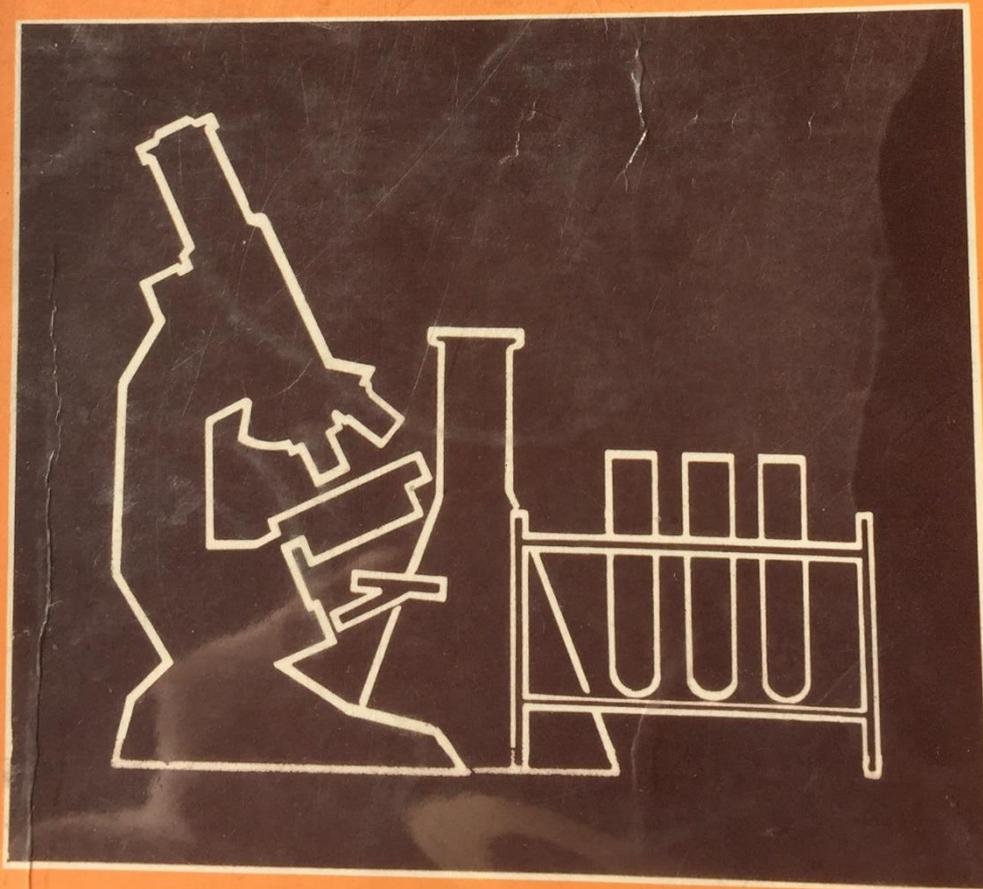


METODOS PRACTICOS DE LABORATORIO CLINICO BASICO

2da. Edición

Rafael A. Ramírez Ponce



METODOS PRACTICOS DE LABORATORIO CLINICO BASICO

Rafael A. Ramirez Ponce

Médico Patólogo Clínico

Médico del Servicio de Microbiología e Inmunología. Departamento de Patología Clínica del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen del Instituto Peruano de Seguridad Social

Segunda Edición

Lima- Perú

1988

INDICE

INTRODUCCION / pag. 4

CAPITULO I /pag. 5. Principios del trabajo e Instrumentación en el Laboratorio: Generalidades – Material de Vidrio – Limpieza – Microscopio – Centrífuga – Baño de agua – Balanza – Mecheros – Esterilizadora – Autoclave – Fotómetros – Factor de Calibración – Curva Patrón – Cálculos químicos – Seguridad en el Laboratorio.

CAPITULO II / pag. 17. Urianálisis : colección de la muestra – Examen físico – Examen químico – Examen microscópico.

CAPITULO III / pag.25. Bioquímica: Colección de la muestra – Acido Urico – Amilasa – Bilirrubinas – Calcio – Colesterol – Creatinina – Depuración de Creatinina – Fósforo – Fosfatasa Acida – Fosfatasa Alcalina – Glucosa – Prueba de Tolerancia a la Glucosa – Lípidos Totales – Proteínas Totales y Albúmina – Triglicéridos – Transaminasa Glutámica Oxalacética – Transaminasa Glutámica Pirúvica – Urea – Examen de Fluidos Biológicos: Líquido Seminal – Líquido Cefalorraquídeo – Efusiones : pleural, pericárdica y peritoneal.

CAPITULO IV / pag. 49. Hematología: Colección de la muestra – Anticoagulantes – Coloraciones – Hemoglobina – Hematocrito – Velocidad de Sedimentación – Recuento de glóbulos rojos – Recuento de glóbulos blancos - Morfología de glóbulos rojos - Morfología de glóbulos blancos – Morfología de las Plaquetas – Examen del frotis de sangre – Recuento de Reticulocitos – Recuento de Plaquetas – Tiempo de Coagulación – Tiempo de Sangría – Tipificación de Grupos Sanguíneos A,B,O – Tipificación del Rh – Pruebas Cruzadas.

CAPITULO V / pag. 70. Inmunología: Generalidades – Métodos para detectar reacciones antígeno anticuerpo – Serología de la Sífilis – Prueba de Aglutinaciones para Tifoidea, Paratifoidea y Brucelosis – Prueba de Embarazo – Dosaje semicuantitativo de HGC – Prueba de Latex para Artritis Reumatoidea – Células LE.

INTRODUCCIÓN

Debida a la buena acogida de la primera edición, me he visto estimulado para elaborar una segunda, corrigiendo algunos defectos y ampliando o actualizando la mayoría de los capítulos. Destacan los agregados realizados en el Capítulo de Bioquímica donde se añade el examen de fluidos biológicos, incluyendo líquido seminal y líquido cefalorraquídeo; en el Capítulo de Inmunología se definen los diversos métodos para detectar las reacciones antígeno anticuerpo.

En esta edición he tratado también de mantener el sentido eminentemente práctico y sencillo de la obra, de tal manera que pueda servir como breve manual de datos útiles para los profesionales y estudiantes relacionados con el trabajo diario en el Laboratorio Clínico.

Con la esperanza de que se cumplan los propósitos de esta edición, quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han brindado consejos y sugerencias así como aquellas que con dedicación y habilidad han trabajado para la creación de este libro.

EL AUTOR

CAPITULO I

PRINCIPIOS DEL TRABAJO E INSTRUMENTACION EN EL LABORATORIO CLINICO

A) GENERALIDADES:

En todo laboratorio clínico se deben observar las siguientes normas:

- 1) Las solicitudes de exámenes especificarán claramente nombre, edad y número de identificación del paciente; asimismo diagnóstico clínico, examen requerido, firma del médico y la fecha.
- 2) La persona que toma la muestra identificará plenamente al paciente constatando su nombre, número y el resto de datos.
- 3) El procesamiento de la muestra se realizará considerando que:
 - a- Debe seguirse estrictamente los pasos establecidos por el médico Patólogo Clínico a cargo del laboratorio.
 - b- Debe tenerse cuidado con la fecha de expiración de los reactivos y que los instrumentos se hallen en óptimas condiciones de calibración y funcionamiento.
 - c- Los cálculos de los resultados deben realizarse meticulosamente, si es posible con calculadora.

B) MATERIAL DE VIDRIO EN EL LABORATORIO CLINICO:

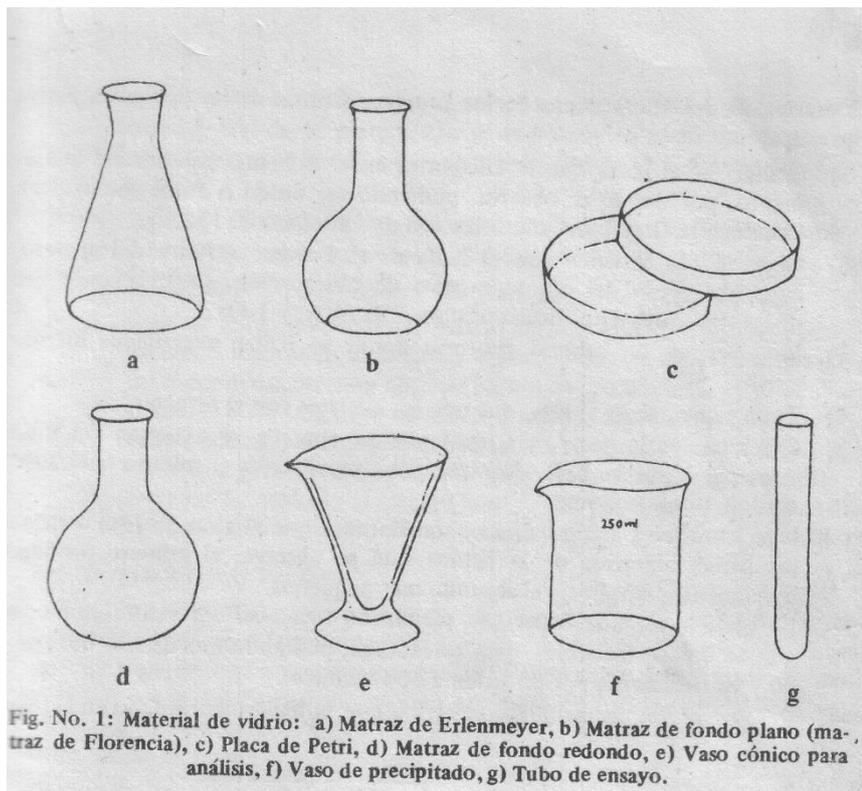
- 1) **Tubos de ensayo:** existen en varias medidas, los más usados son los de 13 mm. de ancho por 100 mm. de largo, 10 x 75 mm. y 16 x 125 mm. El vidrio puede ser simple o resistente al calor, tipo Pyrex.
- 2) **Láminas y laminillas:** las láminas portaobjetos miden 3 pulgadas de largo por 1 pulgada de ancho y pueden tener los extremos biselados. Las laminillas cubreobjetos son cuadradas, de vidrio delgado y existen de diversos tamaños, las más usadas son las de 18 x 18 mm.
- 3) **Matraces:** son recipientes que tienen un cuello y un cuerpo que de acuerdo a este último se clasifican en:
 - a- Cónicos (Erlenmeyer): tiene graduaciones, pero la capacidad total indicada solo es aproximada.
 - b- Redondos: que a su vez pueden ser de fondo plano o redondo. Tienen una marca en el cuello (aforo) que indica con exactitud la capacidad total.
- 4) **Placas Petri:** son recipientes planos de forma circular con rebordes elevados y tapa, que sirven para colocar medios de cultivo sólidos o muestras
- 5) **Frascos gotero:** son frascos transparentes o de color ámbar, con tapa la cual presenta una ranura que sirve de gotero. Se utiliza para colocar reactivos o colorantes.
- 6) **Probetas:** son recipientes cilíndricos, alargados con graduación, y tienen una base firme.
- 7) **Becker:** su forma es cilíndrica de boca ancha y con pico para verter líquidos y presenta una graduación aproximada.
- 8) **Pipetas:** existen de diversos tamaños y medidas. De acuerdo al modo de utilizarlas pueden ser:

- a- Las que tienen las abreviaciones TC (To container. contiene), contienen determinado volumen, pero al vaciar no suministran todo el líquido porque parte de este queda adherido a las paredes de la pipeta, debiendo necesariamente enjuagarse en el líquido de dilución.
- b- Las que tienen las letras T.D. (To Deliver: suministra), al vaciar la pipeta suministrará todo el volumen especificado, quedando siempre líquido adherido a la pared y en la punta, que no se considera y por lo tanto no deben ser sopladas. Tener cuidado antes de usarlas observando si son o no terminales.
- c- Las que son para soplar: las gotas que quedan en la punta deben ser sopladas y tienen como seña un anillo grabado en el extremo oral.

C) LIMPIEZA:

Seguir los siguientes pasos:

- 1) En general todo material contaminado debe colocarse en autoclave a 15 libras de presión por 20 minutos, luego colocar en solución de detergente, cepillar cuidadosamente y enjuagar tres veces en agua corriente y finalmente con agua destilada.
- 2) Láminas portaobjetos: limpiar el aceite de inmersión con xilol o alcohol colocar las láminas en una solución desinfectante por 4-6 horas o en la misma solución en caliente por 3 horas (para desprender el colorante). Enjuagar con agua caliente, dejar en alcohol por 2 horas y limpiar con gasa una por una.



- 3) Los tubos de ensayo deben sumergirse en solución detergente, luego limpiar con escobilla y enjuagar con abundante agua corriente y finalmente con agua destilada para dejarlos secar en horno tibio.
- 4) Las pipetas deben enjuagarse inmediatamente con agua y dejarse en un recipiente lleno de agua para luego acabar de lavarlas y secar en horno a 90°C por 1 hora.

Nota: Los coágulos sanguíneos adheridos pueden disolverse dejando sumergido el material en una solución de hidróxido de potasio al 10% o en solución sulfocrómica, por 24 horas y luego se lavan.

Solución Sulfocrómica: Disolver 80 g. de bicromato de potasio en un litro de agua destilada por dos días y luego agregar 100 ml. de ácido sulfúrico concentrado, enfriando el recipiente en agua y finalmente guardar bien tapado.

