños cambios en la concentración sanguínea se asocian con grandes alteraciones de la depuración renal, siendo la prueba que revela más precozmente cualquier desorden de filtración renal no detectable por otros métodos (urea, prueba de concentración, análisis de orina).

La D.C.E. debe determinarse en todos los casos de sospecha, especialmente frente a ligeros aumentos de creatinina sérica. Por otra parte, en casos de insuficiencia renal avanzada, la D.C.E. seriada es la mejor guía de control y pronóstico, ya que el valor va disminuyendo progresivamente con el aumento del daño renal. Valores de D.C.E. menores de 20ml/min son de pronóstico fatal. Pacientes con D.C.E. menores de 30ml/min no toleran los antihipertensivos simpatomolíticos ( hemametonio ), ni los diuréticos del tipo de la clorotiazida y mercuriales.

$$\text{D.C.E.} = \frac{\text{Creatinina en orina gr/24 hrs}}{\text{Creatinina en suero mg./L.}} \times 694 \text{ ml/min}$$

### Valores normales de Creatinina:

Suero	=	0.8	--	1.4mg./dl
Orina	=	0.9	--	1.5gr/24 hrs
D.C.E.	=	80	--	140ml/min
		(Promedio =		125ml/min)

Estos valores de D.C.E. corresponden a adultos de hasta 60 años

### Fundamento del Método

La creatinina reacciona con el picrato alcalino en medio tamponado, previa desproteinización con ácido pícrico, obteniéndose un cromógeno. El uso del ácido pícrico como desproteinizante elimina los cromógenos no creatinina disminuyendo el mínimo las interferencias. La reacción de color final está tamponada a su pH óptimo sigue la ley de Beer hasta 4 mg./dl hasta 16 mg./dl diluyendo la solución final (Reacción de Jaffé).

**Reactivos**

Reactivo I : **Ácido Pítrico 41.4 mmol/L**

Reactivo II: **Buffer Glicina/NaOH/mol/L**

Standard : **Solución Estabilizada de Creatinina 20 mg./dl**

**Técnicas**

**Desproteinización:**

**A. 0.75 ml de suero agregar 3.75 ml de reactivo I. Mezclar por inversión. Dejar reposar por 10 min y centrifugar por 5 min.**

**B. En cuatro tubos fotocolorímetro marcados B (blanco), S (standard), D (desconocido).**

	B	S	D
<b>Sobrenadante</b>			<b>3.00 ml</b>
<b>Standard</b>		<b>0.50 ml</b>	
<b>Agua</b>	<b>1.25 ml</b>	<b>0.75 ml</b>	
<b>Reactivo I</b>	<b>1.75 ml</b>	<b>1.75 ml</b>	
<b>Reactivo II</b>	<b>0.50 ml</b>	<b>0.50 ml</b>	<b>0.50 ml</b>

**Mezclar por Inversión. Leer entre 20-30 min. en espectrofotómetro a 510 nm. Llevando a cero con el blanco de reactivos.**

**Cálculos**

**En la técnica se utiliza un standard de creatinina de concentración conocida y que ha sido sometido al mismo procedimiento colorimétrico de las muestras de concentraciones desconocidas. Por lo tanto, para los cálculos, podemos utilizar un factor de calibración que se obtiene de la siguiente forma:**

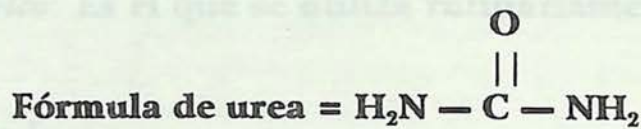
$$\text{Factor} = \frac{\text{Concentración Std}}{\text{Absorbancia Std}}$$

**Concentración Desconocida = Factor x Abs Desconocidos**

### Nitrógeno Uréico

La urea es un compuesto nitrogenado sintetizado en el hígado a partir del amonio que se reduce como resultado de la desaminación de los aminoácidos.

El peso molecular de la urea es de 60, la fracción nitrógeno corresponde a 28 (dos átomos de N). Conociendo estos datos podemos convertir el valor de nitrógeno uréico a urea multiplicándolo por 60/28 ó 2.14.



$$\text{O} = 16$$

$$\text{C} = 12$$

$$\text{N} = 28$$

$$\text{H} = \underline{4}$$

60 peso molecular

$$\text{BUN} = \frac{60}{28} = 2.14$$

o nitrógeno  
uréico

Por mucho tiempo se ha utilizado la dosificación de urea total o de nitrógeno uréico como exponente del funcionamiento renal, ya que el deterioro de la membrana renal trae, como consecuencia, que ésta pierda su permeabilidad para algunas sustancias y éstas sean retenidas en la circulación sanguínea causando intoxicación en grados variables en proporción con el daño renal. En la mayoría de los casos los médicos solicitan que, conjuntamente con la prueba de nitrógeno uréico, se realice la determinación de creatinina, ya que la determinación simultánea de dichos componentes sanguíneos parece ser de ayuda al diagnóstico diferencial entre hiperuremia prerenal, renal y postrenal.

El aumento de nitrógeno uréico en sangre puede ser debido a diferentes causas, entre ellas:

- 1) *Causas prerenales*: Disminución del contenido de agua debido a pérdida en exceso o poca ingestión, aumento del catabolismo protéico, etc..
- 2) *Causas renales*: Glomerulonefritis aguda, nefritis crónica, necrosis tubular, etc..



3) **Causas postrenales:** Incluye cualquier tipo de obstrucción del tracto urinario (piedras, tumores, etc.).

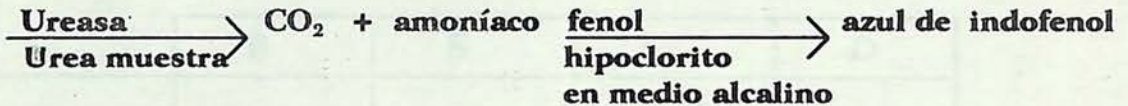
La determinación de urea sanguínea se puede realizar por varios métodos:

1) **Método cromatográfico:** Se utilizan tiras de papel de filtro impregnadas de solución buffer y reactivos que descomponen la urea liberando amonio, protegidos con láminas impermeables que eviten su deterioro (humedad, desecación, etc.).

2) **Método colorimétrico:** Es el que se utiliza rutinariamente y se describe a continuación:

### Fundamento del Método

La ureasa descompone, específicamente, la urea, produciendo dióxido de carbono y amoníaco, éste reacciona con fenol e hipoclorito en medio alcalino produciendo azul de indofenol, que es un compuesto de color azul intenso que es directamente proporcional a la cantidad de urea. Esta reacción se conoce con el nombre de Berthelot.



### Reactivos

**Ureasa :** Solución estabilizada y tamponada de ureasa de alta potencia. Estable dos años en heladera.

**Reactivo I :** Reactivo desecado para preparar solución 532 mmol/L de nitroferricianuro de sodio y 0.30 mol/L de etilene-bis-ditiocarbamato manganeso. Estable a temperatura ambiente.

**Preparación :** Disolver con agua destilada de acuerdo con las indicaciones de la etiqueta. Mezclar por inversión hasta disolución completa. Estable un año en heladera, una vez preparado.

**Reactivo II:** Reactivo concentrado para preparar solución 36.6 mmol/L de hipoclorito de sodio y 0.12 mmol/L de p-toluen suldo-cloramida, en hidróxido de sodio 0.625 mol/L estabilizado. Estable a temperatura ambiente.

**Preparación :** Diluir con agua destilada de acuerdo a las instrucciones de la etiqueta y mezclar por inversión. Estable un año en heladera, una vez preparado.

