

ORGANIZACIÓN DE LA SECCIÓN DE CITOMORFOLOGÍA

Autora

Dra. Tania Carballo Treto

Colaboradores

Dr. Jorge H. Suardíaz Pareras, Dr. Celso Cruz Rodríguez

Departamento

Laboratorio Clínico

CONTENIDO

- Anticoagulantes
- Fracción de volumen de los eritrocitos (hematocrito). Micrométodo
- Determinación fotométrica de hemoglobina en sangre
- Determinación de la concentración del número de leucocitos
- Determinación de fracción de número y examen de leucocitos
- Determinación de la velocidad de sedimentación eritrocitaria
- Conteo de reticulocitos
- Examen de médula ósea
- Electroforesis de hemoglobina
- Cuantificación de Hb fetal
- Test de Brewer
- Test de HAM
- Test de Crosby
- Test de sacarosa
- Test de la inulina
- Resistencia osmótica
- Técnica: cuantificación de Hb A2 por microcromatografía
- Prueba de solubilidad
- Hemoglobina plasmática
- Método cuantitativo para detectar déficit de piruvato quinasa
- Hierro sérico
- Funcionamiento del equipo MICROS 60
- Hemograma automatizado con los siguientes parámetros:
- Fijación, coloración y evaluación de lámina periférica.
- Fijación, coloración y evaluación de extendidos de material medular.
- Citoquímicas en sangre periférica y/o médula ósea

Organización

Estos procedimientos se le realizan a todos aquellos pacientes atendidos en el

servicio de Hematología, hospitalizados o de consulta externa y además se le realizan estudios a pacientes ingresados y de consulta externa de otros servicios que requieren un estudio hematológico especial.

Anticoagulantes

El uso de anticoagulantes en el laboratorio clínico es una práctica generalizada y tiene su origen en la necesidad de inhibir el proceso fisiológico de la coagulación de la sangre, cuando se requiere como material biológico sangre total o plasma.

Las sustancias que tienen acción anticoagulante se utilizan solas o combinadas, lo cual está en relación con la obtención del mejor efecto como tal y la menor afectación del material biológico al que se añaden. Para una correcta utilización del anticoagulante debe observarse lo siguiente:

- Utilice siempre el anticoagulante requerido.
- Cumpla estrictamente los volúmenes indicados para la mezcla anticoagulante material biológico.
- Mezcle por inversión suavemente de 4 a 5 veces para que dicha mezcla se efectúe sin que se dañen los elementos celulares (hemólisis) y el anticoagulante ejerza su acción.
- Procese la muestra en el tiempo requerido para evitar mantenerla en reposo más de 4 h como máximo.

Anticoagulantes en los análisis hematológicos

- ***Sales disódica y dipotásica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA.Na₂ y EDTA.K₂) solución 10 % (m/v)***
 - ✧ **Acción:** estas sales ejercen su acción anticoagulante eliminando los iones de calcio por quelación. Además, tienen efecto estabilizante sobre los componentes celulares sanguíneos: eritrocitos, leucocitos y trombocitos.
 - ✧ **Preparación:** en un matraz de un trazo de 100 mL se vierten 10 g de cualquiera de las dos sales, calidad p.a. y se completa a volumen con agua destilada. Esta solución es estable durante seis meses conservada de 2 a 8°C en frasco que garantice un correcto cierre.
 - ✧ **Relación anticoagulante-sangre total:** se deposita 1 gota de la solución 10 % en un tubo para ensayo sobre la que se añaden 4 mL de sangre total, se mezcla por inversión suavemente de 4 a 5 veces.
 - ✧ **Usos:** igual que la mezcla de oxalatos y la heparina.
- ***Citrato trisódico dihidratado (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) p.a. 109 mMol/L (3,29 % m/v)***
 - ✧ **Acción:** este anticoagulante ejerce su acción captando iones de calcio y de esta forma impide que se desencadene el proceso de la coagulación.

- ✧ **Preparación:** en un matraz de un trazo de 100 mL se vierten 3,29 g de citrato trisódico dihidratado p.a. y se completa a volumen con agua destilada. Esta solución es estable durante seis meses conservada de 2 a 8°C, y en frasco que garantice un correcto cierre. Se desecha si aparece turbiedad o precipitado.
- ✧ **Relación anticoagulante-sangre total:**
 - **Para la velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSE)**
 - Se mezcla 1 volumen de anticoagulante y 4 volúmenes de sangre total. Invierta de 4 a 5 veces. Los volúmenes pueden reducirse a la mitad, 0,5 y 2 respectivamente.
 - **Para el tiempo de protrombina**
 - Se mezcla 0,5 mL de anticoagulante y 4,5 mL de sangre total. Invierta suavemente de 4 ó 5 veces.
- ✧ **Usos:** Este anticoagulante se utiliza en la VSE y el tiempo de protrombina; así como se utiliza frecuentemente en otros análisis de coagulación.

Determinación de la fracción de volumen de los eritrocitos (hematocrito). Micrométodo

- **Fundamento del método:** la fracción de volumen de los eritrocitos o hematocrito es el volumen de la masa eritrocitaria expresada como una fracción del volumen de sangre total en la muestra.
- **Muestra** la muestra está constituida por sangre total venosa o capilar. La muestra de sangre venosa se recolecta de igual forma que la descrita para el macrométodo. Puede utilizarse también sangre capilar obtenida por punción digital o del talón (recién nacidos). En este caso es necesario disponer de tubos capilares heparinizados para microhematocrito. Después de realizada la punción se deja fluir la sangre espontáneamente, se elimina la primera gota y al fluir nuevamente, ésta se pone en contacto con el tubo capilar para que penetre en el mismo por capilaridad hasta sus 3/4 partes. Se tapona el extremo del tubo que no ha tenido contacto con la sangre con plastilina o se sella en la llama de un mechero, evitando que la sangre se caliente durante el proceso.
- **Procedimiento:** se coloca el tubo capilar en la ranura numerada del cabezal de la centrífuga para microhematocrito con el extremo sellado apuntando hacia afuera. Se centrifuga a alta velocidad, entre 10 000 y 15 000 min⁻¹ (rpm) durante 5 min.
- **Precauciones:**

- ✧ No ejerza demasiada presión en el pulpejo del dedo o en el talón, para evitar la salida de líquido intersticial. Por igual motivo elimine la primera gota de sangre.
- ✧ Al efectuar la lectura de la columna de eritrocitos, excluya la capa constituida por los leucocitos y los trombocitos.
- ✧ El uso continuo de la centrífuga provoca el calentamiento excesivo del cabezal y esto a su vez la hemólisis de la muestra.
- ✧ Sellar herméticamente los tubos capilares.
- **Método para los cálculos:** la fracción de volumen de los eritrocitos (hematocrito) se obtiene de la lectura que se realiza al colocar el tubo capilar en la escala para obtener resultados (lector para microhematocritos). También puede utilizarse para efectuar la lectura una regla milimetrada (escala de 0 a 100 mm), haciéndose coincidir la base de la columna eritrocítica con el 0. El resultado estará dado por la altura en mm de dicha columna. Se excluye la capa superior blanquecina constituida por los leucocitos y trombocitos.

- **Intervalo de referencia**

Hombres: de 0,42 a 0,55	Vol: /L
Mujeres: de 0,37 a 0,47	

Determinación fotométrica de hemoglobina en sangre

- **Fundamento del método:** el hierro (II) del hemo en la hemoglobina, oxihemoglobina y carboxihemoglobina, se oxida a hierro (III) mediante la acción del hexacianoferrato (III) de potasio formándose la metahemoglobina, la cual reacciona con el cianuro ionizado y se produce cianuro de hemoglobina, complejo de color rojo cuya intensidad se mide fotométricamente a una longitud de onda de 540 nm.
- **Reactivos químicos y bioquímicos**
 - ✧ Solución anticoagulante. se utiliza cualquiera de las descritas en el apartado sobre preparación de anticoagulante para uso en hematología.
 - ✧ Solución reactivo de Drabkin modificada: en un matríz de un trazo de 1 000 mL se vierten:

Ferricianuro de potasio, $K_3Fe(CN)_6$	200 mg
Cianuro de potasio KCN	50 mg
Fosfato monopotásico anhidro, KH_2PO_4	140 mg
Tritón X-100	1 mL
H ₂ O destilada	800 mL

- Se mezcla por inversión hasta disolución completa de las sustancias. Se completa a volumen.
 - Se mide el pH de la solución el cual debe estar entre 7,0 y 7,4 y no presentar absorbancia a 540 nm contra agua.
 - Esta solución es estable hasta seis meses, conservada en frasco de color ámbar, entre 4 y 25° C.
- ✧ Solución de referencia de cianuro de hemoglobina (cianometahemoglobina): se utilizan ámpulas de referencia (solución de cianuro de hemoglobina) las cuales tienen expresada la concentración en mg/L. La concentración de hemoglobina en g/L que contiene dicha ámpula se obtiene mediante la fórmula siguiente:

$$Hb = \frac{251 \cdot c}{1\ 000} = [\quad] \text{ g/L}$$

Donde

251: factor que tiene en cuenta dilución de sangre en reactivo de Drabkin

c: concentración cianuro hemoglobina indicada en el ámpula (mg/L)

1 000 factor para convertir mg en g

Si no se cuenta con las ámpulas de CNHb, puede prepararse la solución de referencia de la forma siguiente:

- Tomar 10 mL de sangre total previamente mezclada con anticoagulante y se centrifuga a 2 500 min⁻¹ (rpm) para separar los eritrocitos del plasma.
- Decantar el sobrenadante que se procede a lavar los eritrocitos 5 veces con solución salina fisiológica y se añade a los eritrocitos, reactivo de Drabkin, hasta llevar la concentración de hemoglobina entre 170 y 200 g/L, para lo cual se toman 0,02 mL de dicho hemolizado y se vierten en 5 mL de reactivo de Drabkin.
- Comprobar la concentración de hemoglobina realizándose la medición fotométrica con espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.
- Se congela como mínimo 3 días a -20° C.
- Se descongela y se filtra a través de papel de filtro doble y se comprueba de nuevo la concentración de hemoglobina, como se ha descrito anteriormente.

Esta solución es estable durante seis meses, conservada a -20° C y en frasco de color ámbar pequeño (5 mL).

- **Muestra:** la muestra está constituida por sangre total. En un tubo para ensayo que contiene anticoagulante se vierte la sangre total y se mezcla por

inversión suavemente de 4 a 5 veces. Se puede utilizar sangre capilar obtenida por punción digital o del talón (recién nacidos) en cuyo caso se elimina la primera gota generalmente rica en líquido intersticial.

- **Procedimiento**

	Blanco	Muestra	Referencia
Solución Drabkin	5 mL	5 mL	--
Ámpula CNHb	--	--	5 mL
Muestra	--	0,02 mL	--

Se mezcla por inversión suavemente el contenido del tubo muestra y se realiza la medición fotométricamente a los 5 min utilizando una cubeta de 1 cm de paso de luz, en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm o en un colorímetro fotoeléctrico o en un hemoglobímetro, ajustando el 0 del equipo con el reactivo utilizado como blanco. El color desarrollado es estable durante 24 h.

- **Precauciones**

- ✧ Utilice la proporción correcta entre el anticoagulante y la sangre.
- ✧ Mezcle bien la muestra (de 10 a 12 veces) antes de tomar los 0,02 mL.
- ✧ Limpie la pipeta de 0,02 mL exteriormente después de medir la sangre.
- ✧ Cuando deposite la muestra de sangre sobre el reactivo, introduzca la pipeta hasta el fondo del tubo, soplela y lávela aspirando y expulsando el reactivo de Drabkin hasta arrastrar la sangre adherida a sus paredes.

- **Gráfico de calibración:** según la concentración de la solución de referencia de CNHb, se hacen tres diluciones con la solución reactivo de Drabkin para obtener 3 concentraciones distintas y equidistantes; por ejemplo 50; 100 y 150 g/L; con el objetivo de conocer el intervalo de concentraciones en el cual el equipo de lectura responde linealmente, con lo cual se calculan los resultados.

- **Método para los cálculos:** si la medición fotométrica se realiza en un espectrofotómetro, la concentración de hemoglobina (Hb) se calcula por la fórmula siguiente:

$$\text{Hb} = 368 \cdot A \text{ (g/L)}$$

Donde:

A absorbancia de la muestra

368 factor que tiene en cuenta la dilución de la sangre y la absortividad en milimol por litro de la hemoglobina

Si la medición se realiza en un colorímetro fotoeléctrico, la concentración de hemoglobina (Hb) se obtiene directamente del gráfico de calibración o mediante la fórmula siguiente:

$$Hb = \frac{A_m}{A_r} \cdot Cr \text{ (g/L)}$$

Donde:

A_m absorbancia de la muestra

A_r absorbancia de la solución de referencia

Cr concentración de la solución de referencia en g/L

Si la medición se realiza en un hemoglobinómetro, la concentración de hemoglobina (Hb) se obtiene directamente de la lectura del equipo, comprobándose diariamente con la solución de referencia. Los resultados se expresan en g/L y se aproximan hasta la décima.

- **Control de la calidad:** se controla la variación de los resultados con un material de control apropiado (hemolizado), debiendo estar el coeficiente de variación en condiciones de rutina (VCR) por debajo de 5 %.

- **Intervalo de referencia**

Hombres: de 130 a 175	g/L
Mujeres: de 120 a 165	

Determinación de la concentración del número de leucocitos

(Cuento global de leucocitos)

- **Fundamento del método:** la sangre total se mezcla con una solución de ácido acético. Se produce la lisis de los eritrocitos y se mantienen intactos los leucocitos que se cuantifican microscópicamente.
- **Reactivos químicos y bioquímicos**
 - ✧ Solución anticoagulante: se utiliza cualquiera de las descritas en el apartado sobre preparación de anticoagulantes para uso en Hematología.
 - ✧ Solución reactivo de ácido acético 333 mMol/L (2 % m/v). Esta solución es estable por tiempo indefinido.
- **Muestra:** está constituida por sangre total, venosa o capilar.
- **Procedimiento:**
 - ✧ Con una pipeta de Sahli se toman 0,02 mL de la muestra de sangre venosa o capilar. En el caso que se utilice esta última, se realiza la punción digital o del talón (recién nacidos); se deja fluir la sangre espontáneamente y se elimina la primera gota.