D) MICROSCOPIO

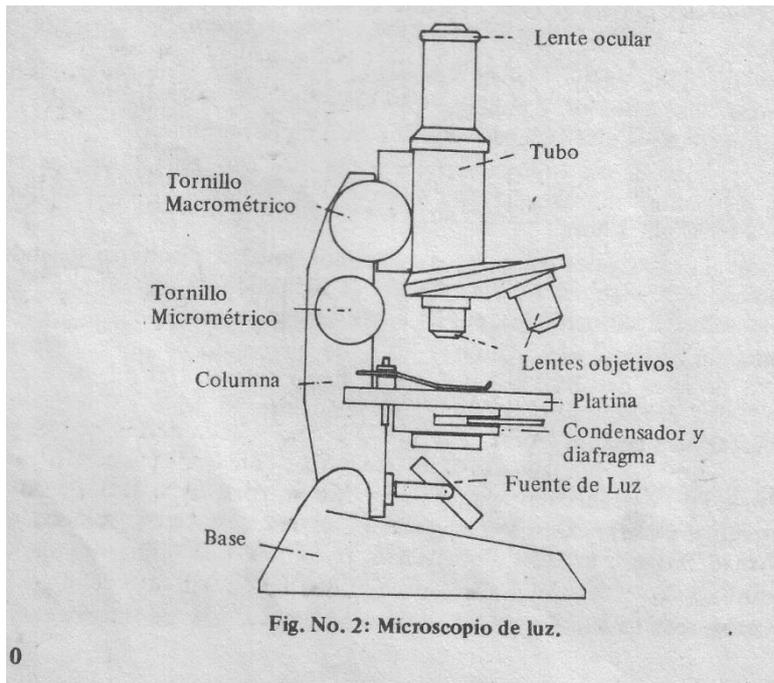
Este instrumento consta básicamente de un sistema de lentes, que amplifica la imagen. Existen de diversos tipos, los más utilizados en el laboratorio son: Microscopio de luz simple, M. de campo oscuro y M. de fluorescencia.

Descripción del microscopio de luz simple.- Consta de las siguientes partes principales:

- 1) Ocular: es el lente que se encuentra en el extremo superior del instrumento, por donde se observa, pudiendo ser único o doble (binocular). Usualmente tienen una amplificación de 5x, 10x o de 15x.
- 2) Objetivo: es el lente que se halla en el extremo inferior del aparato, colocado cerca del objeto motivo de observación. Generalmente son de las siguientes amplificaciones: 4x, 10x, 40x, y 100x.
- 3) Revólver: es un cabezal giratorio donde se hallan engranados los objetivos.
- 4) Tubo principal: es el tubo que une los oculares con el revólver.
- 5) Columna: es la parte más resistente del aparato, se extiende del tubo principal hasta la base. Siempre debe movilizarse el microscopio sujetándolo por la columna.
- 6) Macrométrico y micrométrico: son botones que al girar acercan o alejan los lentes objetivos de la lámina que se observa, el primero produce movimientos amplios y el segundo más pequeños.
- 7) La platina: es una superficie plana con una abertura central sobre la que se coloca la lámina para su examen, pudiendo movilizarla horizontal y verticalmente por un sistema de engranajes.
- 8) Fuente de luz: es un bulbo eléctrico que se halla incorporado en la base del aparato, de tal forma que los rayos luminosos se dirijan hacia la abertura central de la platina. Otros microscopios necesitan una fuente de luz externa, utilizando un espejo para dirigir el haz luminoso hacia la platina.
- 9) Diafragma y Condensador: es un sistema que permite el paso de mayor o menor intensidad de luz sobre la lámina colocada en la platina.

Manejo del Microscopio: Se recomienda seguir los siguientes pasos:

- a) Colocar la lámina sobre la platina, enfocar con el objetivo de menor aumento utilizando el macro y el micrométrico, además acomodando el condensador para obtener iluminación adecuada.
- b) Cambiar a los objetivo de mayor aumento según sea necesario enfocando adecuadamente. Si se utiliza el objetivo de inmersión (100 x), echar una gota de aceite de cedro sobre la lámina seca y observar.
- c) Después de acabado el trabajo limpiar con papel para lentes los objetivos y oculares sucios. Finalmente tapar con una funda el aparato.



E) CENTRIFUGA

Es un instrumento que utiliza la fuerza centrífuga para lograr separar estratos (capas) de diferente densidad. Ej. Suero de glóbulos rojos en la sangre. Existen de diversos modelos, las más usadas son: las clásicas de mesa para 4-8 tubos, las de pie que pueden ser hasta para 36 tubos, las de microhematocrito para colocar tubos capilares y las de pie refrigeradas para centrifugar bolsas de sangre con alta velocidad.

Descripción de la centrifuga clásica: consta de las siguientes partes:

- 1) Cabezal: es un sistema de brazos metálicos simétricos colocados horizontalmente sobre el eje del instrumento y sostiene en sus extremos los portatubos.
- 2) Motor: se halla en la base del instrumento, moviliza un eje de tal forma que el cabezal gira horizontalmente a una determinada velocidad y tiempo que son graduables.
- 3) Envoltura y tapa: todo el aparato se halla cubierto por una envoltura de material resistente generalmente metal, solo existe una abertura superior por donde se colocan los tubos, que se cierra con una tapa hermética antes de prender el motor

Manejo de la centrífuga: se recomienda lo siguiente:

- 1) Tomar por pares los tubos que se van a colocar, con sus respectivos portatubos y pesarlos, de tal forma que ambos conjuntos pesen igual, si es necesario pueden contrapesarse agregándose gotas de agua al portatubo que pesa menos. Esto es importante para evitar ruptura de tubos y desperfectos del aparato.
- 2) Colocar los pares de tubos contrapesados frente a frente en el cabezal de la centrifuga.
- 3) Cerrar bien la tapa del aparato.
- 4) Marcar el tiempo que desea centrifugar y la velocidad respectiva.

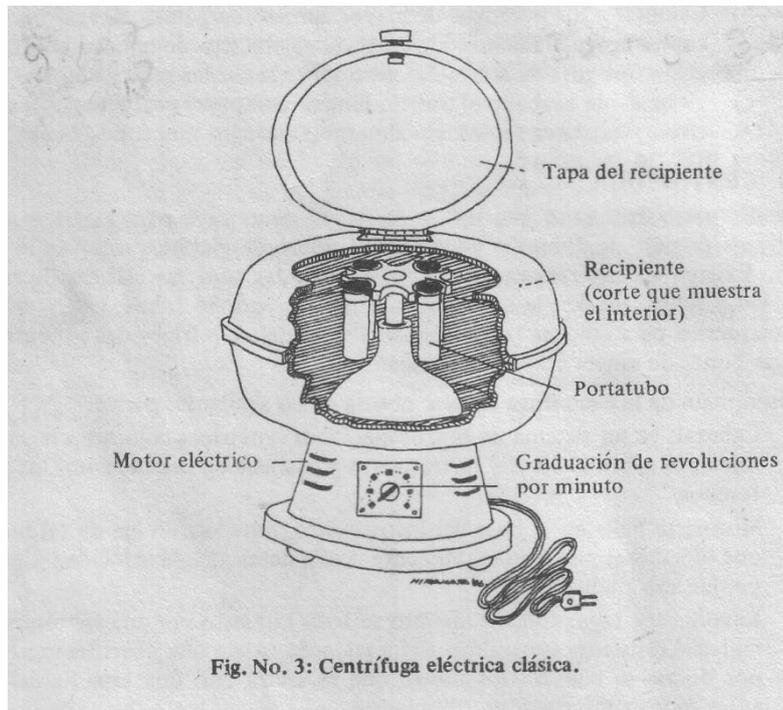
Actualmente para indicar la velocidad debe expresarse en Fuerza Centrifuga Relativa (FCR) o "g" que tiene la siguiente fórmula:

$$FCR (g) = 1.118 \times 10^{-5} \times R \times N^2$$

R= Radio de rotación (distancia en cm. del centro del eje del aparato hasta el final del tubo de centrifuga)

N= Revoluciones por minuto

Centrifuga de Microhematocrito: ver Hematología pág. 59.



F) BAÑO DE AGUA

Es un aparato de forma cuadrangular con tapa, que contiene agua a determinada temperatura, graduada por un termostato y controlada por un termómetro.

Manejo:

- 1) Echar agua destilada en cantidad necesaria y prender el aparato.
- 2) Graduar a temperatura deseada y sumergir en el agua una gradilla portatubos inoxidable.
- 3) Con el termómetro, verificar que el agua alcance la temperatura marcada.
- 4) Recién entonces colocar los tubos en la gradilla que se halla dentro del agua y empezar a contabilizar el tiempo requerido.

G) BALANZAS:

Suelen usarse balanzas de dos platillos para contrapesar tubos o para pesos groseros; cuando se realizan determinaciones finas se utiliza la balanza analítica, que puede ser mecánica o eléctrica.

Manejo: Seguir estrictamente las instrucciones de cada fabricante, tener sumo cuidado para no alterar la precisión de estos delicados aparatos, debiendo evitarse vibraciones, suciedades por restos de reactivos y siempre desconectar la balanza después de cada pesada.

H) MECHEROS:

Existen dos modelos clásicos:

- 1) El mechero de alcohol: que consiste en un depósito de alcohol con una mecha y su tapa para apagar, es portátil, práctico, pero produce una llama sólo de moderada intensidad.
- 2) El mechero de Bunsen: consiste en un tubo metálico en cuya base presenta una ruedecilla que gradúa la entrada del gas, el cual llega al mechero a través de una manguerilla conectada a una fuente de gas; tiene la ventaja de producir una llama azulada y potente.

I) ESTUFA (INCUBADORA):

Es un aparato eléctrico que produce calor seco, tiene forma cuadrangular encerrando un espacio donde el ambiente alcanza determinada temperatura, regulada por un termostato y controlada por un termómetro, alcanzando temperaturas hasta de 60-70°C.

Manejo:

- 1) Prender el instrumento y graduar la temperatura deseada.
- 2) Verificar con el termómetro que se haya alcanzado la temperatura indicada.
- 3) Colocar en el interior del aparato el material que se desea incubar y marcar el tiempo necesario.

J) ESTERILIZADOR DE CALOR SECO (HORNO):

Son aparatos muy semejantes a las estufas pero alcanzan temperaturas hasta de 240°C. Se utilizan para esterilizar o secar material de vidrio, no sirve para líquidos y material de jebe. Puede esterilizarse colocando una temperatura de 170°C por dos horas ó 180°C por una hora.

K) AUTOCLAVE:

Es un aparato que produce calor húmedo en la forma de vapor a presión para lograr esterilizar. Los más utilizados tienen un cuerpo cilíndrico con tapa hermética, presentando en su exterior una escala de temperatura y presión (libras/pulg.²), además una válvula de evacuación y otra de seguridad.

Manejo: seguir las instrucciones del fabricante. Usualmente se realizan los siguientes pasos:

- 1) Llenar con agua destilada hasta la marca indicada y colocar los objetos que se quieren esterilizar.
- 2) Colocar la tapa cerrando herméticamente, verificar que funcione la válvula de seguridad y prender el aparato colocando el interruptor en el nivel más alto.
- 3) Dejar abierta la válvula de evacuación para que al calentar el aparato se expulse todo el aire existente en la cámara de esterilización, entonces recién cerrarla. Esto es importante porque de quedar aire a determinada presión, la temperatura será inferior.
- 4) Esperar que la escala de temperatura y presión marque 121°C y 15 libras/pulg.², entonces bajar el interruptor a nivel medio y esperar 20 a 30 minutos para después apagar el aparato.
- 5) Dejar que enfrié bien, luego abrir la válvula de evacuación y después recién la tapa.

L) FOTOMETRO:

El fotómetro es un aparato que tiene la capacidad de medir la concentración de una solución coloreada. Se fundamenta en el hecho de que la luz blanca (compuesta por todos los colores del espectro visible) al atravesar una solución transparente o no coloreada, ej. agua, es absorbida en muy pequeña cantidad, pero casi toda es transmitida a través del líquido. Si esta luz incide sobre una célula fotoeléctrica conectada a un instrumento registrador puede medirse la

cantidad de luz transmitida en porcentaje, es decir, casi 100% y la absorbida será casi 0%. Si la solución es coloreada, la luz blanca al atravesarla sufre una determinada absorción y el resto se transmite; pero esta absorción todavía es escasa, porque solo representa una fracción pequeña de luz total, por lo tanto, el instrumento registrador indicará una escasa variación. Debe considerarse que una solución coloreada absorbe rayos luminosos de determinada longitud de onda, entonces pueden utilizarse sólo rayos luminosos que se absorben específicamente; por lo tanto, la cantidad de esta luz absorbida por la solución coloreada es mayor y existe una mejor sensibilidad para medir pequeñas diferencias en la intensidad de color. Para obtener rayos luminosos de determinada longitud de onda se pueden utilizar:

- Filtros, que seleccionan un determinado grupo de longitudes de onda, eliminando otras.
- Espectroscopio: es un prisma o una rejilla de difracción que descompone la luz blanca en un espectro, del cual se puede seleccionar solo una longitud de onda necesaria. Por lo tanto existen dos tipos de fotómetros: el de filtro y el monocromador o espectrofotómetro.