**Standard :** Solución de urea estabilizada. Se procesa igual que la muestra y equivale a 0.60 gr./L.

### Muestra

Emplear suero o plasma obtenido con anticoagulante. No deben emplearse anticoagulantes que contengan fluoruros, pues se inhibe la acción de la ureasa. Hemólisis ligeras o aún moderadas y valores de bilirrubina de hasta 400 mg./L no interfieren en los resultados. Hemólisis muy intensas pueden producir alteraciones que no sobrepasan el 5%. Un blanco de suero corrige esta interferencia.

### Técnica

En cuatro tubos de fotocolorímetro marcados B (Blanco), S (Standard), C (Control) y D (Desconocido) colocar una ó dos gotas de agua y agregar :

	B	S	C	D
<b>Standard</b>	--	20 $\mu$ l	--	--
<b>Control</b>	--	--	20 $\mu$ l	--
<b>Suero o Plasma</b>	--	--	--	20 $\mu$ l
<b>Ureasa</b>	1 gota	1 gota	1 gota	1 gota
<b>Mezclar por agitación suave e incube 5 min. a 37°C</b>				
<b>Reactivo I</b>	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
<b>Reactivo II</b>	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
<b>Mezclar por agitación suave e incubar 5 min. a 37°C</b>				
<b>Agua destilada</b>	10ml	10ml	10ml	10ml

Mezclar por inversión y leer en fotocolorímetro con filtro verde o en espectrofotómetro a 540 nm, llevando a cero con el Blanco. El color es estable 12 horas.

### Cálculos

Se calcula un factor de calibración que se obtiene con la absorbancia y concentración del standard [60 mg./dl].

$$\text{Factor} = \frac{[\text{Concentración del Std.}]}{\text{Absorbancia del Std.}}$$

$$\text{Urea mg/dl} = \text{Absorbancia del desconocido} \times \text{Factor}$$

$$\text{Urea mg/dl} \div 2.14 = \text{Nitrógeno Uréico mg/dl}$$

$$\text{Valores de Referencia} = \text{De 20 a 45 mg/dl}$$

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO HENRÍQUEZ UREÑA  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Escuela de Medicina  
Manual de Laboratorio de Patología Clínica

Nombre de la Práctica : **Determinación de Urea y Creatinina**

No. de la Práctica : **09**

Nombre del Estudiante:

Matrícula

:

Fecha:

Grupo

:

Profesor(a):

Día

:

Hora:

Reactivo(s):

Equipo(s):

## PRÁCTICA # 10

### PRUEBAS SEGÚN DIAGNÓSTICO

#### OBJETIVOS GENERALES:

- 1.- Conocer otras pruebas de laboratorio de interés clínico.
- 2.- Definir los fundamentos de cada una de las pruebas señaladas.
- 3.- Interpretar el carácter diagnóstico de cada una de las pruebas químicas según situación clínica.
- 4.- Describir las generalidades de los procedimientos de rutina de Serología, radioinmunoensayo e inmunohematología.
- 5.- Describir las generalidades de los procedimientos de rutina de parasitología.

## PRÁCTICA #10

### Pruebas según Diagnóstico

#### Indicaciones e Interpretaciones

La exactitud y precisión de los procedimientos de laboratorio actuales, requieren, con frecuencia, instrumental automático, lo cual reduce el número de técnicas que, todavía, puede llevar a cabo el médico en su consultorio. Es necesario tener pendiente que los valores normales para cada prueba dependen del instrumental y de las técnicas empleadas y cada laboratorio establece sus propias normas.

#### Química Clínica:

##### Amilasa:

Es útil para diferenciar la pancreatitis de otras causas de abdomen agudo. Se encuentra elevada, además, en peritonitis, úlceras pépticas perforadas y otras enfermedades que afectan el páncreas o a los conductos pancreáticos. Se determina en suero y orina, donde los niveles son elevados, con mas frecuencia, en la evolución de la pancreatitis y permanecen altos durante mas tiempo.

También aparece aumentada en pacientes con úlceras gástricas o duodenal perforada, obstrucción intestinal, obstrucción de conductos biliares y en hipertiroidismo.

Las parotiditis bacterianas y paperas, que producen bloqueo de la secreción de Amilasa salival, se asocian también con elevaciones en los niveles de Amilasa sérica.

Existen dos métodos para cuantificar Amilasa y éstos son:

Sacarogénicos y Amiloclásticos.

Valores de referencia: 20-112 uds/Lt.

##### Lipasa:

Producida por el páncreas, opera en forma óptima en el lumen del intestino delgado, donde, bajo condiciones de pH ligeramente ácido y en presencia de bilis, hidroliza los triglicéridos a la posición 1y3, generando los monoglicéridos y ácidos grasos libres, que luego son absorbidos por la mucosa intestinal.

En pacientes con pancreatitis aguda se observa un aumento de la actividad de esta enzima en suero, existiendo un marcado paralelismo con el aumento de la actividad de Amilasa.

En estas circunstancias, la determinación conjunta de la Amilasa y la Lipasa, resulta mas significativa para evaluar el compromiso pancreático.

Valores de referencia: 0-1.0 uds Tietz.

### Fosfatasa Ácida Total:

Se encuentra presente en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta la cantidad de estas enzimas en próstata, estómago, hígado, músculos, bazo, eritrocitos y plaquetas.

La actividad en suero es normalmente baja, siendo significativas las contribuciones de las fracciones eritrocitarias y plaquetarias, también se encuentra aumentada en enfermedades hepáticas, renales, mieloma múltiple, enfermedad de Gaucher, etc..

Valores de referencia: Hombres → 0.13 - 0.63 uds sigma/ml  
Mujeres → 0.01 - 0.56 uds sigma/ml

### Fosfatasa Ácida Prostática (FACP):

Esta enzima se encuentra aumentada en individuos con carcinoma de próstata, debido al aumento de la isoenzima prostática, esta elevación dependerá del estadio de la enfermedad, este aumento será más notorio, cuando existan compromisos de otros tejidos, especialmente óseos (metástasis).

Valores de referencia: 0.01 - 0.15 uds sigma/ml

### Fosfatasa Alcalina:

Está aumentada en suero en enfermedades del hígado y los huesos. El nivel varía con la edad.

Se eleva en las enfermedades hepáticas, tanto obstructivas como hepatocelulares. Es moderada a marcadamente elevada y la ictericia obstructiva, cirrosis biliar, hepatitis colangioliática, oclusión de un conducto hepático y en las lesiones que ocupan espacio del hígado. Es ligera a moderadamente elevada en la hepatitis viriásica, mononucleosis infecciosa y cirrosis. Se eleva marcadamente en osteoitis deformante, moderadamente en raquitismo, osteomalasis, hiperparatiroidismo y en enfermedades metastásicas de los huesos y ligeramente elevada en las fracturas en proceso de curación.

Valores de referencia: Niños → 100 - 250 mUI/ml  
Adultos → 68 - 160 mUI/ml

### Transaminasa-Glutámica-Oxalacética (SGOT-AST):

Se eleva en ciertas enfermedades del hígado, corazón y de los músculos del esqueleto y a continuación del empleo de algunos medicamentos. Aumenta, en casi todos los pacientes, después de infarto agudo de mio-

cardio, iniciándose a las 12 horas y retorna a la normalidad 4 a 7 días después. Es normal en otras complicaciones cardíacas que no vayan acompañadas de necrosis del músculo cardíaco.