- ✧ La muestra se deposita en un tubo para ensayo que contiene 1 mL de la solución reactivo de ácido acético 333 mMol/L.
- ✧ Se lava la pipeta en la porción superior de la superficie de la solución.
- ✧ Se mezcla y se deja en reposo 5 min.
- ✧ Se mezcla nuevamente imprimiéndole al tubo para ensayo movimiento oscilatorio rápido para resuspender las células sedimentadas.
- ✧ Con una pipeta Pasteur se carga la cámara de Neubauer evitando derramar el líquido fuera del área cuadrículada. Se deja en reposo 3 min.
- ✧ Se coloca en la platina del microscopio, se enfoca el área cuadrículada y se realiza el conteo de las células (leucocitos) que se encuentran en los 4 grandes cuadrados de las esquinas, incluyendo aquellos que se observen sobre las líneas laterales de cada cuadrado revisado

Precauciones

- ✧ Realice el conteo antes de transcurrir 4 h de extraída la sangre.
- ✧ Limpie la pipeta de Sahli externamente después de aspirar la sangre, tenga cuidado en su enrase y que no existan burbujas de aire en la columna hemática.
- ✧ Lave bien la pipeta en el diluyente para arrastrar la sangre que pueda quedar adherida a las paredes por su elevada viscosidad.
- ✧ *Utilice el cubreobjetos especial para cámaras contadoras.*
- **Método para los cálculos:** la concentración de número de leucocitos (C) se calcula por la fórmula siguiente:

$$C = C_c \cdot 0,125$$

Donde:

C_c Cantidad de células contadas en los 4 cuadrados (4 mm^2)

0,125 Factor matemático para el cálculo que tiene en cuenta el área de los cuadrados, la dilución de la muestra, la profundidad de la cámara y la expresión de los resultados.

Para expresar los resultados, al valor obtenido mediante la fórmula, se le añade la expresión siguiente: $\cdot 10^9/\text{L}$

- **Intervalo de referencia:**

De 4,5 a 11

$\cdot 10^9 / \text{L}$

Determinación de fracción de número y examen de leucocitos
(Conteo diferencial de leucocitos)

- **Fundamento del método:** la extensión de la sangre total sobre un portaobjetos y su posterior tinción permite identificar los diferentes tipos de leucocitos y calcular la proporción de cada uno de ellos en la muestra.

- **Reactivos químicos y bioquímicos**

- ✧ Solución colorante Giemsa (concentrada): prepara de la forma siguiente:

Azur A	0,75 g
Azur B	4,0 g
Eosina azul de metileno	2,0 g
Alcohol metílico	750 mL
Glicerina	250 mL

Se agita a intervalos de 15 min durante 2 ó 3 h. Se conserva en frasco ámbar y es estable durante 3 años a temperatura ambiente.

- ✧ Solución colorante Giemsa (de trabajo)

La solución concentrada se diluye inicialmente con agua neutra (destilada o desionizada) 1:100 (1 volumen de colorante + 99 volúmenes de agua) y se prueba su poder colorante en un portaobjetos sobre el cual se ha hecho una extensión de sangre. La dilución que se utiliza para el lote en cuestión del colorante es aquella con la cual se obtiene la mejor diferenciación y por tanto sea más factible la clasificación de los diferentes tipos de leucocitos.

- ✧ Solución colorante May-Grünwald: se prepara de la forma siguiente:

May-Grünwald (polvo)	3 g
Alcohol metílico	1 000 mL

Se mezcla hasta disolver todo el colorante y se deja en reposo durante 24 h. Se filtra. Esta solución es estable indefinidamente, conservada en frasco ámbar que garantice un correcto cierre. Para ser utilizado se diluye 1:2 (1 volumen de colorante + 1 volumen de agua neutra).

- **Muestra:** la muestra está constituida por sangre total, venosa o capilar.

- **Procedimiento**

- ✧ Se deposita 1 gota de sangre total en el extremo de un portaobjetos y con otro similar, cuyos bordes estén lisos y se le han eliminado las esquinas (puede utilizarse un cubreobjetos).
- ✧ Se toca la gota de sangre para que se extienda a lo largo de la línea de contacto entre ambos.
- ✧ A continuación se desliza hacia el extremo opuesto con un movimiento suave. La extensión de sangre debe tener una longitud entre 3 y 4 cm

- **Tinción de la preparación**

- ✧ **Método I**: cubrir la preparación con alcohol metílico durante 5 ó 10 min. Se sacude para eliminar los restos de alcohol y se cubre con la solución de trabajo del colorante Giemsa preparado según el apartado 2 durante 15 ó 20 min. Se lava con agua potable *y se coloca en posición inclinada para que se seque al aire.*

- ✧ **Método II**: cubrir la preparación con solución colorante May-Grünwald diluida de acuerdo al apartado 2, durante 1-2 min. Se inclina para eliminar el exceso de colorante, se lava con agua destilada y se cubre con solución de trabajo del colorante Giemsa durante 15 ó 20 min. Se lava con agua potable y se coloca en posición inclinada para que se seque al aire.

- **Conteo bajo el microscopio**: colocar el portaobjetos en la platina del microscopio, se deposita una gota de aceite de inmersión sobre la parte de la preparación que será examinada y se realiza el recuento de los diferentes tipos de leucocitos con el objetivo x 100. Se cuenta un total de 100 células a lo largo de la preparación.

- **Método para los cálculos**: la proporción de cada tipo de leucocitos se expresa como una fracción decimal. La suma de todas las fracciones es igual a 1.

Neutrófilos	50-70 %
Monocitos	2-8 %
Eosinófilos	1-4 %
Basófilos	0,5-1 %
Linfocitos	20-40 %

- **Intervalo de referencia**

Determinación de la velocidad de sedimentación eritrocitaria

- **Fundamento del método**: los eritrocitos sedimentan agrupándose en forma de "pilas de monedas" (rouleaux). Las proteínas de fase aguda aceleran dicha agrupación y la albúmina ejerce un efecto opuesto.

- **Reactivos químicos y bioquímicos**

- ✧ Solución anticoagulante de citrato trisódico dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 109 mMol/L

Se pesan 32,08 g de la sal (citrato trisódico dihidratado), se traspasan a un matraz de un trazo de 1 000 mL y se completa a volumen con agua destilada. Se filtra. Esta solución es estable durante 1 año conservada de 2 a 8°C. Se desecha si aparece precipitado o turbiedad.

Al realizar la pesada téngase en cuenta la hidratación de la sal para mantener la concentración requerida.

- **Muestra:** está constituida por sangre total. En un tubo para ensayo de 10 ó 15 mL de capacidad se vierte 1 mL de solución anticoagulante y 4 mL de la muestra y se mezcla por inversión suavemente de 4 a 5 veces. En los casos que se requiera se realiza el ensayo tomando la mitad de los volúmenes que se especifican.
- **Procedimiento:** mezclar la muestra por inversión suavemente de 10 a 12 veces. Se aspira con la pipeta de Westergreen hasta la marca 0 y se coloca en el soporte en posición estrictamente vertical durante 60 min.
- **Precauciones**
 - ✧ Utilice la proporción correcta de sangre y anticoagulante
 - ✧ Coloque la pipeta de Westergreen en posición estrictamente vertical.
 - ✧ Si la muestra se mantiene a temperatura ambiente, la prueba se realiza en el término de 2 h y si se mantiene a 4 °C en el de 4 h.
- **Método para los cálculos:** la VSE se obtiene directamente de la lectura de la escala graduada en milímetros de la pipeta de Westergreen según el descenso experimentado por el extremo superior de la columna de eritrocitos en 60 min. La VSE se expresa en mm/h.

- **Intervalo de referencia**

Hombres: 2-12	mm/h
Mujeres: 2-20	

Determinación de las constantes corpusculares

- **Volumen corpuscular Medio (VCM):** es el más útil ya que permite clasificar y desarrollar una estrategia en el diagnóstico de las anemias. se mide directamente en los contadores ó calcularlo por la fórmula:

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hto Vol/L} \times 1000}{\text{Conteo de eritrocitos (X } 10^{12}/\text{L)}}$$

Valores de referencia: 80–100 fentolitros (10^{-15}L)

- **Hemoglobina Corpuscular Media (HCM):** es una medida del peso promedio de la hemoglobina por glóbulo rojo. Se calcula:

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb g/L}}{\text{Conteo de eritrocitos (x } 10^{12}/\text{L)}}$$

Valores de referencia: 28-32 picogramos (10^{-12}g)

- **Concentración hemoglóbica corpuscular media (CHCM):** es una medida de la concentración promedio de la hemoglobina en el eritrocito.

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hb g/dL}}{\text{Hto (vol/L)}}$$

Valores de referencia: 32-36 g/L

La HCM y la CHCM no dan información adicional de importancia, comparadas con el VCM para el diagnóstico de la anemia. Su utilidad está dada en el control interno de la calidad, evaluando la estabilidad de la medición de un control por un equipo automatizado.

Determinación de la concentración del número de eosinófilos

- **Fundamento del método:** la sangre total se diluye con una solución colorante específica que permite diferenciar a los eosinófilos de los demás leucocitos.

- **Reactivos químicos y bioquímicos**

- ✧ Solución reactivo colorante eosinófilos: en un matraz de un trazo de 1 000 mL se vierten:

Floxina 0,5 g

Propilenglicol p.a. 500 mL

Hidóxido de sodio p.a. 0,12 g

Se mezcla por inversión y se completa a volumen con agua destilada.

Esta solución es estable durante 3 años, conservada a temperatura ambiente y en frasco de color ámbar.

- **Muestra:** la muestra está constituida por sangre total, venosa o capilar.
- **Procedimiento**
 - ✧ Con una pipeta de Sahli se toman 0,02 mL de la muestra de sangre venosa o capilar. En el caso que se utilice esta última se realiza la punción digital o del talón (recién nacidos); se deja fluir la sangre espontáneamente y se elimina la primera gota.
 - ✧ La muestra se deposita en un tubo para ensayo que contiene 1 mL de la solución reactivo colorante de la eosinófilos. Se lava la pipeta en la superficie de la solución. Se mezcla y se deja en reposo 15 min. Se mezcla nuevamente imprimiéndole al tubo para ensayo movimiento oscilatorio rápido para resuspender las células sedimentadas.
 - ✧ Con una pipeta de 0,02 mL o con una pipeta Pasteur se carga la cámara de Neubauer evitando derramar el líquido fuera del área cuadrículada. Se deja en reposo 3 min.
 - ✧ Se coloca en la platina del microscopio, se enfoca el área cuadrículada y se realiza el conteo de las células (eosinófilos) que se encuentran en los 9 grandes cuadrados (véase figura).
- **Precauciones:** igual que las descritas en la determinación de la concentración de número de leucocitos.

- **Método para los cálculos:** la concentración de número de eosinófilos (C) se calcula por la fórmula siguiente:

$$C = C \cdot 0,056$$

Donde:

C_c eosinófilos contados en los 9 mm²

0,056 factor matemático para el cálculo que tiene en cuenta el área de los cuadrados, la dilución de la muestra, la profundidad de la cámara y la expresión de los resultados.

Para expresar los resultados, al valor obtenido mediante la fórmula, se le añade la expresión siguiente: $\cdot 10^9/L$

Intervalo de referencia

De 0,05 a 0,250

$\cdot 10^9/L$

Conteo de reticulocitos

- **Fundamento:** los reticulocitos son eritrocitos jóvenes que aún no han completado totalmente su evolución. Desde el punto de vista morfológico son idénticos a los eritrocitos adultos, pero tienen algunas características que los distinguen:

- ✧ Diámetro algo mayor.
- ✧ Mayor resistencia a las soluciones hipotónicas.
- ✧ Menor tendencia a formar agregados.
- ✧ Frecuentemente son policromatófilos.

Sin embargo, la principal diferencia es que presentan en su interior ARN, que precipita en forma de un retículo cuando reacciona con colorantes supravitales, como el azul de metileno nuevo y el azul de Cresil brillante.

- **Preparación del colorante:**

- ✧ Solución acuosa de azul de Cresil brillante: disolver 1 g de colorante en 100 mL de solución salina citratada, la cual se prepara mezclando 80 mL de solución salina 0.9 % p/v con solución de citrato de sodio 3.2 % p/v. Filtrar
- ✧ Solución alcohólica: disolver 1 g de colorante en 100 mL de alcohol etílico 95o.

- **Técnica en tubo:** en un tubo 12x75 se introducen seis gotas de una solución acuosa de azul brillante de Cresil y se añaden seis gotas de sangre anticoagulada con EDTA. Se tapa y se espera de 10 a 30 min. Se extrae una gota de la mezcla y se extiende. Se seca y observa con lente de inmersión.

- **Técnica en cubreobjetos:** se utiliza azul brillante de Cresil en solución alcohólica. Se deposita en el extremo del portaobjetos una gota de solución y se deja secar. Se aplica sobre la mancha de colorante con la ayuda de otro portaobjetos, se mezcla bien con el colorante y con el portabjeto se realiza una extensión en otra lámina portaobjetos. Las láminas son coloreadas con Metanol- Giemsa para su conservación.
- **Procedimiento para el conteo:** Debe utilizarse el objetivo de inmersión. Se coloca la lámina coloreada en el microscopio y se cuentan entre 500 y 1 000 eritrocitos; los reticulocitos son aquellos que presentan un retículo de intensidad variable en su citoplasma.
- **Cálculos**

Reticulocitos contados x 100

Total de eritrocitos

Reticulocitos contados x 0.001

Valores referencia:

Entre 0,5 a 1,5 %, o

De 0,001 a 0,015

El aumento de los reticulocitos recibe el nombre de reticulocitosis y se observa en anemias posthemorrágicas, hemolíticas ó carenciales después del tratamiento. Valores bajos se observan en aplasias medulares.

Técnicas citoquímicas

Técnica: Negro Sudan B

- **Fundamento:** el Negro Sudan B tiñe los fosfolípidos y otros lípidos. Colorea tanto los gránulos azurófilos como los específicos de los granulocitos. En las formas jóvenes (mieloblastos tardíos y promielocitos) iniciales la positividad es paralela a la de la mieloperoxidasa.

- **Reactivos**

✧ Formaldehído 40 %.

➤ Solución tampón madre:

Fenol cristalizado_____ 15 g

Alcohol absoluto_____ 30 mL

Se disuelve y después se añade:

Fosfato disódico (Na₂HPO₄.12H₂O)_____ 300 mg

Agua destilada c.s.p _____100 mL

➤ Solución madre de Negro Sudán B:

Negro Sudán B _____ 300 mg

Alcohol absoluto c.s.p. _____ 100 mL

Dejar 2 días a temperatura ambiente y agitar fuertemente el recipiente cada 2 o 3 horas.

Solución de trabajo:

Solución tampón madre _____ 40 mL

Solución Negro Sudán madre _____ 60 mL

Filtrar mediante aspiración. Esta solución es estable durante 2 meses.