1) **Fotómetro de Filtro:**

Consiste de las siguientes partes:

- a) Fuente de luz: generalmente una lámpara de tungsteno.
- b) Los filtros: son cristales coloreados intercambiables, que seleccionan un grupo de longitud de onda, usualmente pueden bastar tres colores: azul (430-475 μm de longitud de onda), verde (505-555 μm) y rojo (620-700 μm), la elección del color se ha establecido experimentalmente con soluciones patrones, para observar cuál de los filtros favorece una mayor absorción y así obtener la máxima sensibilidad en la lectura del aparato. Ej. así tenemos que las soluciones azules absorben fuertemente el rojo, por lo tanto, debe elegirse el filtro rojo, pero a veces se utilizan filtros que no son de máxima absorción para minimizar la interferencia de otras sustancias.
- c) Cubeta: es el tubo donde se coloca la solución coloreada motivo del examen, está especialmente calibrado para usarse con un determinado fotómetro.
- d) Detectores fotosensibles: son sistemas que convierten las ondas luminosas que llegan después de atravesar la cubeta, en corriente eléctrica (voltaje)
- e) Medidor: es el sistema que registra la energía eléctrica, generalmente es un galvanómetro, donde se realizan las lecturas en una escala graduada.

2) **Fotómetro Monocromador (Espectrofotómetro)**

Las partes de este aparato son esencialmente semejantes al fotómetro de filtro, sólo que a diferencia de éste utiliza un espectroscopio, bajo la forma de una rejilla de difracción o un prisma para obtener luz monocroma de una sola longitud de onda.

El medidor, presenta una doble escala paralela, transmitida de 0-100% y absorbancia de 0 a 2. En la actualidad son los aparatos más utilizados por su exactitud y versatilidad.

Manejo del espectrofotómetro: en cada caso se deben seguir las instrucciones del fabricante. Usualmente se realizan los siguientes pasos:

- a) Prender el aparato y esperar que caliente.

- b) Llevar el aparato a 0 de absorbancia ó 100% de transmitancia, utilizando como "blanco" una cubeta con agua destilada o con reactivo solo.
- c) Depositar en otra cubeta la solución problema y colocar en lugar de la cubeta "blanco".
- d) Observar el desplazamiento de la aguja indicadora del medidor y anotar la absorbancia o transmitancia señalada.

Ley de Beer (Lambert y otros)

Establece que la concentración de una sustancia es directamente proporcional a la cantidad de luz absorbida e inversamente proporcional al logaritmo de la luz transmitida. Luego, no existe una proporción aritmética simple entre la absorción de la luz y la concentración de la solución colorada, sino una relación logarítmica que se expresa en las escalas de los fotómetros, así tenemos:

- a) Escala de Transmitancia: que se halla dividido en 100 partes iguales de 0 al 100%.
- b) Escala de absorbancia: son divisiones desiguales espaciadas logarítmicamente.

M) FACTOR DE CALIBRACION

Si consideramos que la absorción de una solución coloreada es directamente proporcional a su concentración siempre que el desarrollo de la coloración siga la ley de Beer, entonces tendremos que dos soluciones, una de concentración conocida (patrón) y otra desconocida (problema), procesadas y leídas idénticamente guardan una relación entre sus absorbancias y concentraciones que permite calcular la concentración desconocida.

C1= Concentración conocida (solución patrón)

A1= Absorción de solución conocida

C2= Concentración de solución desconocida (solución problema)

A2= Absorción de la solución desconocida.

Ecuación 1): $A_1 = C_1$ de donde Ecuación 2): $C_2 = \frac{A_2 \times C_1}{A_1}$

A2 C2

A1

Cuando los aparatos utilizados sólo expresan transmitancia pueden emplearse tablas para conversión a absorbancia.

De la ecuación 2) notamos que la expresión $\frac{C_1}{A_1}$ (perteneciente a la solución patrón)

A1

siempre se repetirá si el método tiene una capacidad de reproducción exacta, pudiéndose expresar como número entero o decimal denominándose **factor de calibración**. Finalmente la Concentración Desconocida **C2 = A2 (Absorbancia de solución desconocida) x factor**.

Importante: es conveniente en lo posible calcular el factor diariamente para cada serie de exámenes o cada vez que se preparen nuevos reactivos.

N) CURVA PATRON

Se preparan 4-6 soluciones patrones de diferentes concentraciones que deben variar entre los límites que suelen observarse en la práctica. Procesar estas soluciones de acuerdo al método utilizado tomándose precauciones con las diluciones y correcciones necesarias, de tal forma que sean idénticas a las determinaciones de las muestras de pacientes.

Las lecturas se registran en Transmitancia o en Absorbancia.

Graficar las lecturas de transmitancia en papel semilogarítmico, señalando la concentración de las sustancias en el eje de abscisas que tiene divisiones aritméticas (iguales) y la Transmitancia en el eje de ordenadas que tiene divisiones logarítmicas (desiguales).

Si se grafican las lecturas de Absorbancia se utiliza papel milimetrado (divisiones iguales), colocando indistintamente en un eje las cifras de Absorbancia y en el otro las concentraciones de la sustancia.

Importante: las curvas deben ser preparadas para cada aparato en el propio laboratorio. Si se realizan cambios en el aparato o se preparan nuevos reactivos debe hacerse una nueva curva.

Ñ) CALCULOS QUIMICOS

1) Átomo: Es un elemento constitutivo de la materia, conformado por un núcleo (protones y neutrones) y una envoltura eléctrica (electrones)

2) Peso atómico: Es la relación comparativa entre el peso de un elemento y el del carbono.

3) Molécula: Agrupación definida de átomos, considerada la menor partícula de un cuerpo, que conserva las características químicas del mismo.

4) Peso Molecular: es la suma de los pesos atómicos de los átomos que forman la molécula.

5) Valencia: es la capacidad de un elemento o de un radical, para combinarse con otros elementos o con él mismo para formar una molécula. Ej.: la molécula de oxígeno tiene valencia 2, luego, puede combinarse con dos átomos de hidrogeno que tiene valencia 1.

6) Acido y Base: Acido, es un ion, una molécula o una partícula que libera iones hidrógenos en solución acuosa. Una base en cambio, es la que acepta iones hidrógenos. Ej.: el ácido carbónico H_2CO_3 se disocia en HCO_3^- y H^+ , donde el radical acetato (HCO_3^-) es una base porque acepta iones hidrogeno H^+ .

7) Concentración de iones hidrógeno y pH: El agua pura se ioniza así: $\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ + \text{OH}^-$ y a 24°C la concentración de iones H^+ es de 10^{-7} moléculas gramo/litro (**M**). Conocemos que la constante de disociación del agua (**K agua**), válida para cualquier solución acuosa, es el producto de los iones hidrógenos e hidroxilos (OH^-), es decir:

$$\text{K agua} = [\text{H}^+] \times [\text{OH}^-]$$

Considerando que el número de iones hidroxilo en el agua es igual al de iones hidrógeno, tenemos:

$$\text{K agua} = 10^{-7} \times 10^{-7}$$

$$\text{K agua} = 10^{-14}$$

En soluciones ácidas los iones hidrógeno son más de 10^{-7} M y en soluciones alcalinas son menos de 10^{-7} .

Cuando se trabajan soluciones ácidas o alcalinas usualmente se considera la concentración de iones hidrógeno, pero como este número es muy pequeño, difícil de manejar, se ideó el **pH**: que es el logaritmo de base 10 de la recíproca de la concentración de iones hidrógeno:

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]}$$

Ej.: $[\text{H}^+] = 10^{-9}$ $\text{pH} = \log \frac{1}{10^{-9}}$ $\text{pH} = \log 10^9 = 9$

8) Solución Amortiguadora o Buffer: Es aquella, compuesta por un ácido o una base débil con su sal, cuya función es mantener el mismo pH a pesar de que se añaden ácidos o bases, que son amortiguados al reaccionar con la sal o el ácido respectivamente.

Los ácidos o bases débiles se ionizan sólo parcialmente y esta proporción es una constante particular (pK) para cada ácido o base. Entonces escoger convenientemente un ácido o base, con su respectivo pK y una determinada concentración de la sal, se pueden obtener soluciones de casi cualquier pH, según la clásica ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pK del ácido o base} + \log_{10} \frac{[\text{sal}]}{[\text{ácido}]}$$

9) Soluciones: Solución, se denomina al conjunto de sustancias o soluto disuelto en un líquido o solvente. Existen diversos tipos de soluciones, las más utilizadas en el laboratorio clínico son las siguientes:

a) Soluciones porcentuales: que pueden ser:

- Peso en volumen (p/v): cuando se disuelve un sólido en un líquido Ej. hidróxido de sodio al 10% (p/v), se prepara disolviendo 10 g. de hidróxido de sodio en agua destilada hasta completar 100 ml.
- Volumen en volumen (V/V): cuando se utilizan dos líquidos. Ej. una solución de ácido clorhídrico al 3% (v/v) en alcohol etílico hasta un volumen final de 100 ml.
- Peso en peso (p/p), cuando se disuelve un sólido o se diluye un líquido en otro líquido, hasta completar un peso final de 100 g.

b) Solución Molar: Es la que contiene una molécula gramo de sustancia por litro de solución.

- Molécula gramo o Mol (M): es el peso molecular de una sustancia expresada en gramos.
Ej.: hidróxido de sodio (OHNa) 1M, se prepara disolviendo 1 Molécula gramo de OHNa = 40 g, en agua destilada, hasta completar 1 litro de solución final. Para preparar OHNa 0.1 M: disolver 4 g. de OHNa en agua destilada hasta completar un litro.

Nota: si las concentraciones son pequeñas se pueden expresar en milimoles por litro. 1 Mol = 1,000 milimoles.

c) Solución Normal: es la que contiene el peso equivalente de una sustancia en gramos o sea el peso equivalente gramo, por litro de solución.

- El peso equivalente gramo de una sustancia es igual a su peso molecular en gramos dividido entre su valencia. Para el caso de los ácidos se calcula dividiendo el peso molecular entre el número de átomos de hidrógeno reemplazables en la molécula y para las bases se divide entre el número de hidroxilos (OH).

Ejemplos: el ácido sulfúrico (H_2SO_4), tiene **PM** 98 y 2 átomos de hidrogeno reemplazables, luego su peso equivalente gramo es $98 : 2 = 49$; si se desea preparar una solución 1N es necesario 49 g. de H_2SO_4 en agua destilada hasta completar 1 litro. Los preparados comerciales de H_2SO_4 concentrado, tienen por ejemplo 1,632 g. por litro con una densidad de 1.84; entonces se toman unos 30 ml. que contienen los 49 g. necesarios y se diluyen en agua destilada hasta completar 1 litro.

O) SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

El personal de laboratorio está obligado a conocer las posibles causas de accidentes y los medios de prevención, pero esto no basta sino que realmente se debe mantener un constante estado de alerta, cuidado y concentración al realizar el trabajo.

Los principales riesgos en el trabajo de laboratorio clínico suelen ser los siguientes:

- 1) Sustancias corrosivas o venenosas: los frascos de ácidos, álcalis y venenos deben estar correctamente rotulados y al ser manipulados evitar salpicaduras o derrames; en casos de grandes cantidades utilizar guantes, mandiles y dispositivos de bombeo para aspirar las cantidades que se necesitan.
 - Al diluir ácidos o álcalis en agua se produce intenso calor que puede romper el recipiente o explotar. Siempre el ácido debe echarse sobre el agua, lentamente, y si es necesario enfriar el recipiente en agua helada.
 - Los reactivos irritantes de vías aéreas o preparados con ácido de preferencia no deben pipetarse con la boca pudiendo utilizarse dispensadores o pipetas automáticas.
 - En caso que alguna de estas sustancias entre en contacto con la piel o el ojo, inmediatamente debe realizarse lavado con abundante agua por 20 minutos y acudir al médico si la quemadura o la contaminación es severa.
- 2) Sustancias inflamables e incendios: las sustancias inflamables más comunes en el laboratorio clínico son: alcoholes (etílico, metílico), cloroformo, tolueno, xilol, éter y acetona. No debe mantenerse ningún mechero encendido por lo menos en un radio de 3 metros, cuando se manipulan estas sustancias, el ambiente debe ser lo suficientemente ventilado y rutinariamente, solo mantener sobre la mesa de trabajo pequeñas cantidades.
 - Para utilizar el mechero de Bunsen debe siempre encenderse primero el fósforo y luego recién abrir el gas. Asimismo, cualquier olor sospechoso de gas investigarse prontamente.
 - En caso de iniciarse un incendio, si es pequeño puede tratarse de ahogar el fuego con un paño mojado o con un extinguidor de bióxido de carbono, si persistiera, inmediatamente hacer funcionar el sistema de alarma contra incendio y avisar a los ambientes vecinos para que tomen las precauciones del caso.
- 3) Quemaduras: se producen generalmente al contacto con material de vidrio caliente, vapores, o salpicaduras de líquidos. Debe verificarse siempre que los materiales estén fríos antes de manipularlos o utilizar pinzas. Tener cuidado al vaciar líquidos calientes en recipientes fríos que pueden romperse.
 - Para calentar sustancias usar recipientes de fondo redondo y pared delgada que resisten mejor el calor, además tela metálica con asbesto para evitar el contacto directo con la llama. Si se calientan tubos hacerlo intermitentemente, para que no se produzca expulsión violenta de su contenido.