Aumenta en lesiones agudas del hígado y también en enfermedades musculares, lesiones por magullamiento y gangrena del músculo; en la dermatomiositis y a consecuencia de la ingestión de aspirina, codeína y cortisona.

Valores de referencia: 9 - 48 uds/Lt.

#### Transaminasa-Glutámica-Pirúvica (SGPT-ALT):

Su determinación es muy importante porque revela mas rápidamente cualquier patología del hígado, sin aún el paciente tener síntomas clínicos.

Valores de referencia: 5 - 49 uds/Lt.

#### Gamma-Glutamil-Transpeptidasa (GGTP) o Y-Glutamil-Transferasa (Y-GT):

Es en una enzima de membrana (plasmática o reticuloendoplásmica) que está ampliamente distribuida en el organismo. Los principales órganos en los que se encuentra actividad Y-GT son: riñón, vesículas seminales, páncreas, bazo y cerebro.

Esta enzima se caracteriza por su extrema sensibilidad, puesto que es influenciada por cualquier factor que afecte a las membranas celulares de los órganos que la contienen.

De tal forma se observa elevación de la actividad Y-GT sérica en enfermedades tales como: neoplasma renal, infarto renal, síndrome nefrótico, pancreatitis, cirrosis hepática, hepatitis viral, etc..

Las pruebas de Y-GT, conjuntamente con las demás pruebas hepáticas, amplían significativamente el panorama del diagnóstico diferencial de las enfermedades hepáticas primarias y secundarias, formando parte del hepatograma.

Valores de referencia: Hombres → 1 - 53 uds/Lt

Mujeres → 0 - 41 uds/Lt

#### Bilirrubina Total y Directa:

La elevación de bilirrubina directa de más de 40 mg/dl es indicación precisa de enfermedad hepática oculta.

*La bilirrubina total del suero se eleva en los estados hemolíticos, lesiones hepatocelulares, estasis biliar intrahepático y obstrucción post-hepática al flujo biliar.*

*La bilirrubina directa del suero aumenta en la estasis biliar intra-hepática, lesión hepatocelular y obstrucción post-hepática al flujo biliar.*

#### Excreción de la Bromosulfofataleína (BSP):



Es útil cuando otras pruebas de la función hepática son normales, pero no es necesaria cuando el paciente presenta ictericia manifiesta o cuando la lectura de la bilirrubina directa es superior a 20 mg/dl. Muchas enfermedades extra-hepáticas causan, también, elevación de la BSP.

### Calcio:

La elevada concentración de calcio es un signo diagnóstico muy importante en el hiperparatiroidismo primario. Con frecuencia está aumentado en acidosis, metástasis óseas, mieloma múltiple, carcoidosis, inmovilización prolongada, intoxicación por vitamina D, leucemia, hipercalcemia idiopática de la infancia y enfermedad de Addison.

### Fósforo:

Se encuentra en el organismo formando parte de compuestos orgánicos (proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, etc.), o como fosfatos inorgánicos, cumpliendo funciones diversas, tanto en el transporte de energía, como en la estructura de los tejidos y el mantenimiento del pH de los líquidos corporales.

Los tejidos óseos y musculares lo contienen como constituyente esencial y es notable su participación en la composición del tejido nervioso.

Su concentración en circulación está regulada, entre otros factores, por los niveles de vitamina D y las glándulas endocrinas.

Niveles elevados de fósforo sérico son encontrados en el hipoparatiroidismo, mientras que en el hiperparatiroidismo los niveles están aumentados.

Valores normales: 8.1 - 10.4 mg/dl.

### Colesterol:

Si el colesterol en suero está elevado y se sospecha la presencia de un trastorno lipoideo primario, están indicadas la estimación de los triglicéridos y la electroforesis lipoproteínica.

Aumentan en el síndrome nefrítico, hipotiroidismo primario, pancreatitis, diabetes mellitus, ictericia obstructiva y el embarazo normal.

El colesterol total circulatorio se compone de dos paquetes mayores que son: Lipoproteínas de alta densidad (HDL), Lipoproteínas de baja densidad (LDL) y Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

El HDL colesterol está relacionado con enfermedades cardíacas coronarias (ECC). Valores de referencia colesterol total y hasta 200 mg/dl.

Las HDL sintetizada en el hígado, remueven el colesterol no utilizado por las células (dentro de ciertos límites de concentración), transportando hacia el hígado, para su degradación. Se le llama colesterol bueno. Valores de referencia: mayor o igual a 35 mg/dl.

**Las LDL** han sido las más estudiadas por su importante actividad biológica, producto del metabolismo de los VLDL en plasma, son las encargadas del transporte del colesterol (exógeno y, en mucho menor proporción, endógeno) hacia el interior de las células. Se le llama colesterol malo. Valores de referencia: Menor de 130 mg/dl.

### **Triglicéridos:**

Forman la mayor parte del peso seco del tejido adiposo, constituyendo, por lo tanto, una potente forma de almacenamiento de energía.

El movimiento de ácidos grasos entre los distintos compartimientos del organismo se produce con gran rapidez en respuesta a diversos estímulos (dieta, actividad física, estrés, edad, etc.), por este motivo es de esperar que el triglicérido, uno de los más importantes vehículos, sea el transporte de ácidos grasos.

El triglicérido se encuentra aumentado en personas con problemas de arteriosclerosis. Este punto de vista está sustentado por el hecho de que un gran porcentaje de pacientes con infarto de miocardio, también exhiben hipertrigliceridemia.

Valores de referencia: Hombres → 35 - 135 mg/dl

Mujeres → 40 - 160mg/dl

### **Lípidos Totales:**

Son compuestos orgánicos cuya función más importante, desde el punto de vista cuantitativo, es la de actuar como combustible, además de formar una estructura adiposa protectora de los órganos internos y proveen compuestos importantes en la formación de diversas hormonas.

Los lípidos encontrados en plasma, incluyen colesterol libre y esterificado, triglicéridos, fosfolípidos y ácido grasos libres.

Los valores se encuentran elevados en diversas patologías, como hipotiroidismo, enfermedad renal, obstrucciones biliares, etc..

Su gran importancia radica en la conexión entre hiperlipemia y arteriosclerosis, diabetes y enfermedades cardíacas.

La disminución de éste no tiene significación clínica.

Valores de referencia: 400 - 800 mg/dl.

### **Fosfolípidos:**

Son bionucleares lipídicos, que contienen fosfatos en su composición, son componentes principales de las membranas celulares y de los lipoproteínas circulantes.

Su concentración está sujeta a variaciones fisiológicas debidas a cambios en la dieta, edad y condiciones especiales, como embarazo, ciclo menstrual, etc..

Las variaciones patológicas muy frecuentemente están asociadas a cambios en las demás funciones lipídicas. Este hecho se manifiesta, por ejemplo, en afecciones como diabetes mellitus, arteriosclerosis, alcoholismo agudo, síndrome nefrítico, etc., que cursan, habitualmente, con hiperlipémica y en las que se observan un aumento anormal de los niveles de fosfolípidos.

Valores de referencia: 100- 300 mg/dl.

### Creatinina Fosfoquinasa (CPK):

La creatinina Kinasa es una enzima intracelular, cuya distribución en el organismo es relativamente específica, ya que se encuentra en mayor proporción en músculos esqueléticos y cardíaco, y también en cerebro.

Un aumento en la actividad sérica es, por lo tanto, índice de lesión celular. La extensión y gravedad de la lesión determinarán la magnitud de la elevación de la actividad de la enzima en suero.

La determinación de los niveles séricos de esta enzima ha sido profundamente utilizada para evaluar distintas formas de enfermedad muscular, especialmente el infarto agudo de miocardio (IAM) y diversos trastornos del músculo esquelético.