- ***Materiales***

- ✧ Frasco Kitasato con tapón monohoradado.
- ✧ Pipetas.
- ✧ Frascos volumétricos.
- ✧ Frascos para almacenar reactivos.
- ✧ Embudo.
- ✧ Papel de filtro.
- ✧ Lámina portaobjeto.
- ✧ Frasco Coplin.
- ✧ Baño de agua regulable.

- ***Procedimiento***

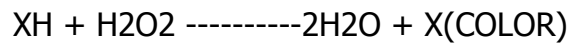
- ✧ Fijar los frotis secos en vapores de formol durante 10 minutos.
- ✧ Lavar los frotis con agua destilada.
- ✧ Incubar los frotis en la solución de trabajo de Negro sudan durante una hora a 37°C.
- ✧ Lavar con alcohol etílico 70 % durante 3 min. para eliminar el exceso de colorante.
- ✧ Lavar con agua corriente.
- ✧ Colorear con Giemsa durante 10 minutos.

- ***Resultados:*** los gránulos citoplasmáticos se tiñen ligeramente en los precursores de los neutrófilos e intensamente en los neutrófilos maduros, con una coloración negra. Los gránulos de los eosinófilos son oscuros, pero en ocasiones presentan una palidez central. Los monocitos presentan finos gránulos diseminados.

Técnica: Peroxidasa

- ***Fundamento:*** las peroxidasas son enzimas que catalizan la

transferencia de electrones e hidrógeno desde un sustrato a un peróxido, formando un precipitado coloreado y agua. La bencidina base y el dihidrocloruro de bencidina son los sustratos usados históricamente; existen otros como son la O-toluidina, 3 amino-9 etilcarbazol, tetrahidrocloruro de 3,3 diaminobenzidina (DAB), entre otros.



- **Reactivos**

- ✧ Solución "A"

- Bencidina base -----3 g (1.5 g)

- Alcohol etílico 95 %-----90 mL(45 mL)

- ✧ Solución acuosa saturada----- 0.1 mL (0.05 mL)
de nitroprusiato de sodio.

- La solución de nitroprusiato de sodio saturada se prepara adicionando 40 g de Nitroprusiato a 100 mL de H₂O destilada.

- ✧ Solución "B"

- H₂O₂ 3 %-----0.3 mL

- H₂O----- 25 mL

- **Materiales**

- ✧ Pipetas.

- ✧ Frascos volumétricos.

- ✧ Frascos para almacenar reactivos.

- ✧ Embudo.

- ✧ Papel de filtro.

- ✧ Lámina portaobjeto.

- **Procedimiento**

- ✧ Se cubre la lámina con solución "A" durante un minuto.

- ✧ Transcurrido este tiempo agregar 10 gotas de la solución "B" durante minuto y medio.

- ✧ Lavar suavemente con agua destilada, reposar 4 minutos.

- ✧ Lavar durante un minuto.

- ✧ Colorear con Giemsa (20 minutos).

- **Resultados**

- ✧ Existe actividad de peroxidasa en los gránulos primarios o azurófilos de los neutrófilos y sus precursores; también se ha demostrado

actividad en los gránulos secundarios. Se encuentra una peroxidasa diferente en los gránulos de los monocitos y en los eosinófilos. Los basófilos, eritrocitos, plaquetas, megacariocitos y linfocitos, no contienen estas enzimas. Las granulaciones de los neutrófilos y precursores toman un color verde chartreuse.

- ✧ La peroxidasa se utiliza para diferenciar blastos de origen mieloide, que son positivos de linfoblastos negativos. En el diagnóstico de una leucemia mieloblástica aguda M1, más de 3 % de los blastos en médula tienen que ser mieloperoxidasa positivos, según la clasificación FAB.

Técnica: Acido Peryódico De Shiff (PAS)

- ***Fundamento:*** *los polisacáridos en general y el glucógeno en particular, son alcoholes que se oxidan, en presencia del ácido periódico, a aldehídos que reaccionan con la parafulsina del reactivo de ZIF, produciendo un coloración de rojo a rosado.*

- ***Reactivos***

- ✧ Acido peryódico 0.5 %

Acido peryódico_____0.5 g (500 mg)

H₂O destilada csp_____100 mL

- ✧ Solución de Shiff

Fucsina básica_____1 g

Diluir por ebullición en 200 mL de H₂O destilada.

Enfriar a 50°C y filtrar.

Añadir bisulfito de sodio anhidro_____ 1 g

Conservar en la oscuridad 24-48 horas.

Añadir carbón activado _____300 mg

Agitar un minuto. Filtrar desechando las primeras gotas.

**El reactivo debe ser incoloro.

- ***Materiales***

- ✧ Frasco Kitasato con tapón monohoradado.
- ✧ Pipetas.
- ✧ Frascos volumétricos.
- ✧ Frascos para almacenar reactivos.
- ✧ Embudo.
- ✧ Papel de filtro.

- ✧ Lámina portaobjeto.
- ✧ Frasco coplin.
- ✧ Baño María.
- **Procedimiento**
 - ✧ Fijar las extensiones durante 20 minutos en alcohol metílico.
 - ✧ Lavar con agua dura y destilada.
 - ✧ Cubrir con ácido peryódico 0.5 % durante 20 minutos.
 - ✧ Lavar con agua corriente y después con agua destilada 3-4 veces.
 - ✧ Poner las láminas en unos coplin limpios con solución de Shiff durante 30 min.
 - ✧ Lavar con agua destilada durante unos minutos.
 - ✧ Contrastar con hematoxilina de Harris (filtrada) durante 10 minutos.
 - ✧ Lavar con agua destilada durante unos minutos.
- **Resultados:** las células que contienen glucógeno toman un color del rojo al rosado, de forma difusa o granular. Los mieloblastos no se colorean; los linfoblastos se colorean con un patrón a gránulos gruesos o en mazacote, en las leucemias linfoides agudas; los eritroblastos positivos con esta citotécnica son evidencias de malignidad.
 - * El reactivo de Shiff y el ácido peryódico deben conservarse a 4º C.

Técnica: Fosfatasa alcalina leucocitaria

Método del betaglicerofosfato según Gomori

- **Fundamento:** este método hace visible la enzima durante una serie de reacciones que conducen a la formación de sulfuro de cobalto negro. Las fosfatas alcalinas liberan ácido ortofosfórico del betaglicerofosfato de sodio utilizado como sustrato, cuyo ácido en presencia de nitrato de calcio del medio forma fosfato cálcico insoluble e invisible al microscopio, por lo que utiliza el artificio de introducir, en el material en estudio, una solución de nitrato de cobalto, con lo que se forma fosfato de cobalto insoluble de color rosa muy claro, que al reaccionar con sulfuro de amonio, da lugar a la formación de sulfuro de cobalto insoluble, de color negro muy visible.
- **Reactivos**
 - ✧ Solución fijadora

Formol _____	1 mL
Metanol _____	9 mL
 - ✧ Solución de incubación

Veronal sódico 10 % _____	12 mL
Betaglicerofosfato sódico 3.2 % _____	12 mL
Sulfato de magnesio 0.1M _____	12 mL
Nitrato de calcio 2 % _____	18 mL
H ₂ O destilada _____	66 mL

Preparar antes de usar. El veronal y el Betaglicerofosfato deben conservarse a 4° C.

- ✧ Solución de sulfato de magnesio 0.1M

Sulfato de magnesio(SO ₄ Mg.7H ₂ O)_	2.46 g
H ₂ O destilada _____	100 mL

- ✧ Nitrato de calcio 2%.
- ✧ Nitrato de cobalto 2%.
- ✧ Solución diluida de sulfuro de amonio

Sulfuro de amonio _____	1 mL
H ₂ O destilada _____	80 mL

Conservar a 4° C.

- ***Materiales***

- ✧ Pipetas.
- ✧ Frascos volumétricos.
- ✧ Frascos para almacenar reactivos.
- ✧ Embudo.
- ✧ Papel de filtro.
- ✧ Lámina portaobjeto.
- ✧ Frasco coplin.
- ✧ Baño de agua regulable.

- ***Procedimiento***

- ✧ Fijar las extensiones durante 30 seg. en la solución fijadora.
- ✧ Lavarlas unos segundos en agua destilada y colocarlas en la solución incubadora recientemente preparada, durante 2 horas a 37°C.
- ✧ Lavar unos segundos en agua destilada con unas gotas de nitrato de cobalto 2 %.
- ✧ Sumergirlas en la solución de nitrato de cobalto durante 5 minutos.

- ✧ Lavar bien y poner durante 10 segundos (tapado) en la solución de sulfuro de amonio.
- ✧ Lavar bien y realizar tinción con hematoxilina de Harris durante 5 minutos (filtrada).
- **Resultados:** los sitios de actividad de la fosfata alcalina en el citosol se observan en forma de gránulos aislados o en grumos de color pardo muy oscuro o casi negro.
 - ✧ Se cuentan los neutrófilos con actividad de fosfatasa alcalina (100 células)
 - 0 _____ No actividad.
 - 1 _____ Poca actividad
 - 2 _____ Bastante actividad.
- **Control:** hay que procesar con cada muestra un control que tenga leucocitosis con neutrofilia.

Nota: Debe hacerse la reacción el mismo día pero, si esto no fuera posible, se puede fijar y congelar a -20°C.
- **La actividad enzimática se encuentra elevada en**
 - ✧ Reacción leucemoide.
 - ✧ Policitemia Vera.
 - ✧ Mielofibrosis con metaplasia mieloide.
 - ✧ Enfermedad de Hodgkin.
 - ✧ Crisis blástica de la LMC.
 - ✧ Medicamentos (esteroides, anticonceptivos orales)
 - ✧ LMC Filadelfia (-)
 - ✧ Embarazo.
- **La actividad se encuentra disminuida en**
 - ✧ Leucemia mieloide crónica (LMC).
 - ✧ Hemoglobinuria paroxística nocturna.
 - ✧ Sarcoidosis.
 - ✧ Mononucleosis infecciosa.
 - ✧ Anemias sideroblásticas.
 - ✧ Púrpura trombocitopénica inmunológica.
 - ✧ Leucemias de células peludas.
 - ✧ Leucemias mieloblásticas agudas (50 %).

Técnica: Fosfatasas ácidas

- **Fundamento:** la presencia de fosfatasas ácidas es útil en la subdivisión de las leucemias linfoblásticas agudas, así como en el diagnóstico de la LCP. Hay al menos 7 isoenzimas 4 (1-4) encontradas en células normales (neutrófilos, monocitos, linfocitos y plaquetas) y 3 (0,5 y 3b) en distintas enfermedades (enfermedad de Gaucher, LCP y blastos de la LMA). La isoenzima 5 encontrada en la LCP es un marcador bastante específico de esta enfermedad pues es la única isoenzima que es resistente a la inhibición química por tartrato. La isoenzima 3 es útil para identificar linfocitos T que son positivos, de los linfocitos B que son débilmente positivos o negativos. Una tinción intensa encontrada en la región del Golgi ha sido demostrada en linfocitos anormales en leucemia prolinfocítica T y el síndrome de Sézary. Una coloración fuerte paranuclear en más de 70 % de las células leucémicas es recomendada para identificar una LLA positiva, actividad débil en más de 30 % es considerada negativa.

La localización y el patrón de la reacción final no varía apreciablemente con el uso de diferentes combinaciones sustrato-colorante; pero un exceso de sal de diazonium puede inhibir la actividad enzimática.

Se utilizan controles normales y, si es posible, controles de pacientes con LCP. La presencia de positividad después de la inhibición con tartrato en los granulocitos, indica falsos positivos, debido a inhibición insuficiente de la actividad enzimática; los gránulos positivos en los granulocitos de la lámina control, deben ser negativos en una preparación con ácido L (+) tartárico.

La presencia de positividad es un marcador útil para definir LLA-T donde se ve una acentuada tinción en la región del Golgi en aproximadamente un 70 % de las células blásticas. Entre 40-70 % de los linfocitos normales en sangre periférica muestran tinción positiva en la región del Golgi.

- **Reactivos**
 - ✧ Acetona.
 - ✧ Nitrito de sodio.
 - ✧ Hidróxido de sodio.
 - ✧ Pararosanilina.
 - ✧ Ácido clorhídrico concentrado.
 - ✧ Acetato de Sodio.
 - ✧ Naftol AS-BI fosfato.
 - ✧ Dimetilformamida.
 - ✧ Ácido L(+) tartárico.
 - ✧ Hematoxilina de Harris.

- **Preparación de los reactivos**

- ✧ Nitrito de Sodio(NaNO_2) 4 %

NaNO_2 _____ 100 mg

H_2O csp_____ 2.5 mL

- ✧ Pararosanilina hexazotisada fresca

- Preparación de la pararosanilina-HCl

Pararosanilina_____ 1 g

HCl(37 %)_____ 5 mL

* H_2O destilada_____ 20 mL

*Añadir el agua y después el ácido.

La solución se prepara calentando suavemente; después enfriar/filtrar

Se mezclan a partes iguales la solución de pararosanilina-HCl y la de NaNO_2 4 % (fresca):

Pararosanilina-HCl_____ 0.8 mL

Nitrito de sodio 4 %_____ 0.8 mL

- ✧ Tampón acetato pH 7.5-7.7

Acetato de sodio_____ 27.2 g

H_2O csp_____ 1000 mL

Agregar 60 mL del tampón los 1.6 mL de pararosanilina hexazotisada (solución "A")

- ✧ Solución sustrato(solución "B")

Naftol AS-BI fosfato_____ 20 mg

Dimetilformamida_____ 2 mL

- ✧ Solución de incubación

-Añadir la solución "A" a la solución "B". El pH debe estar entre 4.9 y 5.1; llevar a éste con NaOH saturado.

- **Materiales**

- ✧ Pipetas.

- ✧ Frascos volumétricos.

- ✧ Frascos para almacenar reactivos.

- ✧ Embudo.

- ✧ Papel de filtro.

- ✧ Lámina portaobjeto.
- ✧ Frasco Coplin.
- ✧ Baño de agua regulable.
- **Procedimiento**
 - ✧ Fijar en acetona 70 % 30 seg a 4°C.
 - ✧ Lavar con H₂O corriente.
 - ✧ Secar al aire.
 - ✧ Incubar en la solución de incubación durante 3 horas 20-25°C.
 - ✧ Lavar con agua corriente.
 - ✧ Contrateñir con hematoxilina de Harris 5 minutos.
 - ✧ Lavar con agua destilada.

Para realizar la técnica con inhibición con tartrato se procede igual, pero se incuba en la solución de incubación más 300 mg de ácido L (+) tartárico.