- Las quemaduras eléctricas pueden prevenirse teniendo cuidado de no tocar con las manos húmedas los aparatos eléctricos. Asimismo nunca intentar arreglar un desperfecto con el aparato enchufado de preferencia llamar al técnico.
 - En caso de choque eléctrico severo, se produce un paro cardio respiratorio, siendo muy importante iniciar inmediatamente masaje cardíaco y respiración artificial boca a boca durante todo el trayecto hasta un centro asistencial.
- 4) Laceraciones y heridas: son ocasionadas mayormente por cristalería rota.
- No debe emplearse mucha fuerza al manipular material de vidrio.
 - Tener cuidado con los tubos fisurados, que tienen mayor posibilidad de romperse al centrifugarse.
 - Al transportar frascos grandes, llenos, sujetarlos adecuadamente y con las manos secas para evitar que se resbalen.
- En caso de lesiones, proceder a desinfectar la herida y cubrirla.
- 5) Infecciones: especialmente en la sección de microbiología, existe riesgo de contaminación biológica con bacterias, virus y hongos.
- No debe consumirse alimentos ni bebidas en las áreas contaminadas.
 - Si se derrama material infectado, echar un desinfectante y cubrir con un papel, luego de 30 minutos recién limpiar.
 - Todas las mesas de trabajo limpiarlas al final de la jornada con soluciones desinfectantes.
 - Utilizar guantes al manipular muestras de sangre, heces y secreciones sospechosas de contener agentes altamente infecciosos.
 - Las sustancias desinfectantes que pueden emplearse son:
Hipoclorito de Sodio al 5%
Cresol al 3%
Fenol al 5%
Compuestos yodados
Preparados comerciales: Sablón (clorado), Isodine (Yodopovidona).

CAPITULO II

URIANALISIS

El examen rutinario de Orina Completa incluye el examen físico, examen químico y el estudio del sedimento urinario. Nunca estará demás insistir que la muestra debe ser tomada impecablemente.

A) COLECCIÓN DE LA MUESTRA

- La orina deberá ser de preferencia la primera de la mañana.
- El paciente se practicará un lavado escrupuloso, con agua y jabón, de la región genital, particularmente del meato urinario.
- El primer chorro de la micción se desechará; del segundo chorro (chorro medio) se recogerán 20-60 ml. de orina en un frasco limpio, seco y tapar bien.
- La muestra debe ser procesada lo más pronto posible, en caso contrario refrigerarse (4-8°C) o puede usarse formol al 40% a razón de una gota por cada 10 ml. de orina para preservar el sedimento.

B) EXAMEN FISICO

- 1) **Color:** Normalmente es amarillo claro. Pueden encontrarse otros colores como:
Rojo: presencia de sangre, ingesta de remolacha.
Ambar oscuro: Medicamento, presencia de bilirrubina.
Negruzco: Presencia de melanina, etc.
- 2) **Aspecto:** Debe ser observado en un vaso, normalmente es transparente, pudiendo observarse en otros casos como ligeramente turbio y francamente turbio.
- 3) **Reacción:** Es expresada por el pH (ver Capítulo I). Se utiliza una tira de papel indicador, que al introducirla en la orina vira a un color determinado que corresponde a un valor de pH, de acuerdo a una cartilla comparativa de colores.
- 4) **Gravedad específica:** Se mide con el Urinómetro, que es un hidrómetro, con dos partes principales: el bulbo y el tallo que se halla graduado de 1,000 a 1,060.

Procedimiento:

- a) Se vierte orina en una probeta de tamaño adecuado para el urinómetro, hasta 3 cm. antes del borde.
- b) Introducir el instrumento limpio y seco con el tallo hacia arriba, haciéndolo girar suavemente para que no se adhiera a las paredes de la probeta.

Resultados: Leer en la porción más inferior del menisco formado por la orina sobre el tallo graduado del urinómetro.

Valores Normales: Varía entre 1.015 – 1.025.

C) EXAMEN QUIMICO

Existen actualmente tiras reactivas múltiples para determinar en orina: el pH, proteínas, glucosa, sangre, cuerpos cetónicos, bilirrubina y urobilinógeno, pudiendo verificarse cualquier hallazgo con pruebas confirmatorias.

En nuestro país entre otras muchas tiras reactivas, tenemos: Combur Test (Boehringer Mannheim), Multistix (Ames), Multi-Merckognost (Merck), etcétera. La tira debe introducirse brevemente en la orina fresca y bien mezclada, sacudir el exceso y leer comparando los colores de la tira con una cartilla patrón, después del tiempo especificado por cada fabricante, para las distintas determinaciones químicas.

Pruebas Confirmatorias:

1) Proteínas

Fundamento: Los ácidos como el tricloroacético y el sulfasalícílico, precipitan las proteínas produciendo turbidez.

- **Cualitativo:**

Ácido sulfasalícílico (ASS) al 3%: disolver 3g. de ASS en agua destilada (AD) hasta completar 100 ml.

Procedimiento:

- a) En un tubo colocar 3 ml. del sobrenadante después de haber centrifugado la orina problema.
- b) Añadir 3 ml. de ácido sulfasalícílico al 3% y mezclar por inversión.
- c) Dejar en reposo por 10 minutos.

Resultados: Observar el tubo y reportar de acuerdo al siguiente esquema:

Turbidez escasa = 1⁺

Turbidez y gránulos = 2⁺

Turbidez, gránulos y flóculos = 3⁺

Precipitado sólido = 4⁺

- **Cuantitativo** (proteínuria en 24 horas)

Muestra: Orina de 24 horas, para lo cual indicar al paciente que orine a las 7 a.m. del día anterior al examen y desechar, y recién a partir de este momento juntar toda la orina hasta la última micción a las 7 a.m. del siguiente día. Debe conservarse en refrigeradora hasta su traslado al laboratorio.

Reactivos:

- a) Ácido tricloroacético (TCA) al 12.5%: disolver 12.5 g. de TCA en agua destilada y completar a 100 ml.
- b) Patrón: con un suero de concentración proteica conocida, ej. 6g/100 ml. hacer una dilución con suero fisiológico (cloruro de sodio al 0.9%), ej.: 1:200 para obtener una concentración de 30 mg/100 ml. que servirá de solución patrón.

Procedimiento:

- a) Medir el volumen de la orina de 24 horas y mezclar bien, separando unos 20 ml. para realizar el examen.

b) Colocar en 3 tubos:

	Problema	Blanco	Patrón
Orina	4 ml.	4 ml.	–
Patrón	-	-	4 ml.
Agua destilada	-	1 ml.	–
Ácido TCA 12.5%	1 ml.	-	1 ml.

c) Mezclar por inversión y esperar 8 minutos.

d) Nuevamente mezclar y leer en absorbancia en un fotómetro con filtro azul o a 420 nm. Llevar a 0 (cero) el aparato con agua destilada y leer el patrón, nuevamente llevar a 0 el aparato, pero con el tubo blanco y leer el problema.

Resultados:

$$\text{Proteínas en mg/100 ml} = \frac{\text{absorbancia del problema} \times 30}{\text{absorbancia del patrón}}$$

$$\text{Proteinuria en 24 horas} = \text{mg/100 ml.} \times \frac{\text{volumen de orina en ml.}}{.100}$$

Nota: En caso de proteiunuria elevada como 400 mg/100 ml. o si la absorbancia está cerca de 0.8, diluir la orina al décimo (1:10), repetir el procedimiento y multiplicar el resultado por 10.

2) **Glucosa**

- **Cualitativa:**

Fundamento: El sulfato de cobre en medio caliente y alcalino, es reducido a óxido cuproso, por sustancias reductoras como la glucosa y otros azúcares:

Reactivos:

Reactivo de Benedict cualitativo: disolver 173 g. de citrato de sodio y 100 g. de carbonato de sodio anhidro (ó 117.3 g. del monohidratado) en unos 700 ml. de agua destilada, calentando ligeramente. Aparte disolver 17.3 g. de sulfato de cobre en 100 ml. de agua destilada y añadir moviendo sobre la primera solución, finalmente aforar a 1 litro con agua destilada.

Procedimiento:

- En un tubo de 16 x 125 colocar 5 ml. de reactivo de Benedict cualitativo.
- Añadir 0.5 ml. de orina.
- Mezclar y colocar sobre la llama de un mechero, moviendo el tubo suavemente, por 2 minutos (¡Cuidado, el líquido puede salpicar con fuerza!).
- Enfriar y observar.

Resultados: Una reacción positiva muestra turbidez por precipitados de color verde: 1⁺, si es amarillo: 2⁺ y rojo ladrillo: 3⁺, de acuerdo a la cantidad de sustancia reductora presente en la orina.

3) **Pigmentos Biliares**

Fundamento: Los pigmentos biliares al reaccionar con el yodo en solución alcohólica producen un color verde característico.

Reactivos: Lugol para bilis: disolver 1 g. de Iodo en alcohol etílico hasta completar 200 ml.

Procedimiento:

- a) En un tubo colocar 4 ml. de orina.
- b) Añadir 0.5 ml. del reactivo Lugol para bilis en “zona” (lentamente y con el tubo inclinado)
- c) Dejar en reposo por 1 minuto.

Resultado: Si la prueba es positiva se forma un anillo de color verde en la zona de contacto de la orina con el reactivo.

4) **Urobilinógeno**

Fundamento: el Urobilinógeno de la orina al reaccionar con el paradimetilaminobenzol en solución ácida forma un compuesto de color rojo cereza.

Reactivos: R. de Ehrlich:

Paradimetilaminobenzol 2 g.

Alcohol etílico 100 ml.

Ácido Clorhídrico concentrado 100 ml.

Procedimiento:

- a) En un tubo colocar 4 ml. de orina.
- b) Añadir 8 gotas de reactivo de Ehrlich y mezclar.
- c) Dejar en reposo 5 minutos.

Resultados: Si la prueba es positiva, se observa la aparición de un color rojo cereza.

5) **Cuerpos cetónicos.- (Acetona)**

Fundamento: La acetona al reaccionar con el Nitroprusiato de sodio produce color púrpura.

Reactivos:

- a) Reactivo de Nitroprusiato de sodio: disolver 5 g. de Nitroprusiato de sodio en 50 ml. de agua destilada y 50 ml. de ácido acético.
- b) Hidróxido de amonio.

Procedimiento:

- a) En un tubo colocar 5 ml. de orina.
- b) Añadir 1 ml. del reactivo del Nitroprusiato de sodio y mezclar bien.
- c) Añadir 1 ml. de hidróxido de amonio en zona.

Resultados: Si la prueba es positiva se observa un anillo de color púrpura en la zona de contacto de los líquidos.

6) **Sangre (Thevenon)**

Fundamento: El ácido acético libera la hemoglobina de los hematíes, la que a su vez libera oxígeno que reacciona con el piramidón en solución alcohólica para formar un compuesto de color violeta.

Reactivos:

- a) Ácido Acético al 50%: diluir 50 ml. de ácido acético puro con agua destilada hasta 100 ml.
- b) Reactivo de piramidón al 1% en solución alcohólica: disolver 1 g. de piramidón en alcohol etílico hasta completar 100 ml.
- c) Peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) de 30 volúmenes.

Procedimiento:

- a) En un tubo colocar 5 ml. de orina.
- b) Agregar 3 gotas de ácido acético al 50% y mezclar bien.
- c) Añadir 1 ml. de peróxido de hidrogeno en zona (inclinarse el tubo en ángulo de 45, permitiendo que el reactivo añadido se deslice suavemente por la pared del tubo.)
- d) Añadir en zona 1 ml. del reactivo de piramidón al 1% y esperar 1 minuto.

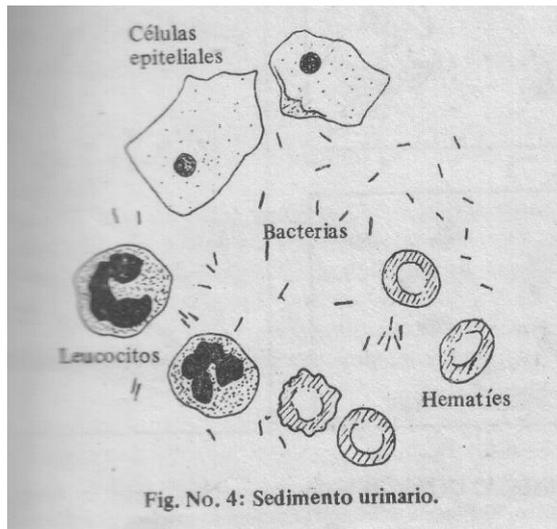
Resultados: Si la prueba es positiva se formará un anillo color violeta en la zona de contacto entre la orina y el reactivo de piramidón. Se puede informar en cruces de acuerdo a la intensidad del color.