Valores de referencia: Hombres → 38 - 174 uds/L

Mujeres → 26 - 140 uds/L

La creatinquinasa (CK) tiene tres isoenzimas importantes que son: MM, MB y BB.

La isoenzima MB (CK<sub>2</sub>) está elevada en el infarto agudo del miocardio.

Elevaciones de la CK-MB no son diagnóstico de infarto cardíaco, ya que se pueden observar en enfermedad de músculo esquelético.

Elevación de CK-MM se observa en anormalidades del músculo esquelético.

La isoenzima CK-BB se encuentra, principalmente, en el cerebro y en el pulmón. La presencia de CK-BB en suero se ha asociado con shock y algunos tipos de mioplasma malignos.

Valores de referencia: CK-MB < 25 uds/Lt.

### Deshidrogenosa Láctica (LDH):

Es una enzima intracelular, por lo tanto su elevación es índice de daño tisular, con la consecuente liberación de enzima a la circulación. El daño puede ser desde una simple anorexia hasta una necrosis celular severa, produciéndose, por lo tanto, diversos grados de elevación de la actividad enzimática en suero.

Cuando los niveles de LDH total se alteran, la determinación de la isoenzima predominante posibilita la identificación del órgano comprometido (corazón, hígado, músculo esquelético, riñón, etc.).

En caso del infarto agudo de miocardio (IAM), la actividad del LDH total (junto con las CK, GOT) constituye un elemento importante de diagnóstico. La LDH comienza a aumentar 12-24 horas después de producido el infarto, alcanzando un pico entre las 48-72 horas y permanece aumentado hasta el séptimo o décimo día.

Por otra parte, también se registra un aumento de la LDH total en pacientes con necrosis hepática (producida por agentes tóxicos o por infecciones agudas, como la hepatitis viral).

Valores de referencia: 89 - 221 uds/Lt.

### Electrólitos: NA, K, Cl:

Es una de las determinaciones más importantes del laboratorio clínico ya que desempeñan múltiples papeles en el cuerpo humano y casi no hay proceso metabólico que no sea afectado o dependa de los electrolitos.

### Sodio:

Es el principal catión del líquido extracelular. Ocupa un papel central en el mantenimiento de la hidratación y presión osmótica normales.

Valores de referencia: 135 - 145 mmol/Lt.

*Hay disminución de sodio en:* extrema pérdida de orina, acidosis metabólica, enfermedad de Addison, diarrea y enfermedad tubular.

*Hay aumento de sodio en:* Hiperadrenalismo, deshidratación grave, ciertos tipos de daños cerebrales, coma diabético después de terapia con insulina y tratamiento excesivo con sales sódicas.

### Potasio:

Es el mayor catión intracelular, una vez absorbido por el tracto intestinal, es eliminado, parcialmente, del plasma por filtración glomerular y luego reabsorbido casi por completo por los túbulos.

La determinación de potasio es muy importante en situaciones que se sospechan niveles extremadamente altos o bajos. Hay disminución de K por ingesta insuficiente del mismo, pérdida excesiva en las heces fecales o vómitos. Hiperpotasemia en casos de oliguria, anuria o de obstrucción urinaria.

Valores de referencia: Recién nacidos → 3.7 - 5.9 mmol/Lt

Niños → 3.4 - 4.7 mmol/Lt

Adultos → 3.1 - 5.1 mmol/Lt

Estos dos cationes son analizados por fotometría de emisión de llama.

### Cloruros:

Es el principal anión extracelular, interviene, de forma importante, en el mantenimiento de la hidratación y la presión osmótica apropiadas y del

balance anión-cación normal. Los iones cloruros son absorbidos de la dieta, casi completamente, por el tracto intestinal y se separan de la sangre por filtración glomerular.

Se observan valores bajos en nefritis con pérdida de la acidosis metabólica (enfermedad de Addison), vómitos prolongados. Valores altos en deshidratación y en condiciones que causan disminución del flujo de sangre renal, como el fallo cardíaco congestivo y tratamientos excesivos con cloruros.

Generalmente la prueba se determina con una técnica de titulación.

Las pruebas de laboratorio clínico son utilizadas con fines diagnóstico por el médico, por la evaluación de los llamados perfiles, que, de acuerdo al área de investigación, se denominan: Perfil electrolítico, Lipídico, Obstétrico, Reumatoide, Tiroideo, Hemático, Urianalítico, Renal / Hipertensivo, Hepático, entre otros.

Valores de referencia: 96 - 106 mmol/Lt.

#### Ácido Vanilmandélico (VMA):

Es una prueba que se determina en orina de 24 horas, está basada en las terminaciones de la médula suprarrenal, se le indica a pacientes hipertensos, para averiguar la existencia de feocromocitoma. Es una prueba sensible a ciertos medicamentos, por lo tanto los pacientes sometidos a esta investigación deben tener una dieta exenta de algunos alimentos como: café, plátanos, alimentos que contengan vainilla, banana, también algunos fármacos, tales como: ácido nalidíxico y aspirinas, entre otros.

Valores de referencia: 2 - 10 mg/24 hrs.

#### 17-cetosteroides y 17-hidroxicorticosteroides:

Son pruebas que se realizan en orina de 24 horas. Su valor clínico radica en los compuestos glucosacáridos de los corticosteroides urinarios, los cuales son hidrolizados por la glucosidasa Beta.

#### 17-cetos:

Son metabolitos de los andrógenos secretados por las glándulas suprarrenales, los testículos y, probablemente en pequeña cantidad, por los ovarios. En el hombre, un tercio de los 17-cetos urinarios, representan, los metabolitos de la testosterona secretada por los testículos, mientras que los dos tercios restantes son derivados de los esteroides producidos por las suprarrenales.

Valores aumentados se pueden encontrar en tumores testiculares, hiperplasia adrenal y carcinomas. Mientras que valores disminuidos son factibles de encontrar en hipogonodismo primario o síndrome de Kline-

felter h secundario y enfermedad de Addison, especialmente en la mujer.

Valores de referencia: Hombres → 8 - 20 mg/24 hrs

Mujeres → 4 - 15 mg/24 hrs

### D-xilosa:

Es una prueba que se usa como diagnóstico en los procesos acompañados de alteraciones en la función absortiva del intestino delgado.

Es una prueba peristosa que no se encuentra, normalmente, en sangre, pero que como otro azúcares simples, es absorbida en el duodeno y en la porción alta del yeyuno.

Se encuentran excreciones anormalmente disminuidas en enfermedad celíaca y síndromes relacionados.

Suelen encontrarse valores D-xilosa urinaria disminuidos en ancianos, sin implicar esto alteraciones de la función intestinal.

Es una prueba que se realiza en orina de 5 horas, después de la administración del azúcar.

Valores de referencia: Niños → 1.09 - 1.79 gr./vol.

Adultos → 1.50 - 2.10 gr./vol.

### Eritrosedimentación o velocidad de sedimentación de los eritrocitos:

Es una prueba selectiva no específica y con frecuencia presenta valores elevados en enfermedades infecciosas y procesos inflamatorios malignos. Refleja, frecuentemente, el incremento del fibrinógeno o gamma-globulina o ambos. Es útil para seguir el proceso de evaluación de la artritis reumatoide y fiebre reumática aguda. (Ver Figura #19).