Técnicas: Esterasas inespecíficas con y sin fluoruro

- **Fundamento:** la esterasa no específica, utilizando Naftol AS-D acetato como sustrato, colorea los neutrófilos y sus precursores y los monocitos y sus precursores; cuando se adiciona fluoruro de sodio, se inhibe la reacción en los monocitos maduros y precursores.

- **Reactivos**

- ✧ Buffer fosfato pH 6.9

Na₂HPO₄(0.1M) (14 g/L o 1.4 g/100mL)_____ 60 mL

KH₂PO₄(0.1M) (13.6 g/L o 1.36g/100mL)_____ 40 mL

*Se le agrega lentamente el K al Na para obtener el pH 6.9.

Conservar a 4°C

Propilenglicol _____ 1 mL (0.5 mL)

Naftol AS-D acetato(congelado)_____ 24 mg (12 mg)

Acetona_____ 4.5 mL (2.25 mL)

Fast Blue BB Salt.(congelado)_____ 50 mg (25 mg)

Fluoruro de Sodio_____ 37.5 mg (18.75 mg)

Hematoxilina de Harris.

- **Materiales**

- ✧ Pipetas.
- ✧ Frascos volumétricos.

- ✧ Frascos para almacenar reactivos.
- ✧ Embudo.
- ✧ Papel de filtro.
- ✧ Lámina portaobjeto.
- ✧ Frasco Coplin.
- ✧ Baño María.

- **Procedimiento**

- ✧ Marcar con diamante una lámina del paciente y una lámina control (médula con sistema megacariopoyético hiperplásico) para realizar la técnica sin fluoruro (NASDA) y con fluoruro (NASDA-F). Las extensiones tanto del paciente como del control deben tener menos de 2 semanas de realizadas y conservadas a temperatura ambiente protegidas de la luz.
- ✧ Fijar al día siguiente de hecha la extensión en vapores formol por 5 min.
- ✧ Preparar inmediatamente antes de usar las siguientes soluciones:

A) Buffer fosfato pH 6.9_____	25	mL
Propilenglicol_____	1	mL
B) Naftol AS-D acetato_____	12	mg
Acetona_____	2.25	mL

La solución B se prepara antes de unirla a la mezcla pues se evapora. Se produce una disolución rápida y total.

- ✧ De la solución B se añade 0.5 mL a la solución A, gota a gota, agitando (debe aparecer un ligero precipitado).
- ✧ Se añaden 25 mg de Fast Blue BB Salt, mezclándose bien, hasta la disolución total.
- ✧ Dividir en 2 partes de 12.5 mL cada una.
- ✧ Para la técnica sin fluoruro se utiliza la mezcla preparada, filtrando sobre la lámina.
- ✧ La técnica con inhibición con fluoruro realizar añadiendo los 12.5 mL restantes de la mezcla preparada anteriormente, filtrando a 18.75 mg fluoruro de sodio, disolver y filtrar sobre la lámina.
- ✧ Incubar 70 minutos a temperatura ambiente ambas láminas.
- ✧ Lavar suavemente con agua destilada.
- ✧ Colorear con hematoxilina de Harris (filtrada sobre la lámina) 10 min.
- ✧ Lavar con agua destilada.

- **Resultados:** se observan granulaciones de color azul en los neutrófilos y sus precursores y en los monocitos y sus precursores. Los megacariocitos son las células utilizadas como control de que la coloración fue adecuada. En la técnica con fluoruro se inhibe la coloración en los monocitos y en blastos de origen monocitoide, también en los megacariocitos.

Técnicas: Esterasas específicas

- **Fundamento:** las esterazas de los neutrófilos maduros y sus precursores, actúan sobre el sustrato Naftol AS-D cloroacetato; no así las de otros tipos celulares de la sangre y médula ósea. Se utiliza principalmente para identificar células inmaduras de origen mieloide.

- **Reactivos**

✧ Buffer Michaelis pH = 7.4

Barbital sódico 0.1M(10.309g/L)_____ 300 mL

HCl 0.1M_____ 200 mL

*Conservar a 4° C

Propilenglicol_____ 0.5 mL

Naftol AS-D cloroacetato (congelado)_____ 10 mg

Acetona_____ 0.8 mL

Fast Garnet GBC Salt.(congelado)_____ 10 mg

Hematoxilina de Harris.

- **Materiales**

✧ Pipetas.

✧ Frascos volumétricos.

✧ Frascos para almacenar reactivos.

✧ Embudo.

✧ Papel de filtro.

✧ Lámina portaobjeto.

✧ Frasco coplin.

✧ Baño María.

- **Procedimiento**

✧ Marcar con diamante una lámina del paciente y una lámina control con neutrofilia. En ambos casos las extensiones pueden ser guardadas hasta dos semanas a temperatura ambiente, protegidas de la luz.

✧ Se fijan durante 3 minutos a 4°C con metanol 9 volúmenes y formol 1

vol. Esta solución se conserva a 4°C.

- ✧ Sustrato. Preparar antes de usar (dilución rápida y total)

Naftol AS-D cloroacetato_____10 mg

Acetona_____ 0.8 mL

- ✧ Solución de reacción. Preparar antes de usar.

Buffer Michaelis_____ 10 mL

H₂O destilada_____ 10 mL

Propilenglicol_____ 0.5 mL

- ✧ Solución de incubación: Se adiciona gota a gota y agitando la solución sustrato a la solución de reacción hasta la aparición de una nube blanquecina.
- ✧ Agregar Fast Garnet GBC salt 10mg. Agitar hasta disolver.
- ✧ Filtrar directamente sobre la lámina e incubar 50 min. temper. ambiente.
- ✧ Lavar con agua corriente.
- ✧ Colorear 10 minutos con hematoxilina de Harris, filtrada sobre la lámina.
- ✧ Lavar con agua corriente y secar al aire.
- **Resultados:** se observa una coloración roja-naranja en los leucocitos neutrófilos maduros y sus precursores. Los blastos de origen mieloide presentan gránulos positivos.

Técnica: Coloración de hierro (Azul de Prusia)

- **Fundamento:** la reacción del azul de Prusia emplea una solución fresca de ferrocianuro ácido para demostrar hierro no HEM, tal como aparece en los compuestos de almacenamiento (ferritina y hemosiderina). El hierro de ambos compuestos está débilmente unido y se separa fácilmente con ácido diluido, dando las reacciones del hierro iónico, una de estas es la formación de ferrocianuro férrico (azul de Prusia) por la combinación de iones férricos y ferrocianuro.
- **Reactivos**
 - ✧ Ácido clorhídrico 0.2N (0.2mol/L). Se prepara con 2 mL de ácido clorhídrico concentrado (37 %) y llevar a 100 mL con H₂O destilada. Esta solución es estable por muchos meses a temperatura ambiente.
 - ✧ Ferrocianuro de potasio 2 %. Se prepara 2 g del reactivo y llevar a 100 mL con agua destilada. Estable por varios meses.
 - ✧ Eosina 1 %: se prepara 1 g eosina y llevar a 100 mL con H₂O destilada.
- **Materiales**

- ✧ Pipetas.
- ✧ Frascos volumétricos.
- ✧ Frascos para almacenar reactivos.
- ✧ Embudo.
- ✧ Papel de filtro.
- ✧ Lámina portaobjeto.
- ✧ Frasco Coplin.
- ✧ Baño de agua regulable.
- **Procedimiento**
 - ✧ Fijar en alcohol metílico durante 10 a 20 minutos.
 - ✧ Mezclar a partes iguales el HCl 0.2N y el ferrocianuro de potasio 2 % para lograr una solución de ferrocianuro de potasio 1 % en HCl 0.1N en una jarra de tinción.
 - ✧ Poner la lámina en esta mezcla recién preparada durante 10 minutos.
 - ✧ Lavar con agua corriente durante 20 minutos.
 - ✧ Lavar con agua destilada.
 - ✧ Teñir para contraste débil durante pocos segundos con eosina 1 %.

La tinción de azul de Prusia puede hacerse en preparaciones teñidas previamente con colorantes de Romanowsky incluso años antes. Es aconsejable dejar las preparaciones en alcohol metílico toda la noche, a fin de eliminar el máximo de colorante.
- **Resultados:** los gránulos de hierro aparecen de color azul brillante o azul verdoso, contrastando con el fondo rosado. Estos gránulos generalmente no sobrepasan 1 μm de diámetro; aparecen en el citoplasma de los precursores eritrocitarios, nucleados y no nucleados. También se ven en el citoplasma de células reticuloendoteliales.

Examen de médula ósea

El examen de médula ósea (MO) es un método ampliamente usado para el diagnóstico de muchas enfermedades hematológicas. Debido a que la MO es el lugar principal en la producción de las células de la sangre (eritrocitos, leucocitos, plaquetas y linfocitos B) su estudio es de gran utilidad para investigar la producción y maduración de estas células.

Es una herramienta muy útil para estudiar enfermedades donde las células que permiten el diagnóstico, están presentes en la MO y ausentes en la sangre periférica (SP), como son: enfermedad de Gaucher, mieloma múltiple, enfermedad de Nieman-Pick y algunas anemias megaloblásticas; también cuando existe

metástasis de un tumor extramedular infiltrando este tejido; en las pancitopenias y en algunas anemias este examen es muy importante. Su utilidad no está sólo en el diagnóstico, sino también en el seguimiento de múltiples enfermedades como leucemias agudas, síndromes mieloproliferativos, etc.

Condiciones en las que un examen de la MO puede ser útil

- Anemia por déficit de hierro.
- Anemia de las infecciones crónicas.
- Anemias megaloblásticas.
- Enfermedades malignas hematológicas (leucemias, mieloma, etc.).
- Mielofibrosis.
- Anemia aplástica.
- Tumor metastásico.
- Anemias diseritropoyéticas.
- Síndromes mielodisplásticos.
- Ciertas enfermedades metabólicas (Gaucher, etc.).

Técnica

El examen de la MO puede realizarse tanto por aspiración como por biopsia por trepanación; éste debe ser realizado por un médico.

Aspiración

- Como la MO es un tejido suave, puede ser aspirado por la inserción de una aguja dentro de la cavidad medular, al aplicar una presión negativa fuerte con una jeringuilla. En el adulto existen varios sitios de los que se puede obtener material medular; los dos más utilizados son el esternón en su tercio superior y la espina iliaca pósterio superior. El esternón brinda una muestra representativa, pero tiene el inconveniente de que puede resultar muy impresionante para el paciente y debe realizarse la punción por encima del 2do espacio intercostal para, en caso de perforar la cortical interna no dañar los grandes vasos o la aurícula derecha. En la aspiración de médula se pueden utilizar diferentes agujas; las más usadas son la de Klima y la de Salah.

Materiales

- Aguja para aspiración esternal estéril.
- Jeringuillas de 2 y 10 mL estériles.
- Agujas #24 o 25 para inyección.
- Solución anestésica de lidocaína 2 %.
- Solución desinfectante (alcohol 70 % y tintura de yodo).

- Láminas portaobjeto limpias.
- Láminas para extender.
- Algodón estéril.
- Guantes de nylon estériles.
- Cinta adhesiva (esparadrapo).

Procedimiento

- Explicar al paciente el procedimiento a realizar.
- Poner al paciente acostado, en posición supina.
- Limpiar la zona de punción con solución desinfectante varias veces.
- Infiltrar piel y periostio en el punto escogido para la punción con un anestésico al 1 o 2 % (no más de 5 mL). Éste permite además tener una idea de la profundidad de la extensión.
- La aspiración de la muestra se realiza insertando la aguja en posición vertical con un ligero movimiento de rotación, hasta que se siente una sensación de vacío o pérdida de la resistencia; en este momento se retira el estilete y se coloca la jeringuilla, realizándose una aspiración de aproximadamente 0.5 mL de material. Si éste no se obtiene, se puede retirar la aguja discretamente y avanzar en otra dirección. Después se retira la aguja y se presiona el sitio de punción durante unos minutos; finalmente, se cubre la zona con un apósito estéril y se indica mantener de esa forma durante 24 horas.

En nuestro centro se realiza el proceder en la sala de Hematología junto a la biopsia de cresta iliaca (con aguja de Jamishidi-Swaim). Además de las extensiones y los frotis del material extraído por aspiración se realizan improntas del bloque obtenido para biopsia cuando es necesario.

- Conjuntamente, se preparan en todos los casos varias extensiones de sangre periférica (SP) obtenidas de punción digital y 2 preparaciones para reticulocitos.

Preparación de las extensiones

Existen diferentes métodos para preparar las extensiones del material obtenido. Nosotros utilizamos el siguiente:

- El material extraído es descargado en una lámina portaobjeto limpia.
- Seguidamente, usando una lámina extensora, se realizan varias extensiones y/o frotis (10) introduciendo un extremo de la misma en el material y colocando una gota en otra lámina, donde se realiza la extensión o el frotis, las extensiones se secan al aire.

Procesamiento de las muestras en el laboratorio

- El material de cada paciente debe ser inscripto al llegar al laboratorio en el libro de registro de médulas, donde se registran los siguientes datos: nombre completo del paciente, edad, sexo, raza, fecha de realizada la toma de muestra, procedencia y número de inscripción:
 - Se marca todas las láminas que se van a teñir con un diamante imprimiendo el número de inscripción (por ejemplo: 203-94).
 - Se realizan coloración de May Grünwald-Giemsa a una extensión del material, a 2 frotis de MO y a una extensión de SP.
- Se realiza una coloración para hierro (Azul de Prusia) a un frotis de médula.
- Se fija con metanol y se tiñe con Giemsa la preparación de reticulocitos.
- Si se indica citoquímica: las láminas son marcadas como se indicó anteriormente, indicando qué coloración se realizará.
- Las fosfatasas deben realizarse el mismo día; en caso contrario, deben conservarse a -20°C, protegidas, hasta su realización.
- Las esterasas deben realizarse lo más rápido posible (antes de 15 días). Deben conservarse en la oscuridad.
- Las láminas no coloreadas de cada caso, deben ser guardadas envolviéndolas en papel e identificándolas con su número correspondiente.
- Las láminas coloreadas deben ser igualmente tratadas, después de realizado el informe y conservadas en el archivo de la sección.

LABORATORIO DE ANEMIAS

Electroforesis de hemoglobina

El laboratorio de anemias es un departamento de la Sección de Hematología dentro del Laboratorio Clínico. Se realizan los siguientes estudios:

Estudios de anemias hemolíticas

- Electroforesis de Hb.
- Determinación de Hb fetal.
- Determinación de Hb A2.
- Haptoglobina plasmática (Hitachi 717)
- Hb plasmática.
- Resistencia osmótica.
- Enzimas eritrocíticas: G6PD y PK.
- Pruebas para HPN: Ham, Crosby, inulina y sucrosa.
- Prueba de Pink.
- Prueba de glicerol.
- Hb termolábil.