D) EXAMEN MICROSCOPICO DEL SEDIMENTO**Procedimiento:**

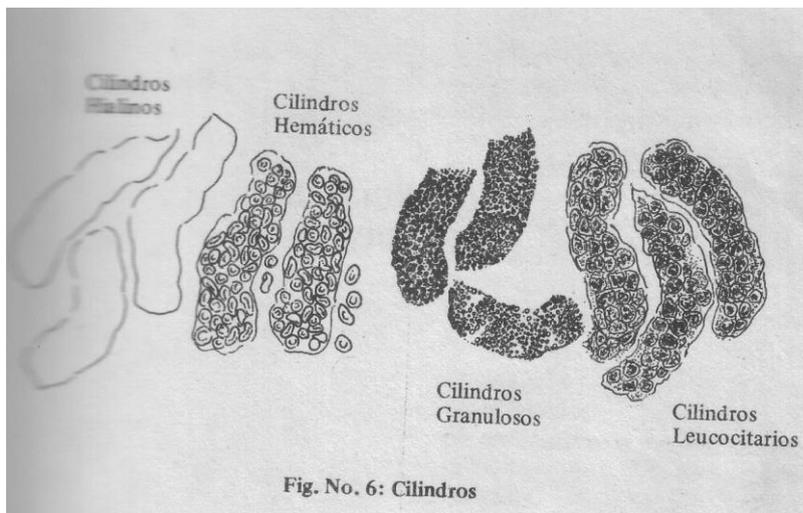
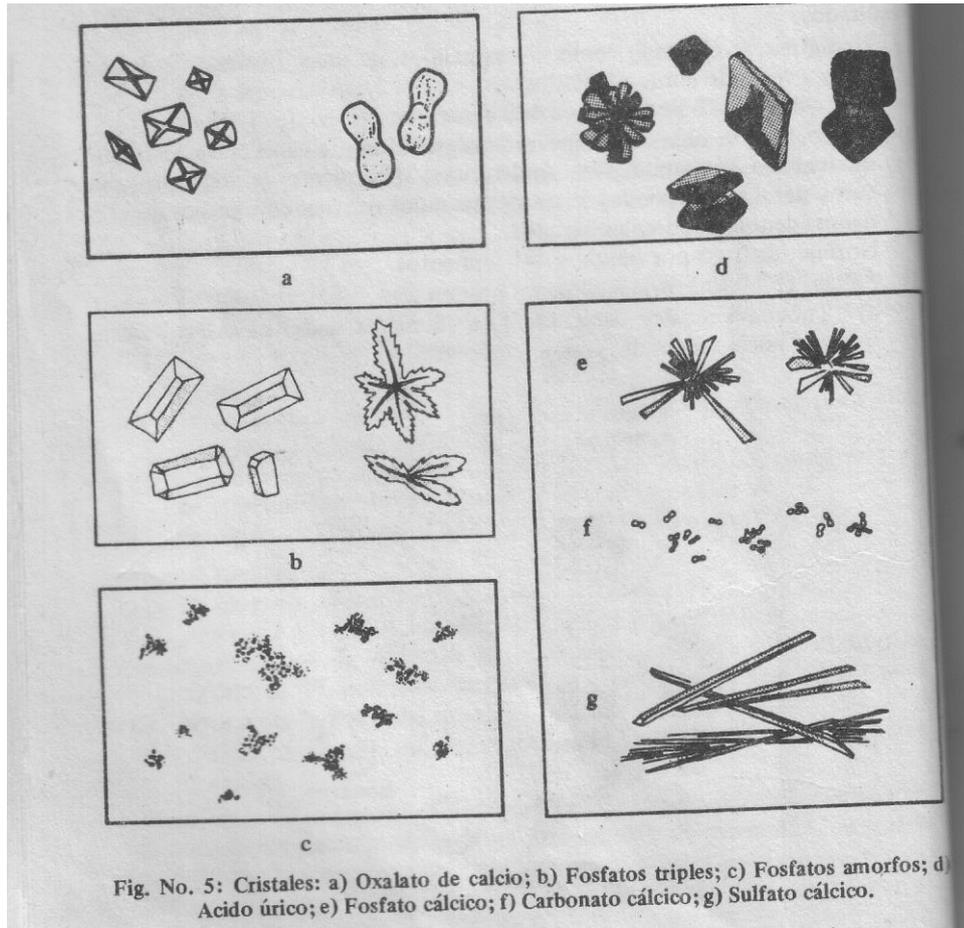
- 1) Mezclar bien la muestra y colocar 10 ml. en un tubo.
- 2) Centrifugar a 1,500 rpm (revoluciones por minuto) por 5 minutos.
- 3) Desechar el sobrenadante, dejando 1 ml. de orina.
- 4) Agitar el tubo para resuspender el sedimento.
- 5) Colocar 1 gota pequeña del sedimento en una lamina (portaobjetos) y cubrir con una laminilla (cubreobjetos)
- 6) Observar al microscopio con poca luz a 100 aumentos, para una visión panorámica y percatarse de cilindros y células epiteliales.
- 7) Luego recién observar a 440 aumentos, para identificar detalladamente leucocitos, hematíes, bacterias y otros.

Resultados:

- 1) Hematíes: se observan como discos pálidos, de unas 7 micras de diámetro y a veces de bordes dentados.
Normal: de 0 a 3 por campo a 440 aumentos.
- 2) Leucocitos: se observan como esferas granulosas, a veces con núcleo segmentado o mononucleado, miden unas 12 micras de diámetro. En casos patológicos pueden verse degenerados o formando grupos (aglutinados) denominándoseles piocitos.
Normal: de 0 a 5 por campo a 440 aumentos
- 3) Células epiteliales: principalmente pueden ser:
 - a) Tubulares renales: miden de 12 a 15 micras, de forma casi cuboidea, con núcleo redondo, grande y excéntrico.



- b) Vaginales: son grandes aplanados, de núcleo pequeño y central, el citoplasma puede presentar los márgenes plegados.
Normalmente pueden encontrarse algunas células epiteliales.
- 4) Bacterias: pueden observarse aisladamente en el campo microscópico o formando grupos.
Normalmente no se encuentran, debiendo distinguirse de la contaminación por bacilos vaginales.
- 5) Cristales:
 - a) De orinas ácidas ($\text{pH} < 7$), pueden ser de: Ácido úrico: se observan de varias formas (prismas, hexágonos, etc.) son de color amarillento, solubles en hidróxido de sodio e insoluble en ácido clorhídrico. Uratos: forman un sedimento amorfo que se disuelve al calentar.
 - b) Oxalato de calcio: son cristales octaédricos que tienen la apariencia de cuadrados cruzados por dos líneas diagonales que se intersectan.
 - c) Cistina: son de forma hexagonal, muy refractivos y solubles en ácido clorhídrico.
- De orinas alcalinas ($\text{pH} > 7$):
 - a) Fosfatos: pueden formar un sedimento amorfo. Los fosfatos triples tienen forma de prismas alargados. Son solubles en ácido acético.
 - b) Carbonato de Calcio: pueden ser amorfos o tomar la forma de 8, son solubles en ácido acético.



- 6) Cilindros: son formaciones alargadas bien delimitadas de extremos romos que pueden ser:
 - a) Hialinos: transparentes, deben observarse con poca luz.
 - b) Granulosos: semejantes a los hialinos pero tienen incluidos numerosos gránulos.
 - c) Hemáticos: son de color anaranjado, presentan hematíes incluidos.
 - d) Leucocitarios: formados por leucocitos.
 - e) Céreos: son más opacos que los hialinos, de apariencia cérea, pueden presentar un extremo curvo.
- 7) Otros: a veces pueden hallarse espermatozoides, trichomona vaginales, ácaros, huevos de oxiuros, filamentos mucoides, etc.

CAPITULO III

BIOQUIMICA

A) COLECCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de sangre pueden ser obtenidas por punción venosa o arterial. Para los exámenes que aquí trataremos se utilizará sangre venosa.

Recomendaciones importantes:

- Debe siempre verificarse, con la solicitud del médico en la mano, el nombre del paciente y el tipo de examen a realizarse, antes de tomar la muestra.
- El paciente debe estar de preferencia en ayunas, salvo indicación del médico.
- Los tubos a utilizar deben estar limpios, secos y rotulados con el nombre del paciente

Técnica de punción venosa:

- 1) **Adultos:** Usualmente se utilizan las venas del pliegue antecubital del brazo, pero pueden ser otras como las del antebrazo, dorso de la mano, dorso del pie, etc. Se deben seguir los siguientes pasos:
 - a) Preparar la jeringa estéril y seca con aguja No. 20 ó 18 G x 1 (son cortas y de calibre algo grueso).
 - b) Colocar el brazo del paciente en una posición cómoda para evitar movimientos y limpiar la zona elegida con alcohol etílico al 70%.
 - c) Aplicar una ligadura a 7 cm. por encima del pliegue del codo asegurada con un medio nudo fácil de soltar; pueden utilizarse las clásicas ligaduras tubulares de látex o cintas de jebe de 2.5 cm. de ancho o el manguito de un tensiómetro a una presión de 90-100 mm. de Hg.
 - d) Indicar al paciente que abra y cierre la mano para que ingurgiten las venas por debajo de la ligadura.
 - e) Colocar la aguja con el bisel hacia arriba y en forma paralela a la vena.
 - f) Fijar la vena con un dedo de la mano izquierda, por debajo del sitio de punción y proceder a introducir la aguja, de preferencia en un solo paso que atraviese la piel y la vena.
 - g) Llenar la jeringa con la cantidad de sangre deseada y recién soltar la ligadura.
 - h) Retirar la aguja colocando simultáneamente un algodón sobre la zona de punción e indicar al paciente que flexione el codo y permanezca así por 5 minutos.
 - i) Retirar la aguja de la jeringa y echar la sangre en el tubo respectivo.

Observaciones:

- a) La ligadura no debe estar colocada demasiado tiempo antes de tomar la muestra, porque se alteran algunos resultados.
 - b) Debe siempre cuidarse las venas, no traumatizarlas exageradamente, porque a veces de la integridad de ellas depende la vida de un paciente que necesita terapia endovenosa urgente.
- 2) **Niños:** Para la punción venosa en niños suele utilizarse en el brazo, la vena antecubital; en el cuello, yugular externa y en la región inguinal, la femoral (es

de riesgo, debe practicarla el médico). La limpieza para la punción del cuello y región inguinal, debe realizarse prolijamente, con productos yodados y alcohol.

Punción de la vena yugular externa:

Se coloca al niño boca abajo, sobre el borde de una camilla, de tal manera que los hombros contacten sobre su superficie y la cabeza que sobresalga del borde, entonces hacerla rotar para un lado y tirar suavemente hacia abajo, logrando exponer ampliamente el cuello, observándose la vena completamente estirada, realizar la limpieza y luego procurar que el niño llore, para causar la ingurgitación y recién practicar la punción con aguja No. 21 ó 20 G x 1, Después de realizar la maniobra, comprimir la zona punzada por 5 minutos colocando al niño en posición sentada.

B) ACIDO URICO (Método Caraway)

Fundamento: El ácido úrico es oxidado en medio alcalino por el ácido fosfotungstico, que es reducido a azul de tungsteno, resultando la intensidad del color, directamente proporcional a la cantidad del ácido úrico presente.

Reactivos:

- 1) Ácido sulfúrico 2/3N: lentamente echar 19 ml. de H_2SO_4 concentrado en un matraz conteniendo 500 ml. de agua destilada, mezclar bien, enfriar y aforar a un litro.
- 2) Tungstato de sodio al 10%
- 3) Carbonato de sodio al 10%.
- 4) Reactivo del ácido fosfotungstico (concentrado): en un matraz colocar 100 g. de tungstato de sodio libre de molibdato ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$) luego añadir 150 ml. de ácido fosfórico diluido (33 ml. de ácido fosfórico 85%, diluir en agua destilada hasta completar 150 ml.) mezclar bien y acoplar un refrigerante al reflujo, hervirse por una hora y decolorar con gotas de bromo. Dejar enfriar la solución y aforar con agua destilada a 500 ml.

Solución de trabajo: diluir una parte de la solución anterior con nueve de agua destilada.

- 5) Solución patrón de ácido úrico (100 mg//100ml): disolver 200 mg. de ácido úrico ($C_5H_4N_4O_3$) y 150 mg. de carbonato de litio (Li_2CO_3) en unos 20 ml. de agua destilada, agitando y calentando si es necesario. Enfriar, luego agregar 4 ml. de formol al 40% y 10 ml. de agua destilada, finalmente sin dejar de agitar vertir 7.5 ml. de ácido sulfúrico 2/3N, mezclar bien todo y aforar a 200 ml. con agua destilada. Guardar en refrigeradora y proteger de la luz.

Procedimiento:

- 1) Desproteinización: 1 ml. de suero
7 ml. de AD
1 ml. de H_2SO_4 2/3N
1 ml. de tungstato de sodio
Mezclar y centrifugar por 5 minutos

Colocar en tres tubos lo siguiente:

2)		Blanco	Problema	Patrón
	Sobrenadante del paso 1	-----	5 ml.	-----
	Carbonato de sodio 10 %	1 ml.	1 ml.	1 ml.

Solución de trabajo del reactivo 4	-----	1 ml.	1 ml.
Agua destilada	5 ml.	-----	5 ml.
Patrón	-----	-----	0.05 ml.

- 3) Mezclar bien y dejar en reposo por 12 minutos.
- 4) Leer en absorbancia con filtro rojo ó 620 nm llevando a 0 el fotómetro con el blanco.