Valores de referencia: Hombres → Hasta 15 mm/hora

Mujeres → Hasta 20 mm/hora

### Triyotironina (T<sub>3</sub>):

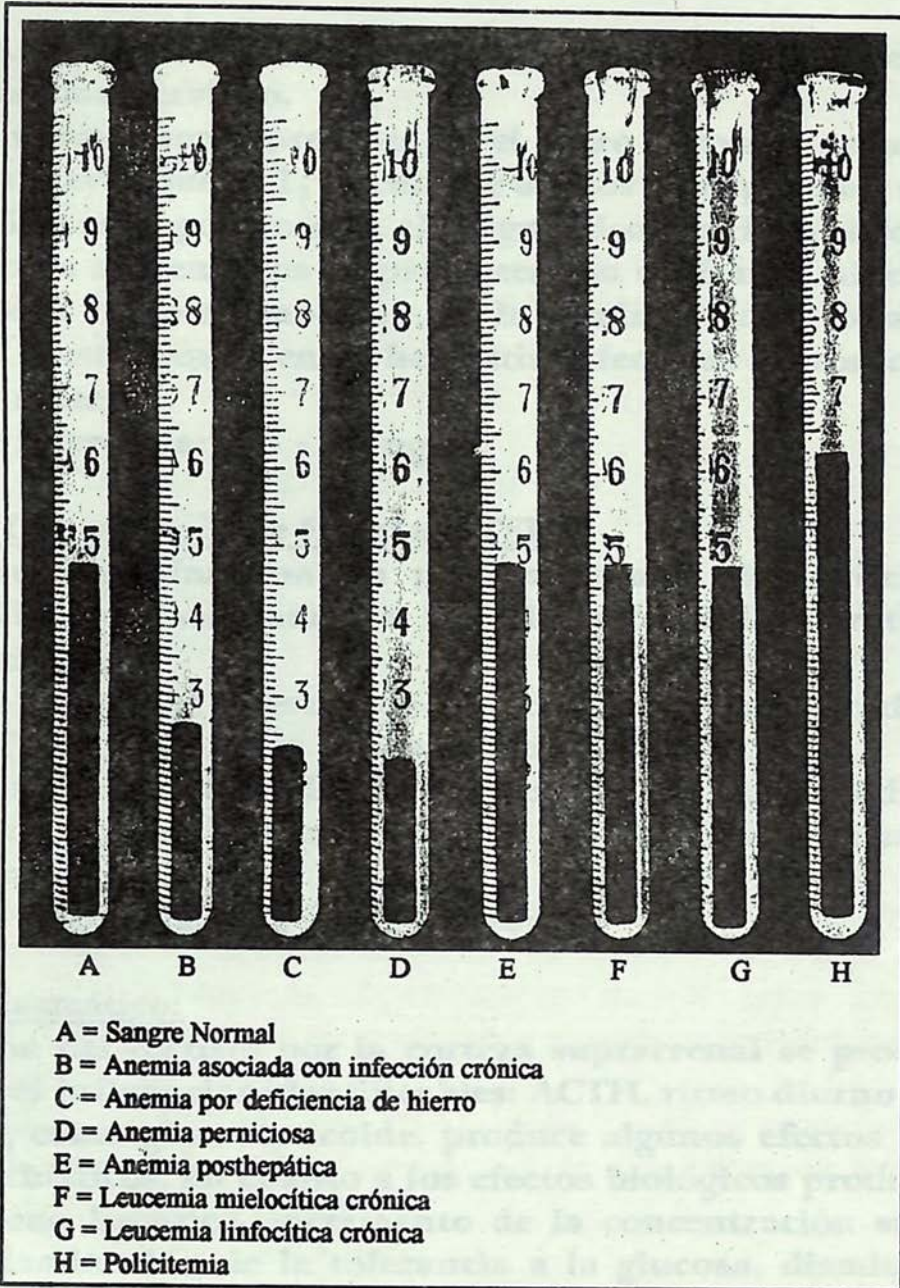
Es responsable de la regulación de diversos procesos bioquímicos a través del organismo, que son esenciales para el desarrollo y la actividad metabólica y del sistema nervioso. El T<sub>3</sub> tiene un peso molecular de 651 daltones y contiene un 58% de yodo.

Aproximadamente un tercio de todos los T<sub>4</sub> secretados es desdoyada para producir T<sub>3</sub>.

Valores de referencia: 0.8 - 2.0 ng/ml

### Tiroxina (T<sub>4</sub>):

Es una hormona yodada con un peso molecular de aproximadamente 777 daltones, secretada por la glándula tiroidea. Es responsable, junto con la T<sub>3</sub>, de la regulación de diversos procesos bioquímicos a través del



**Figura #19**  
**Eritrosedimentación**

organismo, que son esenciales para la actividad normal del metabolismo y del sistema nervioso.

La  $T_4$  está normalmente presente en el suero humano, en una cantidad de 50 veces mayor que la  $T_3$  circulante unidos a las proteínas.

Su evaluación es importante en el diagnóstico funcional tiroideo. Se observan valores aumentados en pacientes con un franco hipertiroidismo, en situaciones como el embarazo, en la administración de anticonceptivos orales o estrógenos, en la hepatitis infecciosa y crónica activa, cirrosis biliar, etc..

Valores de referencia: 4.5 - 12 ng/dl

### Hormona Tiroestimulante Humana (TSH):

Es una glucoproteína con un peso molecular de aproximadamente 28,000 daltones, sintetizada por las células basófilas (tirotropas) de la hipófisis anterior.

La síntesis de la TSH es estimulada por la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH), que es un tripéptido hipotalámico.

Se encuentra valores elevados de TSH en caso de hipotiroidismo primario, mientras que en el hipotiroidismo terciario puede estar normal o disminuido.

Valores de referencia: 0.38 - 4.70 mUI/ml

### Cortisol Plasmático:

La secreción del cortisol por la corteza suprarrenal se produce en respuesta a tres influencias identificables: ACTH, ritmo diurno y estrés.

El cortisol, como glucocorticoide, produce algunos efectos biológicos y celulares o hísticos. En cuanto a los efectos biológicos produce aumento del glucógeno hepático, incremento de la concentración sanguínea de glucosa, disminución de la tolerancia a la glucosa, disminución de la captación y utilización periférica de glucosa. En cuanto a los efectos celulares produce retraso de reacciones inflamatorias, linfopenia, eosinopenia, aumento de eritropoyesis, aumento de la secreción gástrica.

Valores de referencia: 5.5 - 20 ug/dl a.m.

2.0 - 10 ug/dl p.m.

### Antígeno Carcinoembrionario (CEA):

Tiene un valor significativo en la monitorización de paciente con tumores malignos diagnosticados, en los cuales se observan concentraciones variables de CEA. Una elevación persistente del CEA circulante, a continuación del tratamiento, indica fuertemente la presencia de metástasis oculta y/o de enfermedad residual, también un CEA elevado puede estar asociada con una afección maligna progresiva y de una mala respuesta terapéutica.



Esta prueba tiene un valor significativo en el seguimiento de pacientes con carcinomas, colon rectal, de mama, de pulmón, de próstata, de páncreas y de ovarios.

El CEA no se puede recomendar con un procedimiento de Screening para descubrir cáncer en la población en general, su aplicación está ampliamente aceptada como una prueba auxiliar en la predicción del pronóstico y como ayuda en el tratamiento del paciente afectado de cáncer.

Valores de referencia: No Fumadores → 0 - 3 ng/ml

Fumadores → 5 - 10 ng/ml

### Antígenos Específicos Prostáticos (PSA):

Se descubrió por primera vez en 1979 por Wang. Es una secreción del epitelio de la próstata y también es producida por las células cancerosas de la próstata. El PSA fué caracterizado como monómero de glicoproteína de 33,000 a 34,000 unidades de masa atómica. Mas recientemente, ha sido reportada la presencia de aminoácidos del antígeno. Se ha desarrollado una enzima inmunoasa por Kuriyama la cual detecta baja concentraciones del PSA, en la sangre de los pacientes con enfermedades malignas y benignas de la próstata.