- Cuerpos de inclusión.
- Prueba de Brewer.
- Prueba de solubilidad.
- Hemograma completo. (hematología básica)
- LDH.(Química)
- Bilirrubina total e indirecta.(Química)
- Prueba de Coombs.(Banco de Sangre)

Estudios de anemias nutricionales

- Hierro sérico.
- Capacidad total de saturación de la transferrina.
- Capacidad latente de saturación de la transferrina.
- Índice de saturación.
- Ferritina.(Elecsys)
- Vitamina B12. (Elecsys)
- Acido fólico. (Elecsys)

Estudios de Líquidos biológicos. (LCR, pleural, sinovial, ascítico)

- Conteo total de células.
- Conteo diferencial de células.
- Glucosa.
- Proteínas

Inventario de equipos de la sección

- Cubeta de electroforesis DIM (CENIC).
- Baño María BM02 (Retomed-Stgo de Cuba).
- Centrífugas Modelo 1-t52,1 y 1-Hettich Universal)
- Microscopio Olympus.
- Nevera de -20°C Sanyo.
- Refrigerador MNHCK 12E.
- Rotor de frasco Retomed (Stgo de Cuba)
- Controlador de temperatura (PYE Unicam)
- Espectrofotómetro PYE UNICAM

Técnica: electroforesis de hemoglobina

- ***Fundamentos:*** debido a la diversa composición aminoacídica que presentan las cadenas polipeptídica que constituyen las hemoglobinas, estas se pueden separar cuando son sometidas a un campo eléctrico mostrando una variable movilidad electroforética. La carga eléctrica de la hemoglobina depende del pH; a un pH más alto que el punto isoeléctrico, las hemoglobinas están cargadas negativamente, mientras que a un pH inferior estas tienen carga positiva. El punto isoeléctrico de la Hb A es 6.8; en esta técnica el pH utilizado es 8.6 donde la carga neta de todas la Hb es negativas migrando en un campo eléctrico hacia el ánodo (+).

- **Reactivos**

- ✧ Buffer tris-EDTA-borato pH 8.6

H3BO3 -----	30.92 g
EDTA disódico tetrasodico---	5.84 g
TRIS-----	109.00 g

Llevar a un litro con H₂O destilada. Tomar de ese matriz 100 mL y llevar a 800 con H₂O destilada.

- ✧ Solución hemolizante

EDTA tetrasódico-----	0.1 g
CNK-----	0.02 g

Llevar a 100 mL con agua destilada

- ✧ Solución de bencidina (electroforesis en **acetato de celulosa**)

Hidrocloreuro de bencidina--	1.00 g
Ac acetico glacial-----	25.00 mL
H ₂ O destilada-----	75.00 mL

- ✧ Rojo punceau (electroforesis en **acetato de celulosa**)

Ácido tricloro acético-----	5.00 mL
Rojo punceau-----	0.5 g

Llevar a 100 mL con H₂O destilada

- ✧ Ácido acético 3 % (electroforesis en **acetato de celulosa**)

Aparatos, utensilios y medios de medición

- Placa de vidrio o porcelana con excavaciones.
- Cámara para electroforesis.
- Peachímetro.
- Fuente de electroforesis.
- Papel de acetato de celulosa.
- Aplicador de muestras.
- Pipeta variable de 10-100 µL.
- Bandeja para revelado.

Procedimiento

- Preparación del hemolizado: poner en una placa excavada 10 µL de glóbulos rojos y una gota de la solución hemolizante y congelar.
- Tampón para la cubeta: a 100 mL de tampón añadir H₂O hasta 800 mL.
- El papel de acetato se sumerge en un tampón mas diluido (1:20) por 5 min antes de la corrida.
- Antes de aplicar la muestra secar el acetato con papel de filtro y colocarlos

encima de los puentes mojados previamente en la cubeta.

- La corrida se realiza durante 20 min., a voltaje 350 volt, 2 mamp.
- Revelado: Teñir el papel con rojo ponceau durante 5 min.
- Enjuagar en ácido acético 3 %.

Resultados

A pH 8.6 la movilidad electroforética es la siguiente:

Electroforesis de Hb en diferentes condiciones clínicas

	(-) _____ (+)
	C E S G F A J Barts H
	A2 D
	O
	E
	cátodo $\xrightarrow{\text{movimiento}}$ ánodo
HB normal	I
β talasemia menor	I I
Rasgo siclemico (30 %)	I I I
Rasgo HB C	I I
HB C	I
Hemoglobinopatía SC	I I
Siclemia	I

Técnica: cuantificación de Hb fetal

- **Fundamento:** la presencia de Hb F puede ser demostrada por métodos cuantitativos que se basan en la propiedad de la Hb F de ser más resistentes a la desnaturalización por álcalis que las demás Hb. La Hb que se desnatura precipita al agregarles sulfato de amonio saturado.

- **Reactivos**

✧ Solución Drabkin.

- | | |
|----------------------------------|---------|
| a) Bicarbonato de sodio- | 50 g |
| Ferrocianuro de potasio- | 10 g |
| H ₂ O destilada hasta | 1000 mL |
| b) Cianuro de K- | 5 % |

Solución de trabajo:

a- 20 mL b- 1 mL H₂O destilada hasta 1 000 mL
Guardar en frasco ámbar.

- ✧ Solución saturada de sulfato de amonio- 769,3 g
H₂O destilada hasta 1000 mL
- ✧ KOH 1,2 N (5,6g + 100 mL de H₂O destilada)
- ✧ CCL₄.

Aparatos, utensilios y medios de medición

- Centrífuga.
- Espectrofotómetro.
- Pipetas de 1,2 y 5 mL.
- Tubos de vidrio de 12x75.
- Embudo de vidrio.
- Erlenmeyer de 1 000 mL.

Procedimiento

- Recoger 5 mL de sangre sobre heparina (0.5 mg = 5 U/mL de sangre), lavar los glóbulos 3 veces con solución salina 0,9 %, centrifugar durante 5 min a 2 500 rpm.
- Hemolisado: a los glóbulos lavados añadir igual cantidad de H₂O destilada y 1 mL de CCl₄. Centrifugar a 3 000rpm por 20 min, tomar el sobrenadante con cuidado de no tocar el anillo de estromas.
- Determinar la concentración de Hb:

$$\text{D.O de la muestra} \times 36,8 = \text{Concentración de Hb}$$

ó

Leer D.O de un patrón y calcular la concentración de Hb según la fórmula:

$$\text{g de Hb} = (\text{D.O.M/D.O.P}) \times \text{C. P.}$$

A 5 mL de Drabkin añadir 20 µL de hemolisado. Leer a 540 nm.

- ✧ Preparación del hemolisado 0,5 %

A 5 mL de Drabkin añadir X mL del hemolisado de concentración conocida y completar hasta 6 mL con Drabkin.

$$V1 N1 = V2 N2$$

$$6 \text{ mL} \times (0,5 \%) = X \text{ mL} \times \% \text{ de Hb del Hemolizado}$$

$$3: \% \text{ de Hb} = X \text{ mL del hemolisado a diluir.}$$

- ✧ Preparación de Hb total

1,4 mL de hemolisado 0.5 %.

0,1 mL de H₂O destilada.

1,0 mL de sulfato de amonio saturado.

2,5 mL de Drakin.

✧ Desnaturalización (obtención del filtrado)

1,4 mL de hemolisado 0,5 %

0,1 mL de KOH 1,2 N.

Agitar rápidamente y reposar durante 2 min. **exactos.**

1 mL de sulfato de amonio saturado.

Agitar y reposar 5 min.

Agitar y filtrar con papel de filtro Whatman 3 mm.

Leer a 540 nm el filtrado y el total contra Drabkin.

Resultados

% de Hb F = (D.O de filtrado / D.O total) x 50 %

Valores de referencia:

0,2 a 1,5 %

Interpretación de los resultados

La Hb F se encuentra aumentada en:

- Afecciones adquiridas.
- Anemias megaloblásticas.
- Anemias sideroblásticas'
- Anemias hemolíticas: HPN, esferocitosis
- Anemias aplásticas
- Leucosis agudas
- Eritroleucemias.
- Hemoglobinopatias en general:
 - ✧ Beta Talasemia.
 - ✧ PHHF.
 - ✧ Delta-Beta Talasemia.
 - ✧ Formas Homocigóticas de Hemoglobinopatias S, C, D y E.
 - ✧ Hemoglobina de Lepore.

Técnica: test de Brewer

- **Fundamento:** la metahemoglobina es reducida a hemoglobina si la generación de NADPH es normal. El nitrito de sodio se utiliza para oxidar la Hb (Fe++) a MHB (Fe+++), el azul de metileno estimula el shunt de

las pentosas cuya primera enzima es la G₆PD por lo que la reacción refleja la actividad de dicha enzima. Normalmente la MHB es transformada en Hb por medio del sistema NADPH y la reductasa de la MHB. La cantidad de MHB permanente después de 3 h de incubación de la sangre con nitrito de sodio y azul de metileno provoca un índice de la generación de NADPH (asumiendo como normal el sistema NADPH MHB reductasa).

La reducción es completa en sujetos normales, pero en hombres y mujeres homocigóticas de 70-98 % de la MHB permanece sin reducirse en las condiciones de la prueba.

- **Reactivos**

- ✧ Dextrosa nitrito :----- 5 g de dextrosa
1.25 g de nitrito de Na
100 mL de H₂O destilada
- ✧ Azul de metileno:--- 0.0004M (0.0269 g/200 mL de H₂O destilada)

Aparatos, utensilios y medios de medición

- Balanza analítica.
- Frascos volumétricos de 100 y 200ml.
- Tubos de vidrio de 12 x 75.
- Baño María.

Procedimiento

- Preparar 3 tubos de ensayos

	Sangre	Dextro/nitrito	Azul de metileno
Control normal	1 mL	--	--
Control patológico	1 mL	0.05 mL	--
Paciente	1 mL	0.05 mL	0.05 mL

- Incubar 3 horas a 37°C.

Preparar 3 tubos con 10 mL de H₂O destilada y añadir 1 mL de cada uno de los 3 tubos anteriores.

Resultados

- **Positivo:** Si color del tubo del paciente da igual que el control positivo.
- **Negativo:** Si el color del tubo del paciente es igual al control normal

*La prueba también es **positiva** cuando hay otras deficiencias enzimáticas, como la NADPH reductasa y NADH diaforasa y en presencia de hemoglobinas inestables, HbM y drogas antioxidantes.*

Técnica: Test de HAM

- **Fundamento:** los eritrocitos de los pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) son lisados cuando son colocados en suero acidificado (pH 6.5-7); los eritrocitos normales no son lisados de esta manera.

Los glóbulos de los pacientes con HPN son hemolizados por cualquier suero normal fresco. La hemólisis puede presentarse a un pH normal pero aumenta al acidificarse el suero y por el contrario se anula cuando se alcaliniza. La destrucción del sistema hemolítico sérico por el calor, impide el fenómeno de la hemólisis. El suero del paciente no tiene propiedades líticas sobre los eritrocitos normales.

- **Reactivos**

✧ HCl 0.2N

Aparatos, utensilios y medios de medición

- Centrífuga.
- Tubos de vidrio 12 x 75.
- Baño María.




Procedimiento

- Desfibrinar la sangre o sacar un tubo seco y otro con anticoagulante (heparina 2 gotas/5 mL de sangre. Preparar igualmente sangre supuestamente normal (ABO) compatible con la del paciente.
- Centrifugar para obtener suero.
- Lavar los glóbulos tres veces con solución salina, los lavados se realizan a 3 000 rpm 10 mint, diluir los glóbulos 50 % con solución salina.
- Puede guardarse el suero en congelación y los glóbulos a 4°C, pero preferiblemente hacerse en el día.
- Preparar 7 tubos:

Tubos	1	2	3	4	5	6	7
Suero del paciente	0.5	0.5	-	-	-	0.5	0.5
Suero control	-	-	0.5	0.5	0.5	-	-
HCl 0.2N	-	0.05	0.05	-	0.05	-	-
Glóbulos del paciente 50 %	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	-	-
Glóbulos control 50 %	-	-	-	-	-	0.05	0.05

- Incubar 1 hora a 37°C
- El tubo 3 se incuba a 57°C por 30 minutos para inactivar el complemento,

Resultados

- Hemólisis 2 y 5 y ligeramente 1, 3, 4  **HPN**
- Hemólisis 2 y 7 y ligeramente 1, 6 y 7  Hemolisinas calientes
- Hemólisis 2, 3 y 4  Esferocitosis

- **Fundamento:** se cree que en HPN existe una hemólisis nocturna debido a que durante el sueño hay un cambio en el metabolismo respiratorio, que produce una ligera academia siendo algún factor de la coagulación responsable de esta hemólisis y la reacción activada por una pequeña cantidad de trombina; en cambio un exceso de ésta lo inhibe. Actualmente se piensa que la trombina posee una actividad lítica de tipo heterófila inespecífica.

✧ HCl 0.2N

✧ Trombina de 20 unidades.

Preparación de la trombina:

<i>Trombina</i>	<i>Salina</i>
0.5	0.95
0.25	0.475

- Centrífuga.
- Tubos de vidrio 12 x 75.
- Baño María.

- Desfibrinar la sangre o sacar un tubo con anticoagulante (heparina) preparar igualmente sangre supuestamente normal compatible con la del paciente.
- Lavar los glóbulos con solución salina 0.9 %, tres veces durante 5 min. a 3 000 rpm. Diluirlos con solución salina 0.9 % a partes iguales (50 %)
- Preparar 4 tubos:

<i>Tubos</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Suero cont.	0.5	0.5	0.5	0.5
HCL 0.2N	0.05	0.05	0.05	0.05
Trombina	-	0.05	-	0.05

Glóbulo paciente	0.05	0.05	-	-
Glóbulos control	-	-	0.05	0.05

- Incubar a 37°C durante 15 minutos.
- Centrifugar 5 minutos a 3 000 rpm.

Resultados

- Hemólisis en tubos 1 y 2 (en el 1 más que en 2) — — — → **HPN**
En los tubos 3 y 4 no debe haber hemólisis.