Resultados:

$$\text{Ácido úrico mg x 100 ml} = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 10$$

$$\text{Considerando que el factor de calibración} = \frac{10}{\text{Absorb. del patrón}}$$

$$\text{Ácido úrico (mg x 100 ml.)} = \text{Absorbancia de la muestra} \times \text{factor de calibración.}$$

Si las concentraciones son mayores de 15mg x 100ml, diluir el sobrenadante del paso 1 con AD, repetir el procedimiento y multiplicar el resultado obtenido por la dilución realizada.

Nota: si se utiliza orina diluir 1:100 y proceder como suero.

Valores normales: 1.5 – 7 mg x 100 ml. (suero)
250 – 800 mg/24 horas (orina)

C) AMILASA (Método de Caraway)

Fundamento: el substrato de almidón tamponado se incuba con la muestra, produciéndose hidrolisis, la cual se detiene al agregar el reactivo de yodo, que además produce color con el resto de almidón no hidrolizado. La mayor o menor disminución del color comparado con un substrato de control sin muestra representa la actividad de la enzima amilasa.

Reactivos:

- 1) Substrato de almidón tamponado ph 7:
Ácido benzoico 4.3 g.
Fosfato disódico 13.3 g.
Colocar en 250 ml. de AD y hervir.
Disolver 0.2 g. de almidón soluble (Merck, Harleco) en 5 ml. de agua destilada y echar en la solución anterior que se halla hirviendo, dejar por 1 minuto, enfriar y aforar a 500 ml. La solución debe ser transparente, se guarda en refrigeradora, duración 1 año.
- 2) Solución concentrada de yodo
Yodato de potasio (KIO₃) 3.56 g.
Yoduro de potasio 45 g.
Disolver todo en 800 ml. de AD, luego lentamente y moviendo añadir 9ml. de ácido clorhídrico concentrado. Enfriar y aforar a 1 litro, guardar en refrigeración.
Solución diluida de yodo: diluir la solución anterior con AD 1:10 (al décimo) guardar en refrigeradora y renovar cada mes.

- 5) Alcohol metílico puro.
- 6) Patrón de bilirrubina:
 - a) Disolver 20 mg. de bilirrubina de buena calidad con 4 ml. de carbonato de sodio 0.1 molar (decimolar), luego aforar con diluyente de suero a 100 ml.
Diluyente de suero: juntar en un frasco plástico refrigerado unos 200 ml. de suero humano claro sin hemólisis.
 - b) Inmediatamente utilizar esta solución de bilirrubina (concentración 20 mg x 100 ml.), haciendo diluciones con el diluyente de suero de tal forma que se obtengan concentraciones de 1 mg, 5 mg, 10 mg, y 15 mg. y procesarlos como si fueran sueros problemas. Graficar en papel milimetrado las concentraciones versus lecturas en absorbancia.

Procedimiento:

- 1) Colocar en 4 tubos rotulados:

	B.conjugada	Blanco de BC	B. Total	Blanco de BT
- Agua destilada	2.5 ml.	2.5 ml.	---	---
- Alcohol metílico	---	---	2.5 ml.	2.5 ml.
- HCL al 15 por mil	---	0.5 ml.	---	0.5 ml.
- R. de Ehrlich	0.5 ml.	---	0.5 ml.	---
- Suero diluido (1ml + 9 ml de AD)	2 ml.	2 ml.	2 ml.	2 ml.

- 2) B. Conjugada: mezclar bien el contenido de los dos primeros tubos y al minuto leer en absorbancia con filtro verde o a 540 nm, llevando a 0 el fotómetro con el blanco respectivo y finalmente fijarse en la curva realizada en papel milimetrado, a qué concentración corresponde la lectura encontrada.
- 3) B. total: esperar por 10 minutos y leer los dos últimos tubos de igual manera que en el paso 2.
- 4) B. no conjugada (indirecta) = B. total - B. Conjugada.

Nota: Si las concentraciones son mayores de 15 mg. x 100 ml. diluir 0.5 ml. de suero con 9.5 ml. de AD y repetir el procedimiento, multiplicando al final la concentración hallada en la curva por 2.

Valores normales: B. total: 0.3 – 1.2 mg. x 100 ml.

B. conjugada: 0.1 – 0.4 mg. x 100

B. no conjugada: 0.2 – 0.8 mg. x 100

E) Calcio (Método de Clark y Collip)

Fundamento: El calcio del suero es precipitado como oxalato de calcio, que luego se disuelve y se acidifica con ácido sulfúrico, siendo finalmente titulado con permanganato de potasio.

Reactivos:

- 1) Reactivo de oxalato de amonio al 4%: disolver 4 g. de oxalato de amonio en AD hasta completar 100 ml.

- 2) Reactivo de amoníaco al 2%: diluir 2 ml. de amoníaco en AD hasta 100 ml.
- 3) Ácido sulfúrico 1 N: vertir con cuidado 28 ml. de H₂SO₄ en 500 ml. de AD, enfriar y aforar a 1 litro.
- 4) Permanganato de potasio al 0.01 N: (se prepara al momento). Diluir 5 ml. de permanganato de K 0.1 N con AD hasta 50 ml.
Permanganato de K 0.1 N: disolver 3.16 g. de permanganato de K en AD aforando a 1 litro. Guardar en frasco oscuro. Debe titularse en caliente cada mes, con oxalato de sodio 0.1 N (disolver 0.67 g. de oxalato de sodio en 5 ml. de ácido sulfúrico y aforar con AD a 1 litro).

Procedimiento:

- 1) Colocar en un tubo de centrifuga de punta cónica:
 suero, 2 ml.
 agua destilada, 2 ml.
 reactivo de oxalato de amonio 4% por gotas hasta 1 ml., agitando constantemente. Agitar todo y colocar un tapón. Dejar en reposo 40 minutos.
- 2) Centrifugar 10 minutos a 3,000 RPM.
- 3) Decantar muy bien el sobrenadante y añadir 4 ml. de amoníaco al 2%, llevando al fondo del tubo los restos de precipitado de las paredes.
- 4) Resuspender el sedimento, agitar y centrifugar 10 minutos a 3,000 rpm.
- 5) Decantar el sobrenadante y proceder como el paso 3 y 4.
- 6) Decantar al máximo y añadir 2 ml. de ácido sulfúrico 1N, resuspender el sedimento y poner en baño de agua a 70-80°C por 3 minutos.
- 7) Titular en baño caliente con 2 ml. de permanganato de K 0.01 N echando gota a gota y agitando constantemente, el final de la titulación se reconoce cuando un color rosa pálido permanece durante 60 segundos. Anotar la cantidad gastada de permanganato de K.
- 8) Para el blanco colocar en un tubo 2 ml. de ácido sulfúrico 1N, calentar en baño de agua a 70-80°C y titular de igual manera que el paso anterior utilizándose usualmente alrededor de 0.02 ml. de permanganato de K.

Resultados:

$$\text{Calcio (mg x 100 ml)} = (\text{título de la prueba} - \text{título del blanco}) \times 10$$

El factor 10 proviene de la proporcionalidad entre los ml. gastados de permanganato de K y los mg. de calcio presentes en el suero. Estableciéndose que 1 ml. de permanganato de K 0.01 N corresponde a 0.2 mg. de calcio, en 2 ml. de suero utilizado en la prueba, pero en 100 ml. de suero serán 10 mg. de calcio.

Valores normales: 9 – 11 mg. x 100 ml.

F) COLESTEROL TOTAL (Método de Pearson)

Fundamento: el colesterol sérico al ser tratado con ácido acético, ácido paratoluensulfónico, anhídrido acético y ácido sulfúrico, origina un compuesto de color verde, cuya intensidad es proporcional a la concentración de colesterol presente.

Reactivos:

- 1) Ácido acético glacial
- 2) Ácido paratoluensulfónico al 12%: disolver 12 g. de ácido paratoluensulfónico en ácido acético glacial hasta completar 100 ml.
- 3) Anhídrido acético.

- 4) Ácido sulfúrico concentrado.
- 5) Solución patrón de colesterol (200 mg. x 100 ml.): disolver 200 mg. de colesterol puro en ácido acético glacial hasta completar 100 ml.

Procedimiento:

- 1) Colocar en tres tubos:

	Problema	Patrón	Blanco
Suero	0.1 ml.	- . -	- . -
Patrón	- . -	0.1 ml.	- . -
Ácido acético glacial	0.1 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.
Ácido paratoluensulfónico	0.5 ml.	0.5 ml.	0.5 ml.
Anhídrido acético	1.5 ml.	1.5 ml.	1.5 ml.

Al añadir todos estos reactivos **evitar mezclar**.

Dejar enfriar al medio ambiente por 4 minutos.

- 2) Añadir a cada tubo 0.2 ml. de ácido sulfúrico. Mezclar hasta disolver el precipitado.
- 3) Dejar en reposo en la oscuridad por 20 minutos.
- 4) Leer en absorbancia con filtro rojo o a 620 nm llevando a 0 el fotómetro con el blanco.

Resultados:

$$\text{Colesterol mg x 100 ml.} = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 200$$

$$\text{Factor de calibración} = \frac{200}{\text{Abs. del patrón}}$$

$$\text{Colesterol en mg x 100 ml} = \text{Factor} \times \text{Absorbancia del problema}$$

Valores normales: 150 – 250 mg x 100 ml.

G) CREATININA SERICA (Método del ácido pícrico)

Fundamento: la creatinina contenida en una solución desproteinizada del suero del paciente, al reaccionar con el picrato alcalino forma un complejo de color amarillo rojizo proporcional a la cantidad de creatinina presente (Reacción de Jaffe)

Reactivos:

- 1) Tungstato de sodio al 10%: disolver 10 g. de tungstato de sodio en AD hasta completar 100 ml.
- 2) Ácido sulfúrico 2/3 N: añadir 19 ml. de ácido sulfúrico concentrado a un matraz conteniendo 500 ml. de AD, mezclar, enfriar y aforar a 1 litro.
- 3) R. de ácido pícrico: disolver 1.05 g. de ácido pícrico en AD hasta completar 100 ml.

- 4) Hidróxido de sodio al 3%: disolver 3g. de NaOH en AD hasta completar 100 ml., guardar en frasco de polietileno.
- 5) Patrón de creatinina: disolver 150 mg. de creatinina pura y 0.8 ml. de ácido clorhídrico concentrado en agua destilada y aforar a 100 ml. Estable guardado en refrigeración (concentración 150 mg. x 100 ml.).
Patrón diluido: tomar 1 ml. de la solución anterior y aforar con AD hasta 100 ml. Preparar y usar el mismo día (concentración 1.5 mg/100 ml.)

Procedimiento:

- 1) Desproteínizado: colocar en un tubo:
suero, 1 ml.
AD, 1.5 ml.
tungstato de sodio al 10%, 0.5 ml.
Mezclar bien y agregar:
ácido sulfúrico 2/3 N, 1 ml.
Agitar fuertemente y centrifugar a 2000 RPM por 7 minutos.

- 2) Colocar en 3 tubos:

	Problema	Patrón	Blanco
Sobrenadante del paso 1	1.5 ml.	-.-	-.-
Patrón diluido	-.-	0.5 ml.	-.-
Agua destilada	-.-	1 ml.	1.5 ml.
R. de ácido pícrico	0.5 ml.	0.5 ml.	0.5 ml.
R. de OHNa al 3 %	0.5 ml.	0.5 ml.	0.5 ml.

Mezclar y reposar por 20 minutos.

- 3) Leer en absorbancia con filtro verde o a 520 nm llevando el fotómetro a 0 con el blanco.

Resultados:

$$\text{Creatinina} = \frac{\text{Absorbancia del problema} \times 4 \times 1.5 \text{ (Pa)} \times 0.5 \text{ (V)}}{\text{Absorbancia del patrón} \times 1.5}$$

Donde 4/1.5 proviene de que se ha tomado 1.5 ml. de la dilución del suero, al desproteínizarlo. (Pa): es la concentración del patrón diluido (1.5 mg/100 ml.). (V): es el volumen utilizado del patrón diluido (0.5 ml.)

Simplificando tendremos:

$$\text{Creatinina (mg. x 100 ml.)} = \frac{\text{Abs. del problema} \times 2}{\text{Abs. del patrón}}$$

$$\text{O también: Factor de Calibración (FC)} = \frac{2}{\text{Abs. del patrón}}$$

$$\text{Creatinina (mg. x 100 ml.)} = \text{Abs. del problema} \times \text{FC}$$

Si las concentraciones son elevadas debe aumentarse el valor del patrón colocando 1.5 ml. del patrón diluido en el tubo "patrón" sin agregar agua destilada y se realizan los

cálculos respectivos. Si es necesario puede todavía diluirse el desproteínizado, repetir el procedimiento y finalmente el resultado encontrado multiplicar por la dilución.

Valores normales: 0.6 – 1.2 mg. x 100 ml.

H) DEPURACION DE CREATININA

- 1) Indicar al paciente que colecciona orina por 24 horas refrigerándola.
- 2) Tomar una muestra en ayunas para la determinación de creatinina sérica.
- 3) Determinación de creatinina en
- 4) orina.