Este estudio también reporta una asociación exclusiva del PSA en los tejidos de la próstata, hallazgo que fué confirmado mediante análisis inmunocitoquímicos y los subsecuentes estudios clínicos. La prueba del PSA tiene un diagnóstico significativo en detectar enfermedades persistentes o metastásicas en pacientes siguen tratamientos médicos o cirugías de cáncer en próstata.

Una elevación persistente del PSA, después del tratamiento o un aumento en el nivel del PSA, antes del tratamiento es indicativa de enfermedad recurrente o residual.

Valores de referencia: hasta 4.0 mg/ml.

### Médula Ósea:

El examen de médula ósea es útil en las anemias, otras citopenias, leucocitosis no explicada, o trombocitosis, o cuando se sospecha la existencia de leucemia porque permite hacer una estimación del centro hematopoyético y la comprobación de los depósitos.

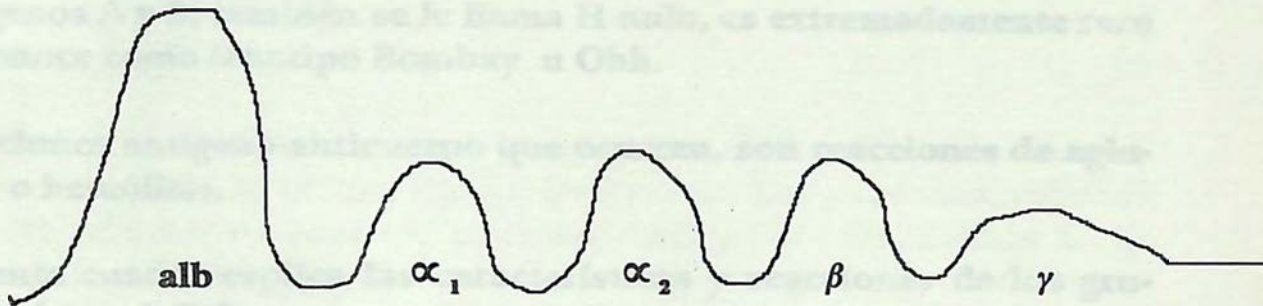
### La Electroforesis:

Constituye una de las pruebas diagnósticas mas valiosas. Además uno como prueba diagnóstica, también es utilizada en algunos para seguir el curso de la enfermedad. También podríamos decir que es una prueba de screening o cedazo, pues, en algunos casos, las anormalidades se determinan, finalmente, con el uso de técnicas inmunológicas.

Modernamente se utiliza la densitometría para la cuantificación de las diferentes fracciones protéicas. Cada fracción protéica se expresa en % y en mg, para expresarla en mgs % es necesario conocer el valor de proteínas totales del suero correspondiente.

### Patrones Electroforéticos:

- 1) Patrón Normal: Todos los valores caen dentro de los límites normales al igual que las proteínas totales.



- 2) Gammopatía Monoclonal: Este patrón electroforético se caracteriza por un pico alto de base estrecha generalmente en la región gamma; pero, a veces, puede presentarse en la región beta y en alfa<sub>2</sub>. Las proteínas totales generalmente están elevadas y la albúmina está normal. Puede encontrarse en mieloma múltiple.
- 3) Gammopatía Policlonal: Este patrón electroforético muestra una banda difusa de base ancha en la región gamma, la albúmina se encuentra normal y la gamma está elevada. Comprende las siguientes patologías: Lupus eritematoso sistémico, hepatitis tuberculosis o artritis reumatoide.

### Inmunohematología

#### Determinación de Grupo Sanguíneo ABO:

En el sistema de grupos sanguíneos ABO existen los antígenos A, B y H, que se encuentran en la membrana de los glóbulos rojos, fué descubierto por Landsteiner en 1900.

Podemos identificar la presencia de estos antígenos poniendo en contacto los glóbulos rojos de la persona con antisueros comerciales Anti-A, Anti-B y Anti-A,B. Esto se conoce como tipificación directa.

En este sistema existen "Anticuerpos Naturales" y la persona presenta en su suero el anticuerpo en contra del antígeno que carece; esto nos permite realizar la llamada "Tipificación Inversa" en la cual se pone en contacto el suero de la persona con glóbulos rojos conocidos como grupo A y grupo B.

También existe el fenotipo Bombay; reportado, por primera vez, por Bhende en 1952, en Bombay, India. Conociéndose más de 130 fenotipos en varias partes del mundo.

Se le llama así por que carece del gen H necesario para la formación de los antígenos A y B, también se le llama H nulo, es extremadamente raro y se le conoce como fenotipo Bombay u Ohh.

Las reacciones antígeno-anticuerpo que ocurren, son reacciones de aglutinación o hemólisis.

El siguiente cuadro explica las características y reacciones de los grupos sanguíneos A B O.

TIPIFICACIÓN DIRECTA				TIPIFICACIÓN INVERSA			
Grupo	Anti-A	Anti-B	Anti-A, B	Antígenos Presentes	Células-A	Células-B	Anticuerpos Presentes
O	O	O	O	H	+	+	Ant.A, Ant.B
A	+	O	+	A	O	+	Ant.B
B	O	+	+	B	+	O	Ant.A
AB	+	+	+	A y B	O	O	Ninguno

#### Determinación del Factor Rh:

Se realiza conjuntamente con la determinación del grupo sanguíneo ABO. Esta prueba determina si la persona posee o no el factor Rh en la membrana de sus glóbulos rojos. Se realiza poniendo en contacto glóbulos del paciente con antisuero comercial anti Rh, si hay aglutinación se dice que la persona es "Rh positiva", porque posee el factor Rh en sus glóbulos rojos. Si no hay aglutinación se dice que la persona es "Rh negativo". Fué descubierto por Londsteiner y Wiener en 1939.

A las personas que han resultado Rh negativo hay que hacerles la llamada "Variante D<sup>+</sup>" ya que existen personas que poseen el antígeno Rh débil, o por interacción genética el antígeno C inhibe la manifestación del antígeno Rh; al tipificarlos con anti-Rh no ocurre aglutinación pero podemos llamarlo Rh negativo ya que poseen, de una forma u otra, al antígeno Rh.

Dentro del sistema Rh - Hr, las personas las podemos clasificar como:

**Rh positivo**

**Rh negativo D<sup>+</sup> negativo**

**Rh negativo D<sup>+</sup> positivo**

Además de los sistemas de grupos sanguíneos ABO y Rh - Hr, existen otros como son el Kell, MNSs, Diego, Duffy, etc.. Las personas, regularmente, sólo se tipifican para los sistemas ABO y Rh - Hr, debido a que son los más importantes por la frecuencia e inmunogenicidad de sus antígenos.

#### **Pruebas de Compatibilidad:**

Son pruebas que se realizan antes de una transfusión sanguínea, para minimizar las probabilidades de que el paciente reaccione ante la sangre del donante.

Existen dos pruebas de compatibilidad o cruces sanguíneos:

- 1.- **Prueba de compatibilidad mayor:** Es capaz de detectar anticuerpos en el suero del receptor que sean capaces de reaccionar con los glóbulos rojos del donante. Es la más importante.
- 2.- **Prueba de compatibilidad menor:** Es capaz de detectar anticuerpos en el suero del donante que sea capaz de reaccionar con los glóbulos rojos del paciente.