Técnica: test de sacarosa

- **Fundamento:** la prueba de la sacarosa, al igual que las otras, se basa en la demostración de los eritrocitos sensibles al complemento, hecho peculiar en este síndrome. Cuando se suspenden los eritrocitos en una solución isotónica de sacarosa, no ocurre lisis osmótica, dado que la sacarosa no penetra en la membrana celular; por otra parte, las células rojas HPN, en presencia de una pequeña cantidad de suero, muestran lisis en una solución de sacarosa.

La baja fuerza iónica de la solución probablemente intensifique la unión de los componentes del complemento con la membrana del eritrocito.

Las células rojas complemento-sensibles de HPN en estas circunstancias desarrollan efectos de membrana que permiten que la sacarosa penetre a la célula produciendo la lisis. Se ha sugerido también que un efecto marcado sobre la membrana por la acción del complemento puede por si permitir la salida de la Hb del eritrocito.

Reactivos

- ✧ Sacarosa 20 %: pesar 2 g de sacarosa y adicionar 10 mL agua destilada

Aparatos, utensilios y medios de medición

- Tubos de vidrio 12 x 75.
- Baño María.

Procedimiento

- Extraer 3 mL de sangre sobre oxalato de sodio 0.1 M (1 parte de oxalato y 9 de sangre) o citrato de sodio 3.8 % en igual proporción; también puede usarse sangre desfibrinada. Nunca use heparina o EDTA. Procesar siempre al mismo tiempo una muestra normal: 0.33 mL de anticoagulante para 3 mL de sangre ó 0.50 mL de anticoagulante para 4.5 mL de sangre.
- Adicionar 0.25 mL de sangre total fresca a 2.25 mL de sacarosa 20 %.
- Dejar en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente o a 37°C.

- Centrifugar y observar si hay hemólisis.

Resultados

- Si se observa hemólisis la prueba es — — — ➔ **Positiva**

Falsos positivos: pacientes con otras enfermedades hematológicas, especialmente en anemias megaloblásticas, anemias hemolíticas autoinmunes. Si se aumenta la concentración de suero, el número de falsos positivos disminuye rápidamente.

- **Falsos negativos:** si se emplea suero de pacientes con anormalidades del sistema de complemento.

Técnica: test de la inulina

- **Fundamento:** los eritrocitos de pacientes con HPN son sensibles a la hemólisis inducida por la actividad del componente C3 del complemento. Se sabe que se presenta un incremento de la lisis de eritrocitos sensibles al complemento cuando el complemento es activado por los anticuerpos específicos o por una vía de activación alterna en la fase del complemento.

La inulina y otras sustancias activan el pro-activador C3 del complemento y éste desencadena la activación de otros componentes del complemento. La lisis de la célula HPN es indicadora de esas reacciones.

- **Reactivos**
 - ✧ Solución de inulina 100 mg/mL o 5 g/50 mL de solución salina (Conservar a 4°C).

Aparatos, utensilios y medios de medición

- Tubos de vidrio de 12 x 75.
- Baño María.
- Centrífuga.

Procedimiento

- Extraer 3 mL de sangre en un tubo con una gota de inulina y otros 3 mL en un tubo seco
- Incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Centrifugar a 1 500 rpm durante 5 minutos.

Resultados

- Si hay hemólisis en el tubo que contiene inulina y no en el control, la prueba es **positiva** para HPN.
- Si hay hemólisis en el tubo control, se deben considerar varios posibles diagnósticos de hemólisis intravascular.
- Preparar un control positivo, incubando sangre normal con una

concentración alta de glutatión reducido a 37°C durante 30 minutos.

Técnica: resistencia osmótica

- ***Fundamento:*** la fragilidad osmótica de los eritrocitos, o resistencia globular, consiste en la determinación de la capacidad que tienen éstos de retener la Hb, cuando se suspenden en soluciones hipotónicas de NaCl a diferentes concentraciones.

Cuando un eritrocito se pone en contacto con una solución salina hipotónica, por ejemplo NaCl 0.45 %, el agua comienza a penetrar en la célula, donde existe un medio más concentrado. El eritrocito se hincha y posteriormente se rompe la membrana celular y se libera la Hb.

La destrucción celular es más fácil mientras menor sea la relación membrana-citoplasma; esto ocurre en la esferocitosis hereditaria y otras enfermedades donde los eritrocitos tienen forma esférica por pérdida de membrana. Lo contrario sucede en enfermedades donde existe un exceso de membrana real o relativa por disminución del contenido de Hb.

- ***Reactivos***

✧ Tampón fosfato salino 10 %:

NA₂HPO₄ ----- 1.365 g

NAH₂PO₄(2H₂O)----- 0.243 g

NaCl----- 9.00 g

H₂O destilada, c.s.p.----- 100 mL

✧ Tampón 1 %: tomar 100 mL 10 % y llevar a 1000 mL con agua destilada

✧ Tampón 0.375 %: tomar 37.5 mL del tampón 1% y llevar a 100 mL con agua destilada.

Aparatos, utensilios y medios de medición

- Balanza analítica.
- Tubos de vidrio 12 x 75.

Procedimiento

- ***Método cualitativo***

✧ Extraer 5 mL de sangre heparinizada; puede ser sangre desfibrinada o anticoagulada con EDTA.

✧ Procesar un control junto con el paciente.

✧ A 5 mL de tampón 0.375 % adicionar 0.05 mL de sangre tratada fresca.

✧ Invertir el tubo 3 veces y dejar reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

- ✧ Observar el tubo delante de un papel a rayas.

Resultados

- La resistencia es **normal** si se observan las rayas con cierta turbidez
- **Aumentada** si éstas no se ven,
- **Disminuida** cuando las rayitas se ven perfectamente

La resistencia osmótica esta aumentada en

- Talasemia
- Anemia de hematíes falciformes
- Déficit de hierro
- Ícteros obstructivos
- Anemia con hematíes en diana
- Hepatopatías
- Policitemia vera
- Post esplenectomía

La resistencia osmótica esta disminuida en

- Microesferocitosis
- Anemia hemolítica autoinmune
- Anemia hemolítica del recién nacido.

Técnica: cuantificación de Hb A2 por microcromatografía

- **Fundamento:** La cromatografía de intercambio iónico se basa en los diferentes comportamientos de adsorción-desorción de una mezcla de solutos disueltos en un disolvente móvil. Al pasar el fluido a través del sistema finamente dividido se produce un retardo selectivo de sus componentes de acuerdo a sus cargas. Si los componentes de la mezcla tienen igual carga que el adsorbente no habrá afinidad entre ellos y por tanto no se fijan y migran libremente con igual velocidad que el solvente.

Los soportes o adsorbentes son sustancias porosas insolubles a las cuales se le añaden reactivas con iones lábiles capaces de intercambiarse con los iones del compuesto que se quiere cromatografiar.

- ✧ El DEAE-52 es un tipo de soporte donde se han adicionado intercambiadores iónicos.
- ✧ En esta técnica las Hbs F y A se retienen en la resina mientras que la A2 eluye.

*Hay que tener en cuenta presencia de Hbs **S** y **C** que eluyen junto a la A2*

Equilibrio de la resina

- Se suspenden 100 g de DEAE-52 en H₂O destilada, se agita fuerte, se deja después sedimentar y se decanta el sobrenadante. Luego se suspende en un litro de Tampón 1 por 24 horas en agitación. Al día siguiente se decanta el sobrenadante y se comienza con el tampón 2 hasta que se equilibre a pH=8.5 (cada 30 minutos hacer cambios); esto puede demorar aproximadamente 3 días, cambiando el tampón 2 cada día.

Cuando se alcanza el pH 8.5 se proceden a quitar las partículas finas. Existe un rango de 1.9-2.4; siempre utilizaremos 1.9.

Se echa la resina en una probeta de 1 000 mL y se mide con una regla la altura que alcanza la resina junto con el tampón; esa medida en cm se multiplica por 1.9 y ese valor es el tiempo que hay que esperar para descartar todo el sobrenadante y la resina esta lista para usar.

Ejemplo: 26 cm de altura x 1.9 = 50 minutos.

Si la resina demora más de tres días para equilibrarse se toma un poquito de tampón 2 y se le agregan unas gotas de hidróxido de sodio (NaOH3), con la punta de una pipeta de Pasteur se le agregan entre dos y cuatro gotitas, hasta que alcance el pH 8.5.

Para recuperar la resina se lava la columna con el mismo tampón de la A2 pero a pH 7 que se baja con HCl), se adiciona tampón 1, después H₂O destilada y por último tampón 2.

- ***Reactivos***

- ✧ Tampón 1: (solución stock)

- a) 69 g de PO₄H₂NaH₂O, o

- 78 g de PO₄H₂Na₂H₂O

- Llevar a 1 L con H₂O destilada.

- b) TRIS 0.5 M

- 121 g de TRIS llevar a 2 litros con H₂O destilada.

- Añadir el fosfato al TRIS hasta obtener un pH = 8.5 (lleva aproximadamente doble de volumen de TRIS que de fosfato).

- ✧ Tampón 2

- A 100 mL de tampón 1 adicionar 500 mg de CNK y llevar a 5 litros con agua destilada, pH = 8.5.

Aparatos, utensilios y medios de medición

- Centrífuga.
- Pipetas de 10 mL.

- Probetas de 25 mL.
- Espectrofotómetro.
- Pipeta variable de 100 a 1000 uL (eppendorf).
- Pipeta variable de 10 a 100 uL.

Procedimiento

- Extraer 5 mL de sangre con heparina como anticoagulante
- Obtener glóbulos lavados: la sangre anticoagulada es centrifugada, se desecha el sobrenadante, se resuspenden los glóbulos en solución salina 0.9 % y se centrifuga por 5 minutos a 2 500 rpm. Este proceso se realiza tres veces.
- Hemolizado: en 0.7 mL de H₂O destilada, añadir 0.3 mL de glóbulos lavados y 4 mL de tampón. Centrifugar 10 minutos a 2 500 rpm.
- Aplicar en la columna 1 mL de hemolizado directamente en la resina, después que haya pasado todo el tampón. Cuando penetre todo el hemolizado, adicionar continuamente tampón 2 evitando que se seque la resina.
- Recoger la mancha que va eluyendo (20 mL) y adicionar 0.01 mL de ferricianuro de potasio 4 %.
- Preparar para cada muestra el total: Adicionar en una probeta de 25 mL: 20 mL de tampón 2, 0.1 mL de hemolizado (100 µL) y 0.01 mL de ferricianuro de potasio 4 % (10 µL).
- Leer la densidad óptica a 418 contra blanco reactivo: 20 mL de tampón 2 y 0.01 mL de ferricianuro de potasio.
- Cálculo: % de Hb A2 = DO eluido: DO Total x (10).

Resultados

- El rango de referencia está entre 1.8 y 3 % en adultos sanos.
- **Se encuentra aumentada en**
 - ✧ β talasemia
 - ✧ Anemia perniciosa
 - ✧ Hb inestables,
 - ✧ Trasplante de médula ósea.
- **Esta disminuida en**
 - ✧ Alfa Talasemia
 - ✧ Deficiencia de hierro
 - ✧ Aplasia medular

Técnica: prueba de solubilidad

- **Fundamento:** la Hb **S** en estado reducido (desoxigenada) es muy insoluble en solución tampón de fosfatos de alta molaridad; en estas condiciones se forman tactoides, los cuales refractan y reflejan la luz y producen una solución turbia. En las mismas condiciones, las otras Hbs no muestran cambios en la solubilidad, excepto un tipo de Hb **C**.
- **Reactivos**
 - ✧ Tampón: 64.2 g de KH_2PO_4
147.2 g de K_2HPO_4
Llevar a 400 mL con H_2O destilada.
 - ✧ Pesar 0.5 g de saponina y llevar a 50 mL con agua destilada.
 - ✧ Tampón de trabajo: A 7.5 mL de la solución de saponina añadirle los 100 mL del tampón fosfato y enrasar en 125 mL con H_2O destilada.

Guardar todos los reactivos a 4°C.

Equipos, utensilios y medios de medición

- Tubos de vidrio de 12x 75.
- Balanza analítica.
- Pipetas de 1 y 10 mL.
- Probeta de 250 mL.
- Pipeta de 10 μL .

Procedimiento

- Utilizar sangre total, recogida sobre heparina.
- A 1 mL de tampón de trabajo añadir una pizca (0.02 g) ditionito de sodio.
- Añadir 10 μL de sangre total. Si tiene anemia añadir el doble.
- Esperar 10 minutos a temperatura ambiente y realizar la lectura.
- Para la lectura poner el tubo de ensayo delante de un papel rayado.

Resultados

- Poner el tubo de ensayo delante de un papel rayado: si las rayas son visibles el resultado es negativo, y viceversa.

La prueba es positiva en:

- ✧ Pacientes con anemia de hematíes falciformes.
- ✧ La prueba también es positiva con la Hb C de Harlem.

Pueden verse falsos negativos en:

- ✧ Anemias severas (Hb menor de 70 g/L)
- ✧ Aumento de la Hb F

- ✧ Pacientes politransfundidos

Falsos positivos en:

- ✧ Policitemias
- ✧ Paraproteinemias
- ✧ Politransfusiones

Técnica: Hemoglobina plasmática

- **Fundamento:** la acción catalítica de las proteínas que contienen el grupo HEMO produce una oxidación de la bencidina por el H_2O_2 , produciendo un color verdoso que cambia a azul luego a rojo violeta. La intensidad del color de la muestra se compara fotométricamente con la de una solución conocida de Hb. La sangre se obtiene con heparina o EDTA. Extremar los cuidados para evitar la hemólisis durante todo el proceso hasta la obtención del plasma.

Reactivos

- ✧ Solución de bencidina
 - Dihidrocloreuro de Bencidina -- 0.5 g
 - Agua destilada caliente ----- 15 mL
 - Alcohol 96 % ----- 25 mL
 - Ácido acético glacial ----- 10 mL (guardar en frasco ámbar)
- ✧ Peróxido de hidrógeno 0.6 %.
- ✧ Solución Patrón de Hb : 2 % (20 g/L).(guardar a 4°C)
 - Preparar hemolizado 10 %(100 g/L)
 - Tomar 0.02 mL del hemolizado y llevar a 100 mL con H_2O destilada

Procedimiento

- Sangre anticoagulada con EDTA ó heparina según se recomienda, es centrifugada durante 10 minutos a 3 000 rpm.

	Muestra	Patrón	Blanco
Plasma u orina	0.050	-----	-----
Patrón	-----	0.050	-----
H_2O	-----	-----	0.050
Bencidina	1 mL	1 mL	1 mL
H_2O_2 0.6 %	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
mantener en reposo por 60 minutos			
Ac. acético 20 %	8.5 mL	8.5 mL	8.5 mL

Resultados

- El intervalo de referencia es de 1 a 4 mg.
- La Hb plasmática se encuentra aumentada en aquellas anemias hemolíticas en las que se produce hemólisis intravascular.