Procedimiento de creatinina en orina:

- a) Medir el volumen total de orina y mezclar bien.
- b) Tomar un volumen y realizar una dilución 1:100 con AD.
- c) Tomar 1.5 ml. de esta orina diluida y procesarla como si fuera un desproteínizado para creatinina sérica.

Resultados: En este procedimiento la orina está diluida al 1:100 mientras que en el sérico solo 1:4, por lo tanto los cálculos del procedimiento sérico deben ser multiplicados por el factor 25. Entonces tendremos que:

$$\begin{array}{l} \text{Creatinina en orina} = \frac{\text{Abs. del problema}}{\text{Abs. del patrón}} \times 2 \times 25 \\ (\text{mg. x 100 ml.}) \end{array}$$

5) Cálculos:

O = creatinina en orina en mg. x 100 ml.

S = creatinina sérica en mg. x 100 ml.

V = Volumen de orina en ml. x minuto (nota: 24 horas = 1,440 minutos)

$$\begin{array}{l} \text{Depuración de creatinina} = \frac{O \times V}{S} \\ \text{en ml. x minuto} \end{array}$$

Valores normales: 85 – 125 ml. /minuto.

I) FOSFORO INORGANICO

Fundamento: El fosfato inorgánico, del suero desproteínizado con ácido tricloroacético, se combina con molibdato de amonio para formar molibdofosfato de amonio, el cual es reducido por el clorhidrato de p-fenilenediamina para formar azul de molibdeno, siendo la intensidad del color proporcional a la concentración del fosfato.

Reactivos:

- 1) Molibdato ácido: verter 30 ml. de ácido sulfúrico concentrado sobre 50 ml. de AD, enfriar y disolver 5 g. de molibdato de amonio, completando finalmente a 100 ml. con AD.
- 2) Ácido tricloroacético (TCA) al 30 %: disolver 75 g. de TCA sólido con 200 ml. de AD y luego aforar a 250 ml.
- 3) Reactivo de molibdato ácido – TCA: mezclar tres volúmenes del reactivo 1 con dos volúmenes del reactivo 2 y cuatro volúmenes de agua destilada.
- 4) Reactivo reductor: disolver 0.5 g. de p-fenilenediamina y 5 g. de bisulfito de sodio en agua destilada hasta completar 100 ml.

- 5) Patrón de fósforo (5 mg. x 100 ml.): disolver 0.2197 g. de fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄) anhidro en AD, hasta completar 1 litro, agregar algo de cloroformo para preservar.

Procedimiento:

- 1) Colocar en tres tubos:

	Problema	Patrón	Blanco
Suero	0.2 ml.	-.-	-.-
Patrón	-.-	0.2 ml.	-.-
A.D.	-.-	-.-	0.2 ml.
R. de molibdato ácido – TCA	1.8 ml.	1.8 ml.	1.8 ml.

Mezclar bien y dejar en reposo por 5 minutos y luego centrifugar a 2,000 RPM por 5 minutos.

- 2) En otros tres tubos colocar:

	Problema	Patrón	Blanco
Sobrenadante respectivo	1 ml.	1 ml.	1 ml.
React. reductor	4 ml.	4 ml.	4 ml.

Mezclar bien y dejar en reposo 20 minutos.

- 3) Leer en absorbancia con filtro rojo o a 690 nm, llevando el fotómetro a 0 con el blanco.

Resultados:

$$\text{Fósforo inorgánico} = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 5$$

(mg. x 100 ml.)

Valores normales: 2.5 a 4.8 mg. x 100 ml.

J) FOSFATASA ACIDA TOTAL Y PROSTATICA (Método de p-nitrofenilfosfato)

Fundamento: La enzima fosfatasa ácida al actuar sobre el sustrato de p-nitrofenilfosfato origina ácido fosfórico y p-nitrofenol, la reacción se interrumpe al agregar hidróxido de sodio y el p-nitrofenol liberado se transforma en anión de color amarillo de intensidad proporcional a la actividad de la enzima presente. La fosfatasa ácida prostática característicamente es inhibida por el tartrato, las diferencias de las determinaciones de fosfatasa sin tartrato y con él, nos indica la actividad de la fosfatasa ácida prostática.

Reactivos:

Debido a la delicada preparación de los reactivos y la pobre estabilidad del sustrato en la práctica particular es más conveniente adquirir en el comercio "sets" (conjunto de reactivos y patrón estabilizados) de óptima calidad. En nuestro medio, entre otros proveedores, tenemos las casa Merck, Boehringer-Mannheim, Harleco, etc. Recomendamos seguir las instrucciones del fabricante.

- 1) Amortiguador de citrato: 50 mmol/l a pH 4.8, estable 1 año a 2-8°C

- 2) Substrato-amortiguador: el substrato es el p-nitrofenilfosfato que se provee en tabletas, que al disolverse con el amortiguador, presenta una concentración de 5.5 mmol/l. y se conserva 1 semana a 2-8°C
- 3) Reactivo de tartrato de sodio 200 mmol/l. Estable 1 año a 2-8°C
- 4) Hidróxido de sodio 0.02 N
- 5) Patrón: solución de p-nitrofenol. Se diluye en varios tubos con hidróxido de sodio 0.02 N y las diferentes intensidades de color observados, corresponden a determinada actividad enzimática especificada por la casa proveedora. Se leen los tubos en absorbancia con filtro entre 390-420 llevando el fotómetro a 0 con el blanco de hidróxido de sodio 0.02 N: Finalmente se grafica una curva patrón de absorbancia versus actividad enzimática.

Procedimiento:

Usualmente se efectúan los siguientes pasos, con algunas variantes según la casa proveedora.

- 1) Colocar en tres tubos:

	Problema (F.Ac.total)	Problema (inhibición por tartrato)	Blanco
Sustrato amortiguador	1 ml.	1 ml.	1 ml.
Dejar en baño de agua a 37°C por 5 minutos y agregar:			
Suero fresco	0.2 ml.	0.2 ml.	.-
R. de tartrato	.-	0.1 ml.	.-
Mezclar y continuar en baño de agua a 37°C por 30 minutos. Retirar del baño y agregar:			
Hidróxido de sodio 0.02 N	10 ml.	10 ml.	10 ml.
suero	.-	.-	0.2 ml.

- 2) Mezclar bien y leer en absorbancia con filtro entre 390-420 llevando el fotómetro a 0 con el blanco.

Resultados:

- Fosfatasa ácida total en U/1 = leer absorbancia del problema en la curva patrón para determinar a qué actividad enzimática corresponde.
- Fosfatasa ácida prostática en U/1 = Absorbancia del problema (F. ácida total) – Absorbancia del problema (con inhibición por tartrato) recién esta diferencia se lee en la curva patrón para determinar la actividad enzimática correspondiente.

Valores normales: Fosfatasa ácida total = 2.5 – 11 U/1

Fosfatasa ácida prostática = hasta 3.5 U/1

K) FOSFATASA ALCALINA (Met. p-nitrofenilfosfato)

Fundamento: Se utiliza un sustrato de p-nitrofenilfosfato que por acción de la enzima fosfatasa alcalina origina el p-nitrofenil, el que presenta un color amarillento, cuya intensidad es proporcional a la actividad de la enzima.

Reactivos:

Debido a la delicada preparación del amortiguador y la pobre estabilidad del sustrato en la práctica particular es preferible utilizar “sets” (conjunto de reactivos y patrón estabilizados) de reconocida calidad que se expenden en el comercio; en nuestro medio tenemos entre otros, de las casas Merck, Boehringer-Mannheim, etc. Seguir las indicaciones del fabricante.

- 1) Amortiguador de glicina e hidróxido de sodio 50 mmol/l pH 10.5 Cloruro de magnesio 0.5 mM. Estable un año en refrigeración.
- 2) Sustrato-amortiguador: el sustrato es el p-nitrofenilfosfato que se provee en tabletas para disolverse en el amortiguador, obteniéndose concentración de 5.5 mmol/l. Estable una semana en refrigeración.
- 3) Hidróxido de sodio 0.02 N.
- 4) Patrón: Solución de p-nitrofenol. Se realizan diluciones con NaOH 0.02 N, obteniéndose diferentes intensidades de color que corresponden a determinada actividad enzimática indicada por la casa proveedora. Se lee en absorbancia con filtro entre 390-420, llevando a 0 el fotómetro con OHNa 0.02 N y graficar una curva de absorbancia versus actividad enzimática.

Procedimiento

- 1) Colocar en dos tubos

	Problema	Blanco
Substrato-amortiguador	1 ml.	1 ml.
Dejar en baño de agua a 37°C por 5 minutos		
Suero	0.1 ml.	.-
Mezclar y continuar en el baño de agua a 37°C por 30 minutos		
Hidróxido de sodio 0.02N	10 ml.	10 ml.
Suero	.-	0.1 ml.

- 2) Mezclar bien y leer en absorbancia con filtro entre 390-420, llevando a 0 el fotómetro con el blanco.

Resultados:

Fosfatasa alcalina en U/1 = leer la absorbancia del problema en la curva patrón para determinar qué actividad enzimática corresponde.

Valores normales: 15 – 70 U/1.

L) GLUCOSA (Met. de O – Toluidina)

Fundamento: El grupo aldehído de la glucosa reacciona con la amina aromática o-toluidina en solución ácida y en presencia de calor, para formar una mezcla en equilibrio de glucosilamina y su correspondiente base de Schiff. La intensidad del color verde obtenido, es proporcional a la concentración de glucosa.

Reactivos:

- 1) R. de orto – toluidina (o-toluidina): disolver 1.5 g. de thiourea en 900 ml. de ácido acético glacial, añadir 60 ml. de o-toluidina de buen grado (Merck, Sigma, etc.) y diluir a 1,000 ml. con ácido acético.
- 2) Patrón de glucosa: Patrón concentrado (1000 mg/100 ml): disolver 1g. de glucosa pura en solución de ácido benzoico al 1.4 por mil diluyendo hasta 100 ml.. Estable en refrigeración.
Patrón diluido o de trabajo (100 mg/100 ml): diluir 10 ml. del patrón concentrado con solución de ácido benzoico al 1.4 por mil hasta 100 ml.
Solución de ácido benzoico al 1.4 por mil: disolver 1.4 g. de ácido benzoico en agua destilada diluyendo a un litro, calentar si es necesario.

Procedimiento:

- 1) Colocar en tres tubos:

	Problema	Patrón	Blanco
React. o-toluidina	3 ml.	3 ml.	3 ml.
Patrón de trabajo	.-	0.05 ml.	.-
Suero	0.05 ml.	.-	.-

Mezclar bien y colocar en baño de agua hirviendo por 10 minutos exactos

- 2) Sacar los tubos del baño de agua y colocarlos en agua fría por 8 minutos.
- 3) Leer en absorbancia con filtro rojo o 630 nm llevando a 0 el fotómetro con el blanco.

Resultados:

$$\text{Glucosa (mg x 100 ml)} = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 100$$

Valores normales: 70 – 110 mg. x 100 ml.

M) PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA

Fundamento: Esta prueba permite establecer la respuesta insulínica del paciente frente a una ingesta exagerada de glucosa.

Preparación del paciente:

- 1) Durante 3 días antes de la prueba debe haber ingerido una dieta balanceada con no menos de 150 g. de carbohidratos por día.
- 2) En lo posible no debe padecer infecciones o traumatismos.
- 3) Suspender toda medicación varios días antes de la prueba, principalmente: tiazidas, anticonceptivos orales, salicatos, difenilhidantoina y esteroides.
- 4) El día de la prueba debe estar en ayunas por lo menos 8 horas con un máximo de 16 horas.

Procedimiento:

- 1) Obtener una muestra de sangre venosa en ayunas, para la glucosa basal (0 horas).

- 2) Administrar al paciente por vía oral glucosa a razón de 1 g. por kilo de peso, disuelta en 300 ml. de agua, que deben ser ingeridos en 5 minutos y empezar a contabilizar el tiempo.
- 3) Obtener muestras de sangre a la hora, dos horas y tres horas a partir de paso 2.
- 4) Después de obtener cada muestra, separar los sueros y pueden refrigerarse hasta el final de la prueba para realizar las determinaciones de glucosa.

Valores normales:

- 1) Según Wilkerson: los límites máximos con sus respectivas puntuaciones son:

	Glicemia	Puntos
Basal (0 horas)	130 mg.	1
1 hora	190	½
2 horas	140	½
3 horas	130	1

Se considera una respuesta normal, si al sumar los puntos no exceden de dos.

- 2) Según la UGDP (University Group Diabetes Project), la suma de las concentraciones de glucosa basal, a la hora, dos horas y tres horas no debe sobrepasar los 600 mg/100 ml.

N) LIPIDOS TOTALES

Fundamento: Los lípidos contenidos en el suero, al ser calentados con ácido sulfúrico son oxidados a cetonas que al reaccionar con el reactivo de ácido fosfórico-vainillina producen un color rosado, de intensidad proporcional a la cantidad de lípidos presentes.

Reactivos:

- 1) R. fosfo-vainillina: disolver 0.60 g. de vainillina en 100 ml. de AD y añadir moviendo 343.5 ml. de ácido fosfórico 85%, enfriar y diluir a 500 ml. con AD. Guardar en refrigeración.
- 2) Patrón (1000 mg x 100 ml): disolver 1 g. de aceite de oliva en alcohol etílico hasta 100 ml. Bien cerrado permanece estable a temperatura ambiente.
- 3) Ácido sulfúrico concentrado.