Las reacciones antígeno-anticuerpo pueden ser de aglutinación o hemólisis. Si ocurre aglutinación o hemólisis se dice que la sangre es incompatible, si no ocurre reacción, se dice que la sangre es compatible y se puede transfundir al paciente.

Además de las pruebas de compatibilidad, en banco de sangre, existe una serie de análisis que debe practicársele al donante antes de ser transfundida una unidad de componente sanguíneo del donante en cuestión.

Dentro de estas pruebas tenemos: Hemograma, VDRL, SGPT, Hbs Ag, HVC, HIV, Prueba de Coombs Directa, Prueba de Coombs Indirecta.

### El Hemograma:

Un hombre donante debe tener un Hcto. no menor de 41%, con una Hb de 13.5 gr/dl, mientras que la mujer donante debe tener no menos de 38% de Hcto. y 12.5 grs/dl de Hb y un conteo de glóbulos blancos entre 4,000 - 12,000 GB/mm<sup>3</sup> para ambos sexos.

### Antígeno Australiano o Hepatitis B (Hbs Ag):

Este virus se sintetiza en exceso y ataca el citoplasma del hepatocito, se puede detectar de tres formas: en el período de incubación, fase aguda y estadio crónico.

Aparece 3-4 semanas antes del comienzo de los síntomas y alcanza la máxima concentración en el comienzo de la clínica, persistiendo de 1 a 5 meses.

Se puede transmitir por tres vías: a) percutánea (con sangre y sus derivados, agujas contaminadas, hemodiálisis, etc.), b) perinatal y c) contacto sexual o interno. Se reporta positivo o negativo.

### Hepatitis Viral C (HCV):

Se le llamó HCV a la hepatitis NANB y con un HVB negativo. Esta hepatitis tiene un período de incubación entre 15 días y 6 meses, con una media de 2 meses. Los síntomas son los mismos que la hepatitis B con mayor tendencias a formar leves anictéricos y un 75% de las veces, asintomáticas.

La HCV tiene tres vías de transmisión, que son: a) percutánea (contacto con sangre y sus derivados, jeringuillas contaminadas, etc.), b) sexual (homosexuales y heterosexuales), c) contactos domésticos. Se reporta positivo o negativo.

### Virus Inmunodeficiencia Humana (HIV):

Es causado por dos tipos de virus de la Inmunodeficiencia Humana, denominado colectivamente HIV.

El HIV-1 ha sido aislado en pacientes con SIDA, con el complejo relacionado al SIDA y en personas sanas de alto riesgo. Se transmite por contacto sexual, por exposición a sangre o a ciertos productos derivados de la sangre y, además, de la madre infectada al feto o recién nacido.

El primer caso de HIV-2 se aisló en 1986 en el África Occidental. Esta cepa no es tan común como el HIV-1. Se reporta no reactivo o reactivo, porque no es una prueba específica.

La prueba específica se llama Westen-Blood.

**Test de Coombs Directa (TCD):**

Sirve para detectar autoanticuerpos, anemias hemolíticas, enfermedad hemolítica de recién nacido e investigar reacciones dudosas en una transfusión. Tanto el TCD como al Test de Coombs Indirecto (TCI) se le llaman pruebas de antiglobulina humana, se reporta negativo o positivo.

**Test de Coombs Indirecto (TCI):**

También se llama prueba de antiglobulina humana. Se realiza para detectar anticuerpos irregulares en circulación, que reaccionan in vitro con el correspondiente antígeno, se le practica a toda persona que vaya a recibir sangre o a todos los donantes de sangre o a la madre Rh negativo (embarazada).

A toda prueba que resulte positiva se le debe realizar un panel de células para obtener el nombre del anticuerpo, luego se realiza una titulación del mismo para ver que alto está el título de dicho anticuerpo. Se reporta positivo o negativo.

**Pruebas de exclusión de paternidad:**

Estas pruebas se realizan para negar o excluir que determinado hombre no es el padre biológico. Dentro de estas pruebas tenemos los sistemas de grupos sanguíneos; estos se heredan en pares, siguiendo las leyes de medelania proviniendo uno de cada padre.

Cuando ambos son iguales, hablamos de homocigotos, ejemplos: AA, BB, etc., y heterocigotos cuando ambos son diferentes, como OA, AB, OB, etc..

Otra prueba es el antígeno de leucocitos humanos (HLA). Está compuesto por una serie de estructuras o antígenos localizados en el brazo corto del cromosoma #6. Normalmente heredados en bloques llamados haplotipos.

Y por último, tenemos el ácido desoxirribonucléico (DNA), es una molécula compleja que se encuentra con el núcleo de la célula de los organismos vivientes, especialmente en los cromosomas.

El contenido genético del DNA es la expresión hereditaria recibida a partes iguales de los padres. En un individuo, una mitad viene del padre y la otra mitad de la madre.

En conclusión, las pruebas de paternidad nunca afirman que X niño es hijo de X padre, sino que niegan o excluyen que X hombre sea el padre biológico de X niño.

**Serología:**

Los métodos serológicos son usados como auxilio en el diagnóstico de una amplia variedad de enfermedades, sobre todo en infecciones.

Los anticuerpos reaccionan con los huéspedes propios en el tejido y el uso de anticuerpo para identificar sustancias circulantes, tales como: cuantificación de inmunoglobulina, por ejemplo.

Hay cuatro clases de procedimientos serológicos: Aglutinación, Precipitación, Fijación de Complemento y Anticuerpos Fluorescentes (Inmunofluorescencia). En todos se mide la reacción entre antígeno-anticuerpo, las dos primeras consideradas en la fase de reacción antígeno-anticuerpo y los últimos en la segunda fase con un indicador luego de ocurrir la reacción.

Las de aglutinación, generalmente, se realizan en placas y tubos.

**La Sífilis:** es una de las enfermedades venéreas más antiguamente conocidas. Su agente etiológico, el *Treponema Pallidum*, posee la capacidad de invadir las mucosas intactas o la piel en áreas de abrasiones. El contacto sexual es la forma más común de transmisión.

Luego de la invasión, los microorganismos se multiplican y diseminan rápidamente. La detección y tratamiento de la enfermedad en sus estadios tempranos, es fundamental, a fin de evitar complicaciones graves, como son la neurosífilis, sífilis cardiovascular y sífilis congénita, producida por la infección transplacentaria del feto en desarrollo.

La prueba que se utiliza para su detección es la de VDRL, es una prueba de floculación en la cual la reagina del suero del paciente produce reacción visible con el antígeno-cardiolipina, ciertos procesos como hepatitis infecciosa aguda, pueden aumentar la reagina y provocar una prueba de VDRL reactiva, falso para sífilis, por lo que debe confirmarse con la prueba de absorción del anticuerpo treponémico fluorescente (FTA - ABS y FTI). Esta prueba se reporta reactiva y no reactiva.

**Prueba de anticuerpo heterófilos (Paul - Bunnell):** Para el diagnóstico de mononucleosis infecciosa, el 7% de los pacientes presentan la prueba heterófila positiva, utiliza la prueba eritrocitos de carnero lavados y antígeno de Forssman, la titulación alta puede persistir aún después de la mejoría clínica.

**La mononucleosis infecciosa:** Es una enfermedad benigna producida por el virus de Epstein-Barr (EBV), que se caracteriza, en su aspecto clínico, por la aparición de fiebre irregular durante una ó dos semanas, dolor e hinchazón de los ganglios cervicales e irritación faríngea; con un cuadro hematológico bastante característico, debido a la gran proliferación de células linfocíticas atípicas.