Determinación de la deshidrogenasa de la glucosa 6 fosfato

- **Fundamento:** la enzima deshidrogenasa de la glucosa 6 fosfato cataliza la siguiente reacción:



La velocidad de transformación del NADP en NADPH se puede medir determinando la DO/minuto en un espectrofotómetro a 340 nm.

Reactivos

- ✧ Tampón TRIS/HCl (1M) pH 8: pesar 1 mol TRIS ($C_4H_{11}NO_3$) = 121.14 g en 1 litro. Llevar con HCl concentrado a pH 8.
- ✧ $MgCl_2$ (0.1M): pesar 0,1 mol de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ = 20.331 g en 1 litro
- ✧ NADP (2mM)(PM = 787.4) 3.5 mg/2 mL
- ✧ $NaHCO_3$ 1 %.
- ✧ G6P (6mM)(PM = 304) 3.65mg/2 mL
- ✧ 6 PG(6mM)(PM = 378) 4.55 mg/2 mL

NADP	0.0157	g	----	10 mL	H ₂ O destilada
G6P	0.0182	g	----	10 mL	H ₂ O destilada
PEP	0.0520	g	----	5 mL	H ₂ O destilada
6PGto	0.01365	g	----	6 mL	H ₂ O destilada
ADP	0.0710	g	----	5 mL	$NaHCO_3$
NADH	0.00855	g	----	6 mL	H ₂ O destilada

Procedimiento

- La variación de la DO a 340 nm y a 30°C.
- Se realizan 6 lecturas de DO a intervalos de 1 minuto c/u.
- Se calcula la diferencia de DO por minuto para G-6PD más 6-PGD y para 6-PGD y al resultado de la primera se le resta la DO/min. de 6-PGD.
- Se realiza una lectura de Hb al hemolizado, para lo que se toman 20 uL del mismo y se le agregan a 5 mL de Drabkin.
- Se realiza la lectura de la DO a 540 nm contra un blanco de Drabkin y el resultado se calcula utilizando un patrón de hemoglobina ó se multiplica el resultado de la DO por 36.8.

Los resultados se expresan en UI/g Hb

Reactivos	G6Pd/6-pg	6-Pgtod	Blanco(H₂O)
TRIS 1 M	100 µL	100 µL	100 µL
MgCL ₂ 0.1M	100 µL	100 µL	100 µL
NADP 2 nM	100 µL	100 µL	100 µL
Hemolizado 1 :20	20 µL	20 µL	20 µL
H ₂ O destilada	480 µL	580 µL	580 µL
Incubar 10 minutos durante 10 min. a 30°C			
G6P	100 µL	-----	100 uL
6-PG	100 µL	100 µL	100 uL

- También se puede utilizar como blanco agua destilada.
- Si se utiliza RECORDER en el espectrofotómetro PYE-UNICAM, se pone 60 seg. /cm. de velocidad y el slit width en 7 mm.
- Se halla la pendiente a partir de la curva y según la fórmula siguiente se determina la actividad enzimática:

$$\text{Actividad enzimática} = \text{Pendiente} \times 0.02 \times (\text{Vol. final de la cubeta} / \text{vol. del hemol}) \times (100/6.22) \times (1/\text{g de Hb})$$

$$\text{Actividad enzimática} = (\Delta D.O / \Delta T) \times (\text{vol. final de la cubeta} / \text{vol. hemolizado}) \times (100/6.22) \times (1/\text{g de Hb})$$

Si no se utiliza RECORDER utilizar la fórmula:

$$\text{Actividad enzimática} = (\Delta D.O / \Delta \text{Tiempo}) \times (\text{Const.} / \text{g de Hbn})$$

Resultados

- La literatura reporta como valores de referencia de 3.6 a 9.4 UI/g de Hb.
- Los valores utilizados por nosotros corresponden a los del Instituto de Hematología e Inmunología.
- Si el paciente presenta reticulocitosis, los resultados no son confiables.

Técnica

Método cuantitativo para detectar déficit de piruvato quinasa

- **Fundamento:** la actividad enzimática de la PK se mide por medio de la determinación espectrofotométrica de la velocidad de transformación de

NADH en NAD^+ a 340 nm. Para ello se utiliza la reacción enzimática siguiente:



La disminución de la DO (absorbancia) en el tiempo es el índice de actividad de la enzima.

Reactivos

- ✧ Tampón TRIS/HCl. pH 8 (1M)
- ✧ KCl (1M)
- ✧ MgCl_2 (0.1M)
- ✧ NaOH (2 mM)
- ✧ ADP (30 mM) neutralizado.
PM=471.2 14.2 mg/mal de NaCO_3 al 1%.
- ✧ LDH 60 U/mL (5 mg/mL).
10 μL LDH + 0.45 mL del estabilizante BME
5 μL LDH + 225 μL del estabilizante BME
- ✧ Solución estabilizante
10 mL de EDTA 10 % neutralizado a pH 4 para 1 litro de H_2O destilada.
- ✧ Solución estabilizante con BME.
5 μL de BME en 5 mL de solución estabilizadora sin BME.
- ✧ PFP 50 mM (PM= 208----- 10.4 mg/mL)
- ✧ NaCO_3 1 %.

Procedimiento

- Se realiza la determinación en sangre heparinizada, el mismo día de la extracción. La variación de densidad óptica se mide a 30°C y a 340 nm.
- Se realizan seis (6) lecturas de DO a intervalos de 1 minuto cada una, se calcula la variación de DO/minuto.
- Se realiza una lectura de Hb tomando 200 μL del hemolizado y añadiéndole a 5 mL del reactivo de Drabkin
- Se deja 10 minutos en reposo y se lee contra blanco reactivo a 540 nm.
- Los resultados se expresan en UI/g de Hb.

Reactivos	Muestra	Blanco
TRIS	100	100

KCL 1M	100	100
MgCl ₂ 0.1M	100	100
NADH 2 mM	100	100
ADP	50	50
LDH	100	100
HEMOLIZADO	20	20
H ₂ O	330	430
Incubar durante 10 min. a 30°C		
PEP	100	-----

- También se puede utilizar como blanco el H₂O destilada.
- Si utiliza RECORDER poner 60 seg/cm de velocidad y el slit-width en 7 mm
- Se halla la pendiente a partir de la curva y según la fórmula siguiente se determinará la actividad enzimática.

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{(\text{Delta D.O/Delta t}) \times (\text{Vol final de la Cubeta})}{\text{Volumen del hemolizado} \times (100/6.22) \times 1/\text{g Hb}}$$

- Si trabaja con RECORDER la razón de las Deltas se sustituye por: Pendiente x 0.02

Resultados

- Los valores de referencia son: 2.52-8.06 UI/g de Hb. (IHI)

Es importante separar los leucocitos para detectar una deficiencia de PK pues la actividad enzimática en estas células es mayor que en los eritrocitos. En recién nacidos y en pacientes con reticulocitos la actividad enzimática se encuentra elevada, lo que puede enmascarar una deficiencia.

Técnica: Hierro sérico

- **Fundamento:** consiste en la separación y reducción del hierro unido a la transferrina mediante una solución amortiguadora de glicina clorhídrico pH 1.9 con ácido ascórbico. El hierro reducido al estado ferroso forma complejo coloreado con la batofenantrolina. La intensidad del color determinada espectrofotométricamente es proporcional a la concentración de hierro.

Preparación de la cristalería

- El material libre de hierro se prepara mediante la inmersión durante 24 horas en ácido clorhídrico 50 % v/v. Posteriormente se extrae y se enjuaga 10 veces con agua desionizada. Se seca al aire y se coloca boca abajo sobre papel de filtro.

Reactivos

- ✧ Solución amortiguadora de glicina HCl concentrado

Pesar 3.75 g de glicina, disolver en aproximadamente 150 mL de agua desionizada y ajustar el pH a 1.9 ± 0.02 con ácido clorhídrico 1N. Se añade agua desionizada hasta 250 mL y se reajusta el pH si es necesario. Esta solución debe guardarse a 4°C.

Para 1000 mL de H₂O  15 g de glicina

- ✧ Solución amortiguadora de trabajo: debe prepararse el mismo día de las dosificaciones mediante la mezcla de:

2 volúmenes de solución de ácido ascórbico 0.5 % (fresco)

1 volumen solución amortiguadora de glicina HCl concentrado

1 volumen de H₂O desionizada

- ✧ Solución de batofenantrolina

Pesar 100 mg de batofenantrolina sulfonatada y disolver en 25 mL de agua desionizada. Mantener a 4°C.

- ✧ Solución patrón de hierro:

➤ Solución Madre de hierro (1mg/mL).

✦ Pesar cuidadosamente 100 mg de alambre puro de hierro

✦ Colocar en erlenmeyer de 15 mL y se le añaden 2 mL de ácido clorhídrico en H₂O bidestilada libre de hierro (7 moles/L) y se ponen en baño María a 100°C hasta su disolución.

✦ Dejar enfriar y disolver hasta 100 mL con ácido clorhídrico 1N.

- ✧ Solución Patrón de hierro de 100 µg/mL

Tomar 10 mL solución madre y se le añade agua destilada hasta 100 mL

- ✧ Solución patrón de Hierro de 1 y 5 µg/mL

Se toman 1 y 5 mL de la solución de hierro de 100 µg/mL; diluir respectivamente en 2 matraces volumétricos en agua desionizada hasta 100 mL. Estas soluciones se preparan semanalmente y se guardan a 4°C.

Procedimiento

- El contenido específico de cada tubo y las cantidades necesarias de los reactivos se resumen en la siguiente tabla:

	H ₂ O de ionizada	Patrón 1 µg	Patrón 5 µg	Suero problema	Suero Control	Tampón trabajo
Blanco (B)	0.5	--	--	--	--	2.0 mL

Patrón (P1)	--	0.5	--	--	--	2.0 mL
Patrón (P2)	--	--	0.5	--	--	2.0 mL
Suero control	--	--	--	0.5	--	2.0 mL
Control	--	--	--	--	0.5	2.0 mL

- Agitar, dejar en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos y leer la densidad óptica de todos los tubos a 530 nm (DO₁).
- Añadir 0.05 mL de batofenantrolina sulfonatada, agitar y dejar en reposo a temperatura ambiente durante 60 minutos.
- Finalmente leer densidad óptica a 530 nm contra blanco reactivo (DO₂)
- Los blancos de reactivos se leen contra agua desionizada y su densidad óptica no debe exceder de 0.010. En cada serie de determinaciones debe incluirse un suero control con valores conocidos de hierro.

Cálculo de resultados

Factor 1 = $100/[D.O._2(P_2)-D.O._1(P_1)]$

Factor 2 = $300/[D.O._2(P_2)-D.O._1(P_2)]$

Hierro sérico $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ $[(\text{Factor } 1 + \text{Factor } 2)/2] \times [D.O._2(M) - D.O._1(M)]$

Hierro sérico $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ $[(DO_2 - DO_1)/(DO P)] \times CP \times 0.179\text{ }\mu\text{Mol/L}$

P₁ = Patrón de 1 $\mu\text{g/mL}$

P₂ = Patrón de 5 $\mu\text{g/mL}$

DO₁(M) = Densidad óptica de la primera lectura del suero problema.

DO₂(M) = Densidad óptica de la segunda lectura del suero problema.

DO P = Densidad óptica del patrón.

CP = Concentración del patrón.

Técnica: Capacidad total de fijación del hierro

- **Fundamento:** para medir la capacidad total de fijación del hierro por la transferrina, se agrega hierro en exceso con el fin de saturar la proteína. El hierro no unido a la transferrina es absorbido con carbonato de magnesio y posteriormente es eliminado por centrifugación. El hierro del sobrenadante se determina mediante la técnica para determinar hierro sérico.

Reactivos

- ✧ Solución de hierro de 5 $\mu\text{g/mL}$: Se toman 5 μL de la solución de 100 $\mu\text{g/mL}$ y se diluyen en un matraz volumétrico con agua desionizada hasta 100 mL. Debe prepararse semanalmente y guardarse a 4°C.
- ✧ Carbonato de magnesio ligero en polvo: El contenido específico de cada

tubo y las cantidades necesarias de los reactivos se resumen en la siguiente tabla:

	<i>Suero paciente</i>	<i>Suero control</i>	<i>Patrón</i>	<i>Carbonato Mg</i>
Desconocido	0.5	--	1	100 µg
Control	--	0.5	1	100 µg

Agitar durante 30 minutos intermitentemente. Centrifugar todos los tubos durante 15 minutos a 1 000 rpm, decantar y centrifugar de nuevo, finalmente determinar el hierro del sobrenadante por la técnica de dosificación de hierro sérico, como si éste fuera un problema.

Cálculo de resultados

- ✧ Capacidad total µg/mL = [(Factor 1+Factor 2) /2]x[(DO₂(M) - DO₁(M))x3
- ✧ Índice de saturación (%) = (Hierro sérico / Capacidad total) x 100
- ✧ Capacidad latente = CT - Hierro sérico.

Manual de técnicas y procedimientos de la Sección de hematología básica

En esta sección se estudian muestras de pacientes ingresados, consulta externa y urgencias, realizándosele las siguientes pruebas:

- Hemograma automatizado con los siguientes parámetros:
 - ✧ WBC: Conteo de leucocitos.
 - ✧ RBC: Conteo de eritrocitos.
 - ✧ HGB: Hemoglobina.
 - ✧ HCT: Hematocrito.
 - ✧ MCV: Volumen corpuscular medio.
 - ✧ MCH: Hemoglobina corpuscular media.
 - ✧ MCHC: Concentración hemoglóbica corpuscular media.
 - ✧ RDW: Índice de distribución eritrocitaria
 - ✧ PLT: Conteo de plaquetas.
 - ✧ MPV: Volumen medio plaquetario.
 - ✧ PDW: Índice de distribución plaquetaria.
 - ✧ PCT: Plaquetocrito.

- ✧ LYM %: Porcentaje de linfocitos.
- ✧ LYM #: Conteo absoluto de linfocitos.
- ✧ MON %: Porcentaje de monocitos.
- ✧ MON #: Conteo absoluto de monocitos.
- ✧ GRA %: Porcentaje de granulocitos.
- ✧ GRA #: Conteo absoluto de granulocitos.

Los hemogramas son realizados a partir de sangre anticoagulada con EDTA (ver anticoagulantes) y procesada en el contador celular automatizado **Micros 60** de la firma ABX, Francia. Analizador hematológico automático que ofrece 18 parámetros.