**Antígenos Febriles:** Suspensiones bacterianas que se usan para la determinación de anticuerpos específicos, basándose en la reacción de Widal (Salmonella), reacción de Huddleson (Brucella) .

**Las Salmonellas** se consideran patógenas entéricas obligadas y su aislamiento en un individuo implica enfermedad o estado de portador. La enfermedad puede presentarse en tres formas distintas: gastroenteritis, septicemia con lesiones en diversos órganos o fiebre tifoidea. Las salmonellas pueden ser de diferentes tipos: S.typhi H (dH), S.paratyphi O, S.paratyphi A-H, S.paratyphi A-O, S.paratyphi B-H, S.paratyphi B-O, S.paratyphi C-H, S.paratyphi C-O, Brucella abortus, S.typhi O (HO).

**La Brucelosis** se presenta en la mayoría de los casos con anorexia, fiebre, decaimiento y escalofríos. (Brucella Abortus).

Otros tipos de Antígenos Febriles son: proteus OX<sub>19</sub>, proteus OX<sub>2</sub>, proteus OXK.

### **Factor Reumatoide:**

Es la prueba que se utiliza para detectar la artritis reumatoidea; que es un síndrome crónico de etiología desconocida. Caracterizado por una inflamación inespecífica y, generalmente, simétrica de las articulaciones, que a veces evoluciona hacia la destrucción de las estructuras articulares y periarticulares.

### **Proteína C-Reactiva (PCR):**

Ayuda para el diagnóstico y tratamiento de ciertos procesos inflamatorios. La Proteína C-Reactiva aparece, habitualmente, en el suero durante la fase aguda de la mayoría de las infecciones bacterianas y de algunas infecciones virales, de la fiebre reumatoide, muchas enfermedades del colágeno y otros procesos patológicos que cursan con inflamación.

### **Streptozipme, Antiestreptolisina O (ASO) :**

Son pruebas que se utilizan para la determinación de las secuelas de la infección por estreptococos A, tales como los que pueden aparecer en casos de faringitis estreptocócica, fiebre reumática, piodemia, glomerulonefritis y otras infecciones estreptocócicas.



Los estreptococos B hemolíticos de los grupos A, C, G segregan una enzima: la staeptolisina "O", que en su forma reducida presenta actividad hemolítica.

#### Prueba de Embarazo:

La gonodotropenia coriónica humana (HCG) es excretada por la orina durante el embarazo, su detección en orina es una prueba positiva. La muestra debe ser orina colectada en un recipiente limpio, a cualquier hora del día.

#### En el área de parasitología:

El diagnóstico clínico de infecciones y endoparasitarias muy frecuentemente depende del material parasitario demostrado por los métodos de laboratorio.

Las técnicas parasitológicas empleadas en los estudios de heces se aplican algunas veces para la búsqueda de protozoos y helmintos. Los exámenes deben realizarse antes del ingreso al hospital para tratamiento terapéutico.

Es eficaz un examen macroscópico, con fines de encuentros de nemátodos adultos y proglótides de tenias. Los métodos microscópicos se basan en técnicas que utilizan salina saturada y lugol. También técnicas de concentración como método de éter, formalina (Ritchie), sulfato de zinc (Faust), Willys Malloy, entre otros.

Los de flotación (Faust y Willys Malloy) se basan en la diferencia de gravedad específica de los quistes y huevos y de otros componentes fecales. Con estos métodos se observan quistes, huevos y parásitos como algunos que mencionaremos: Giardia lamblia, Entamoeba histolytica, Entamoeba coli, Trichuri-Trichiura, uncinaria, ascaris, etc..

En sangre se preparan películas delgadas (extendidas) de sangre. Se investiga malaria, filariasis y microfilarias.

#### Las inmunoglobulinas:

Son proteínas de defensa inmunitaria. Entre estas tenemos las siguientes: IgG, IgA e IgM.

Las IgM y la IgA no atraviesan la placenta normal, en cambio la IgG pasan de la circulación materna al feto, confiriéndole inmunidad pasiva al recién nacido. Los anticuerpos contra virus y bacterias son globulinas IgG.

A continuación le presentaremos algunas patologías en las cuales se encuentran los niveles de inmunoglobulina alterados:

**Poliartritis reumatoidea, cirrosis hepática, lupus eritomatoso.** Se encuentran aumentado las inmunoglobulinas IgG, IgA y la IgM normal o ligeramente aumentado.

**Cirrosis biliar, la IgG, IgA normal, IgM aumentada.**

**Carcinoma hepático (primario), IgG, IgA normal, IgM disminuido.**

**Leucemia linfoblástica aguda y leucemia mielocítica crónica, IgG normal, IgA disminuida e IgM normal.**

**Síndrome de Down (mongolismo), los niveles de IgG e IgA aumentados y IgM disminuidos.**

Los complementos son:  $C_3$  y  $C_4$ .

Los niveles aumentados de  $C_3$  y  $C_4$  se encuentran en las siguientes patologías: infarto del miocardio, poliartritis crónica progresiva (PCP), poliartritis reumatoide.

Los niveles disminuidos de  $C_3$  y  $C_4$ : lupus eritomatoso sistémico, artritis reumatoide, glomerulonefritis y otras enfermedades inmunológicas del hígado.

Los niveles disminuidos de  $C_3$  y normales de  $C_4$ : lupus eritomatoso disseminado (LED), glomerulonefritis proliferativa.

## BIBLIOGRAFÍA

- 01.- Abbott : *Thyroid Function IMX System*, 1996.
- 02.- Abbott Diagnostic Educational Service : *A Guide to Recent Advances in Tumor* , 1996.
- 03.- Abbott, Lab. : *Hepatitis Virales. Monografías Sobre Hepatitis Virales*, Madrid, Nov/1996.
- 04.- Blackwell Scientific Publications : *Coagulation and its Disorders*, Oxford, 1996.
- 05.- Brown, Bárbara A. : *Hematology Principles and Procedures*, 6<sup>th</sup> Edition, 1996.
- 06.- Bryant, N. : *Laboratory Immunology and Serology*, 4<sup>th</sup> Edition, 1996.
- 07.- Carter Wallace Inc., Gran Bury: *Pruebas Diagnósticas. Especializado Lab.*, New Jersey 08512, USA.
- 08.- Collins, L. : *The Coagulation Factors*, Dade Division American Hospital Supply Corporation, Miami, Fla., 1996.
- 09.- Escuela de Bioanálisis : *Manual de Práctica de Inmunología*, Unidad #3, Electroforesis de Proteínas.
- 10.- Henry, J. : *Clinical Diagnostic and Manageme by Laboratory Methods*, Ninetenth, 1996.
- 11.- Pagana : *Diagnostic and Laboratory Test Reference*, 3<sup>rd</sup> Edition, Mosby, 1997.
- 12.- Pretto de Blanco, T.M. Teresa : *Manual de Banco de Sangre*, Escuela de Bioanálisis, 1994.
- 13.- Rojas, W. : *Inmunología*, Colombia, Editorial Colina, 2da. Edición, 1996.
- 14.- Rose, Conway De Macario, Folds, Lanne, Nakamura : *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 5<sup>th</sup> Edition, 1997.

- 15.- **Todd-Sanford-Davidsohn, John Bernard : *Diagnóstico y Tratamiento Clínico para el Laboratorio*, 1997.**
- 16.- **Wintrobe M.M. ET AL : *Clinical Hematology*, 10<sup>th</sup> Edition, Lea & Febiger, Philadelphia, 1997.**