Funcionamiento del equipo MICROS 60

- El MICROS 60 es un Analizador Hematológico completamente automatizado, para el Diagnóstico In-Vitro de muestras de sangre total. Este modelo de Analizador mide 18 parámetros y toma 10 µL de sangre total anticoagulada con EDTA. Realiza 60 muestras/hora y cada resultado es emitido en un período de 1 min y 13 seg.
- El principio de medida para eritrocitos, leucocitos y plaquetas está basado en la variación de impedancia medida entre dos electrodos situados a ambos lados de la apertura de recuento. La variación de impedancia se genera a partir del paso de células a través de la microapertura calibrada.
- La variación de impedancia es proporcional al volumen de las células. Dependiendo de su volumen, estas células se clasifican en diferentes canales de medida. De esta clasificación se obtienen los diferentes histogramas.
- Dos cámaras de medidas y circuitos de detección permiten analizar los leucocitos en una de ellas y los eritrocitos y plaquetas en la otra las siguientes diluciones:

✧ LEU: 10 µL de sangre + 2,50 mL diluyente (1/250)

Añadir después 0,60 mL de lisante (dilución 1/300)

✧ ERI / PLT: 20 µL de la dilución 1/250 + 2,5 mL de diluyente.

El equipo realiza las distribuciones volumétricas de los LEU y ERI en 256 canales y 128 para las plaquetas con las siguientes zonas de medida

LEU » 30 - 460 fl

ERI: » 25 - 300 fl

PLT:» 2 - 33 fl

La hemoglobina

- Se mide a partir del principio de la espectrofotometría. La hemoglobina liberada por la lisis de los eritrocitos forma con el cianuro de potasio el complejo cromógeno cianometahemoglobina el cual se mide por espectrofotometría en la parte óptica de la cámara LEU, a una longitud de onda de 550 nm.

El resultado se expresa en g/dL o g/L

El hematocrito

- Se obtiene a partir de la adición de las amplitudes de los impulsos eléctricos obtenidos durante el recuento de eritrocitos. Una fórmula matemática se aplica al resultado obtenido teniendo en cuenta la integración numérica de VCM.

Distribución de los leucocitos

- Estudio volumétrico tras la acción de un reactivo lítico. El diluyente preserva y prepara las membranas de las células para la reacción diferencial. Los linfocitos sufren un encogimiento de sus membranas en sus núcleos perdiendo el citoplasma, los monocitos sufren una acción intermedia y los granulocitos limitada gracias a la estructura de sus citoplasmas y a una molécula que los protege de la acción reductora del lisante.

Tras la acción diferencial del lisante el equipo analiza las alturas de los impulsos y las clasifica en 256 canales de lectura. Se obtiene una curva que representa el número de células (en la ordenada) por el volumen de las células (en la abscisa).

La combinación de absorvancia e impedancia utiliza un análisis de alta definición de las señales transmitidas, lo cual permite la cuantificación de las 6 poblaciones leucocitarias en la matriz LMNE:

- ✧ Linfocitos
- ✧ Monocitos
- ✧ Neutrófilos
- ✧ LIC (células grandes inmaduras)
- ✧ ALY (linfocitos atípicos)

Parametros calculados

VCM	HCM	CHCM	IDE	VPM
PTC,	LIN #	MON #	GRAN #	

Reactivos

- ✧ MINIDIL: solución isotónica tamponada para determinación del recuento de células sanguíneas y del hematocrito.
- ✧ MINICLEAN: Solución enzimática con acción proteolítica para la limpieza del equipo.

- ✧ MINILYSE: Reactivo lisante de eritrocitos para el recuento de leucocitos y la determinación de hemoglobina.
- ✧ MINOCLAIR: Solución de limpieza con lejía para realizar la limpieza concentrada

Teclas de mando

- **Start up:** inicia un ciclo de inicialización del equipo que incluye una limpieza y un aclarado con diluyente del limpiador que quedó en las cámaras. Dura 130 seg y puede reactivado 2-3 veces cuando los valores de medida en blanco están fuera de los límites aceptables.
- **Standby:** se utiliza al final de la jornada de trabajo para iniciar un ciclo de limpieza que deja producto limpiador en las cabezas de contaje y en las cámaras. Si se desea efectuar otro análisis de las muestras es preciso volver a activar un ciclo de encendido.
- **Start:** ordena el inicio de un ciclo de análisis
- **ID:** para introducir la identificación de las muestras
- **DEL:** borrar los valores introducidos por error
- **ENTER:** para validar la información
- **ESC:** Para abandonar una función, para regresar al menú y para detener un ciclo en curso.

Puesta en marcha y análisis

- Verificar nivel de reactivos
- Vacíe el recipiente de desechos
- Verifique funcionamiento de la impresora
- Ponga en marcha el equipo:

Encienda el aparato pulsando el botón de marcha **On** en la parte trasera del equipo. Inmediatamente después de encender aparecerá en pantalla

PLEASE WAIT FOR 3 MIN
ESCAPE : ESC.

Luego, la luz de la parte delantera pasa del rojo al verde para indicar que la fase de inicialización ha terminado. Espere el final del ciclo de Encendido automático o pulse la tecla **Start up**. A continuación se realiza un conteo vacío (análisis con reactivos sin muestras de sangre). Debe comprobar que los resultados no sobrepasen los siguientes límites:

LEU: 0,3

ERI: 0,02

PLT: 10

Si los resultados sobrepasan estos límites, el equipo efectúa automáticamente otro **Encendido**; tras tres **Encendidos**, si los valores continúan altos, se observará el mensaje:

ERROR ENCENDIDO, VERIFIQUE REACTIVOS

Entonces usted cambiará sus reactivos y efectuará una limpieza concentrada, después de esta un ciclo en blanco y procesará sus controles. Si lo anterior no resuelve el problema póngase en contacto con el ingeniero. Si se resuelve puede procesar las muestras.

- **Verificación de la calibración**

Antes de analizar las muestras se recomienda procesar 3 niveles de controladores. Si estos se encuentran dentro de los rangos establecidos, comience a procesar las muestras, cuyo primer paso será la identificación. Para ello presione la tecla **Id**; aparecerá el siguiente menú:

Nro. PROC.?

ESC: CANCEL

PRÓXIMO.

SI. ENTER

Introduzca el número del tubo (1 a 9999) utilizando el teclado, pulse **Enter** y aparecerá el mensaje:

PULSE BARRA DE MUESTREO

Presentar la muestra a la Aguja y presionar la barra que se encuentra detrás de ésta. Una vez que toma la muestra, la aguja se retira y aparecerán en el display los resultados. Cuando la luz del indicador para de flaquear y se torna verde, el equipo está listo para un próximo análisis.

MENÚ:

1) RESULTADOS

2) CONTROL DE CALIDAD

3) CALIBRACIÓN

4) SERVICIO

5) CONFIGURACIÓN

Cuando entramos en el menú **resultado** observaremos los resultados de la última muestra procesada.

El **control de calidad** solamente puede desarrollarse si contamos con una tarjeta que se introduce en el lector ubicado en el extremo superior izquierdo del equipo.

Calibración: La autocalibración se realiza utilizando un calibrador comercial (MINOCAL). Es un proceso que se desarrolla automáticamente de etapa en etapa, con la Selección del operador, la entrada del número de lote del calibrador, la entrada de los valores diana y el número de análisis que sirven a la calibración. La calibración será aceptada si los cálculos estadísticos están dentro de los límites aceptables:

Parámetros	Leu	Eri	Hgb	Htc	Pla	VPM
CV	2,5	2,0	1,5	2,0	5,0	3,0

Cuando se descarta la calibración el usuario puede repetir el procedimiento anterior o introducir directamente los valores de los coeficientes ***si se conocen los mismos*** mediante la función # 2 del menú de calibración

Limites	WBC	RBC	Hgb	Hct	Plt	MPV	RDW	Pdw
Mínimo	0,89	0,73	0,83	0,87	0,99	0,75	0,75	0,75
Medio	1,09	0,89	1,11	1,08	1,20	0,94	1,00	1,00
Máximo	1,29	1,05	1,39	1,29	1,41	1,13	1,25	1,25

Menú servicio

- **La limpieza concentrada:** permite una limpieza concentrada de los orificios LEU y ERI. Se realiza de forma manual, con una jeringuilla de 5 mL, se vierte en la cámara de leucocitos (WBC) 3 mL de hipoclorito de Na 4 % ó MINOCLAIR, y seguidamente el mismo volumen en la cámara de eritrocitos (RBC) El proceso tiene una duración de 3 min. Después de completado el ciclo, inmediatamente se continúa con el procesamiento de las muestras.
- **La limpieza automática:** se programa cada cierto número de muestras procesadas (se realiza de forma automática, con el detergente propio del equipo y enjuaga con el diluyente para arrastre de detergente y dejar limpio el sistema).

CONFIGURACIÓN:

- 1- RESULTADOS
- 2- CAMBIAR LÍMITES
- 3- FUNCIONES ESPECIALES
- 4- FECHA Y HORA
- 5- OPERACIONES HOST

✧ Reimpresión del último resultado en memoria

- ✧ La impresión o no de los histogramas
- ✧ La elección del tipo de unidades
- ✧ La elección del tipo de impresora
- ✧ La impresión o no de la temperatura de funcionamiento
- ✧ La impresión o no de los límites
- ✧ La impresión o no de los resultados LMG
- **Cambiar límites:** el usuario puede cambiar los límites de normalidad patológicos para cada parámetro, de acuerdo a las especificaciones de su laboratorio. Los resultados fuera de los límites se pondrán en evidencia mediante las alarmas alta (H) y baja (L) según el límite de normalidad rebasado.
- **Funciones especiales:** estas funciones accesibles con un password (contraseña) le permiten al usuario:
 - ✧ Identificar 4 usuarios
 - ✧ Cambiar la contraseña
 - ✧ Elegir el modo de inicialización
 - ✧ Elegir la frecuencia de las limpiezas automáticas
 - ✧ Imprimir la configuración general del aparato
 - ✧ Activar la señal sonora de fin de ciclo
 - ✧ Elegir el modo de identificación

Se puede modificar la fecha y la hora de acuerdo a las características de cada país, incluyendo 4 formatos diferentes para la fecha.

El equipo puede transmitir resultados de un ordenador de laboratorio externo a través de una interfase RS232, pero estas funciones solo deben ser utilizadas por el especialista a cargo de la conexión informática del equipo.

También se puede configurar la configuración del lector de código de barras según el modo de lectura deseado y la configuración *de la tarjeta de memoria en los aparatos equipados para esta función.*

Otros estudios

- Eritrosedimentación.
- Conteo de reticulocitos.
- Conteo de eosinófilos.
- Evaluación de lámina periférica: se realizan a pacientes que presentan:
 - ✧ Hb < 100 g/L ó > 16 g/L

✧ Leucocitos < $4 \times 10^9/L$ ó > $10 \times 10^9/L$

✧ Hematocrito < 30 % ó > 50 %

Pacientes que presenten otra alteración en hemograma automatizado

Normalmente, los hemogramas de los pacientes ingresados y los pacientes atendidos por urgencia son procesados en el analizador.

- **Anticoagulantes:** fueron descritos en la sección de Citomorfología. Ver también la sección de Hemostasia.
- **Determinación de la fracción de volumen de eritrocitos (hematocrito):** ver sección de Citomorfología.
- **Determinación fotométrica de hemoglobina en sangre:** ver sección de Citomorfología.

Instrucciones para la preparación de un grafico de calibración

- Los gráficos de calibración se realizan con el principal objetivo de conocer si un método o procedimiento se comporta linealmente en el intervalo de referencia (intervalo de valores) de interés clínico. Si es así, un valor único de la solución de referencia (patrón) se puede utilizar para calcular la concentración de las muestras de los pacientes y de los controles.
- Si no existe linealidad, los cálculos se hacen a partir del **gráfico de calibración**. El comportamiento lineal de un método depende de varios factores: el método, el equipo en que se hacen las lecturas, el estado de los reactivos empleados, por lo que el gráfico de calibración se repetirá siempre que esté presente alguna de las situaciones siguientes:
 - ✧ Que se comience a utilizar un equipo nuevo o éste haya sido reparado en cualquiera de sus partes.
 - ✧ Que se preparen nuevos reactivos, se comience a utilizar un lote nuevo o de una firma comercial diferente a la que estaba en uso.

Ejemplo de la preparación de un grafico de calibración

- *Como ejemplo se expone la preparación de un gráfico de calibración para la determinación de hemoglobina en sangre. Iguales principios se aplican a otras técnicas o procedimientos.*
- Para realizar dicho gráfico es necesario disponer de una solución de referencia de cianometahemoglobina (CNHb) con una concentración entre 150 y 200 g/L. En el ejemplo que se expone la concentración de la solución de referencia es de 200 g/L:

Tubo	Sol de referencia 200 g/L (mL)	Reac cianuro-ferricianuro Drabkin modificado (mL)	Concentración (g/L)
1	-	5	-

2	200	4,5	1,5
3	150	3,0	3,0
4	100	1,5	4,5
5	50	-	5,0

- En 5 tubos para ensayo se vierten los volúmenes de la solución de referencia y de reactivo de cianuro-ferricianuro (Drabkin modificado) según muestra la tabla. Las concentraciones aparecen en la última columna.
- Las mediciones con pipeta se rehacen con cuidado y se selecciona una de un volumen aproximado al que se va a dispensar (por ejemplo 5 mL). Lea cada muestra contra el blanco (tubo 5) comenzando por la de menor concentración (tubo 4). Anote las absorbancias (A).
- Se confecciona el gráfico en papel milimetrado y se anotan las concentraciones en el eje de las X (abscisas) y las absorbancias (A) en el eje de las Y (ordenadas).

El gráfico se utiliza para:

- Conocer si el método es lineal en el intervalo de referencia y entonces calcular las concentraciones de las muestras contra un valor único de la solución de referencia.
- Preparar una tabla de concentraciones/absorbancias para calcular las concentraciones.
- Comparar los gráficos de calibración realizados antes y después del cambio o reparación de equipos y preparación de nuevos reactivos.

Determinación de la concentración de número de leucocitos

- **Conteo global de leucocitos:** *ver sección de Citomorfología.*
- ***Determinación de la fracción de número y examen de leucocitos:*** *(conteo diferencial de leucocitos). Ver sección de Citomorfología.*
- ***Determinación de la velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSE).***
Ver sección de Citomorfología.
- ***Determinación de las constantes corpusculares:*** ver sección de Citomorfología.
- ***Determinación de la concentración de número de eosinófilos:*** *ver sección de Citomorfología.*
- **Conteo de reticulocitos:** *ver sección de Citomorfología.*