Procedimiento:

- 1) Colocar en dos tubos con tapa:

	Problema	Patrón
Suero	0.05 ml.	.-
Patrón	.-	0.05 ml.
Ácido sulfúrico	2 ml.	2 ml.

Mezclar bien y colocar los tubos tapados en baño de agua hirviendo por 10 minutos.

- 2) Enfriar por 5 minutos y en tres tubos colocar:

	Problema	Patrón	Blanco
Mezcla del paso No. 1	0.2 ml.	0.2 ml.	.-
Ácido sulfúrico	.-	.-	0.1 ml.
R.fosfo-vainillina	4 ml.	4 ml.	4 ml.

Mezclar bien y colocar en baño de agua a 37°C por 15 minutos.

- 3) Dejar en reposo por 10 minutos.
 4) Leer en absorbancia con filtro verde entre 500-550 nm llevando a 0 el fotómetro con el blanco.

Resultados:

$$\text{Lípidos totales} = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 1000$$

(mg x 100 ml)

Valores normales: 400-1000 mg. x 100 ml.

Ñ) PROTEINAS TOTALES Y ALBUMINA

PROTEINAS TOTALES:

Fundamento: las proteínas reaccionan en medio alcalino con los iones cobre para originar un complejo de color violeta cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas presentes.

Reactivos:

- 1) R. de Biuret: disolver 3 g. de sulfato de cobre hidratado ($\text{CuSo}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 500 ml. de AD fresca, añadir 9 g. de tartrato doble de sodio y potasio y 5 g. de yoduro de potasio. Cuando todo está disuelto recién añadir 100 ml. de hidróxido de sodio 6 moles/l, diluyendo finalmente todo a 1 litro con AD. Guardar en frasco de polietileno bien tapado.
 Hidroxido de sodio 6 moles/L: disolver 240 g. de OHNa en agua destilada fresca hasta completar 1 litro. Guardar en frasco de polietileno.
- 2) Patrón: en el comercio se expenden sueros de concentración conocida en g/100 ml. o puede prepararse un patrón mezclando sueros normales y determinando las proteínas por el método de Kjeldahl.

Procedimiento:

- 1) Colocar en tres tubos:

	Problema	Patrón	Blanco
Suero	0.1 ml.	.-	.-
Patrón	.-	0.1 ml.	.-
A. destilada	.-	.-	0.1 ml.
R. de Biuret	5 ml.	5 ml.	5 ml.

Mezclar y dejar en reposo por 30 minutos.

- 2) Leer con filtro verde o a 540 nm llevando a 0 el fotómetro con el blanco.

Resultados:

$$\text{Proteínas totales} = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times \text{Concentración del patrón}$$

(g x 100 ml)

Valores normales: 6 – 8 g. x 100 ml.

ALBUMINA:

Fundamento: la albúmina sérica reacciona con el colorante verde de bromocresol en solución tamponada originando variaciones del color cuya intensidad es proporcional a la concentración de albúmina.

Reactivos:

- 1) R. de verde de bromocresol: se disuelve 8.8 g. de ácido succínico en unos 200 ml. de AD, se agrega 85 mg. de verde de bromocresol disuelto previamente en 5 ml. de hidróxido de sodio 0.4% y diluir a 800 ml. con AD. Luego añadir hidróxido de sodio al 4% hasta lograr un pH de 4.2 (generalmente se utilizan unos 40 ml.), entonces recién se completa todo a un litro con AD y se mezcla bien. Conservar en refrigeradora.
- 2) Cloruro de sodio al 9 x 1000 (solución salina fisiológica): disolver 9 g. de Cl. de Na en AD hasta completar 1 litro.
- 3) Patrón: en el comercio pueden obtenerse sueros de concentración conocida o pueden prepararse con albúmina humana o bobina.

Procedimiento:

- 1) Colocar en un tubo para blanco 4 ml. del R. de verde de bromocresol y añadir 1 ml. de ClNa al 9 por mil (color estable)

- 2) Colocar en dos tubos:

	Problema	Patrón
Cloruro de sodio 9 x 1000	1 ml.	1 ml.
Suero o patrón	0.02 ml.	0.02 ml.

Mezclar bien.

- 3) Utilizar filtro rojo o 630 nm de longitud de onda y llevar el fotómetro a 0 con el blanco del paso 1.
- 4) Rápidamente agregar por separado a los tubos problema y patrón 4 ml. del reactivo de verde de bromocresol, mezclar bien y leer en el fotómetro a los 30 segundos exactos.

Resultados:

$$\text{Albúmina} = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times \text{Concentración del patrón}$$

(g x 100 ml)

Valores normales: 4.5 – 5 g x 100 ml.

O) TRIGLICERIDOS (Met. de Soloni modificado)

Fundamento: los triglicéridos (T.G.) son extraídos del suero por partición, luego hidrolizados con calor en medio alcalino, liberándose glicerol, el cual por acción del ácido peryódico es oxidado a formol, que al reaccionar con el amonio y la acetilacetona resulta en un compuesto de color amarillo (diacetilhidrolutidina) de intensidad proporcional a la concentración de triglicéridos presentes.

Reactivos:

- 1) N-nonano
- 2) Isopropanol
- 3) R. de ácido sulfúrico: diluir 2.13 ml. de ácido sulfúrico concentrado hasta 1 litro con AD.
- 4) Metilato de sodio: disolver 50 mg. de metilato de sodio en isopropanol hasta 100 ml. Prepararse de acuerdo a lo que se necesita, debe estar fresco.
- 5) R. de metaperyodato de sodio: disolver 0.53 g. de metaperyodato de sodio (NaIO_4) en ácido acético al 5.8% diluyendo hasta 100 ml.
- 6) R. de acetilacetona: mezclar 0.75 ml. de acetilacetona y 2.5 ml. de isopropanol con acetato de amonio al 15.4% diluyendo hasta 100 ml. Guardar en refrigeración, en frasco oscuro. Estable un mes.
- 7) Patrón de 300 mg. x 100 ml.: disolver 300 mg. de trioleina en isopropanol hasta completar 100 ml. Estable en refrigeración.

Procedimiento:

- 1) Colocar en tres tubos de 16 x 150 mm. con tapa, lo siguiente:

	Problema	Patrón	Blanco
Suero	0.5 ml.	-. -	-. -
Patrón	-. -	0.5 ml.	-. -
Agua destilada	-. -	0.5 ml.	0.5 ml.
n-nonano	2 ml.	2 ml.	2 ml.
Isopropanol	3.5 ml.	3 ml.	3.5 ml.
R. ácido sulfúrico	1 ml.	1 ml.	1 ml.

Mezclar bien los tubos por 30 segs. y dejar que el líquido se separe en estratos.

- 2) En otros tres tubos colocar lo siguiente:

	Problema	Patrón	Blanco
Estrato superior	0.2 ml.	0.2 ml.	0.2 ml.
R. de metilato de sodio	3 ml.	3 ml.	3 ml.

Incubar a 60°C por 15 minutos.

- 3) Agregar:

R. de metaperyodato	0.2 ml.	0.2 ml.	0.2 ml.
---------------------	---------	---------	---------

Mezclar bien.

- 4) R. de acetilacetona

	1 ml.	1 ml.	1 ml.
--	-------	-------	-------

Mezclar bien e incubar a 60°C por 15 minutos.

- 5) Enfriar y centrifugar a 2500 RPM por 5 minutos.

- 6) Utilizar el estrato superior para leer el fotómetro con filtro azul ó a 410 nm, llevando a 0 el instrumento con el blanco.

Resultados:

$$\text{Triglicéridos (mg x 100 ml)} = \frac{\text{Absorbancia del problema} \times 300}{\text{Absorbancia del patrón}}$$

Valores normales: 40 – 145 mg. x 100 ml.

P) TRANSAMINASAS (AMINOTRANSFERASAS)

TRANSAMINAS GLUTAMICO OXALACETICA (TGO) ó ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST)

Fundamento: La TGO cataliza la transferencia del grupo amino del ácido aspártico al grupo ceto del ácido alfa cetoglutarico, produciéndose finalmente ácido glutámico y ácido oxalacético el cual es inestable y se transforma parcialmente en piruvato el cual reacciona con el 2-4 dinitrofenilhidracina que en medio alcalino produce un compuesto de color marrón de intensidad proporcional a la actividad de TGO.

Reactivos:

Debido a la delicada preparación y preservación del substrato y del amortiguador, en la práctica no es conveniente prepararlos, pudiendo adquirirse en el comercio conjuntos de reactivos preparados (sets) de óptima calidad, de las casas DADE, Merck, Wiener, etc. Seguir las instrucciones del fabricante.

Se utilizan los siguientes reactivos:

- 1) Substrato-amortiguador de fosfato (pH 7.4), 1-aspartato y alfa cetoglutarato.
- 2) Reactivo de color: 2-4 dinitrofenilhidracina.
- 3) Hidróxido de sodio 0.4 N: disolver 16 g. de hidróxido de sodio en AD diluyendo hasta 1 litro.
- 4) Patrón: piruvato sódico.

Curva Patrón: en varios tubos se realizan diluciones del patrón con el substrato luego se agrega reactivo de color y finalmente hidróxido de sodio 0.4 N, produciéndose color, cuya intensidad corresponde a determinada actividad enzimática indicada por cada fabricante. Se lee con filtro verde o a 505 nm llevando a 0 el fotómetro con agua destilada, graficándose una curva de absorbancia versus actividad enzimática.

Procedimiento:

Usualmente se realizan los siguientes pasos con ciertas variaciones de acuerdo a la casa proveedora.

- | | |
|---|-----------------|
| 1) En un tubo colocar: | Problema |
| Substrato | 0.5 ml. |
| Incubar en baño de agua a 37°C por 5 minutos. | |
| 2) Agregar suero | 0.1 ml. |
| Mezclar y seguir incubando a 37°C por 60 minutos. | |
| 3) Añadir R. de color | 0.5 ml. |
| Mezclar bien y dejar en reposo a temperatura ambiente por 20 minutos. | |

- 4) Añadir hidróxido de sodio 0.4 N 5 ml.
Mezclar bien y dejar en reposo por 5 minutos.
- 5) Leer con filtro verde o a 505 nm llevando a 0 el fotómetro con agua destilada. Si las lecturas son muy altas debe diluirse el suero 1:10 con agua destilada, repetir el procedimiento y multiplicar el resultado por 10.

Resultados:

Leer la absorbancia del problema en la curva patrón para determinar a qué actividad enzimática corresponde, expresándose en u/l ó unidades Karmen/ml.

Valores normales: hasta 19 U/l, ó hasta 40 unidades Karmen/ml.

TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA (TGP) ó ALANINA AMINO TRASFERASA (ALT)

Fundamento: La TGP cataliza la transferencia del grupo amino de alanina al grupo ceto del ácido alfa cetoglutarico, produciéndose finalmente ácido glutámico y ácido pirúvico, este último reacciona con la 2-4 dinitrofenilhidracina y en medio alcalino produce un compuesto de color marrón proporcional a la actividad de la TGP.

Reactivos:

Debido a la preparación y preservación del sustrato y del amortiguador en la práctica no es conveniente prepararlos, pudiendo adquirirse en el comercio conjuntos de reactivos de óptima calidad, de las casas DADE, Merck, Wiener, etc. Seguir las indicaciones del fabricante.

Se utilizan los siguientes reactivos:

- 1) Sustrato: amortiguador de fosfato pH: 7.4, D, L. Alanina y alfa cetoglutarato.
- 2) Reactivo de color: 2-4 dinitrofenilhidracina.
- 3) Hidróxido de sodio 0.4 N: disolver 16 g. de hidróxido de sodio en AD hasta completar 1 litro.
- 4) Patrón: piruvato sódico.

Curva patrón: En varios tubos se realizan diluciones del patrón con el sustrato, luego se agrega reactivo de color y finalmente OHNa 0.4 N, produciéndose color cuya intensidad corresponde a determinada actividad enzimática, indicada por el fabricante. Se lee con filtro verde o a 505 nm, llevando a 0 el fotómetro con agua destilada, graficar en una curva absorbancia versus actividad enzimática.

Procedimiento:

Usualmente se realizan los siguientes pasos, con ciertas variaciones de acuerdo al fabricante:

- | | |
|--|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1) En un tubo colocar:
Sustrato
Dejar en baño de agua a 37°C por 5 minutos 2) Añadir suero
Mezclar bien y continuar la incubación a 37°C por 30 minutos 3) Agregar reactivo de color
Mezclar bien y dejar en reposo por 20 minutos a temperatura ambiente. 4) Añadir OHNa 0.4 N
Mezclar bien y dejar en reposo por 5 minutos para leer. | <p>Problema
0.5 ml.</p> <p>0.1 ml.</p> <p>0.5 ml.</p> <p>5 ml.</p> |
|--|---|

- 5) Leer con filtro verde o a 505 nm llevando a 0 el fotómetro con agua destilada.
Si las lecturas son muy altas, debe diluirse el suero 1:10 con agua destilada, repetir el procedimiento y multiplicar el resultado por 10.

Resultados:

Leer la absorbancia del problema en la curva patrón para determinar a qué actividad enzimática corresponde, expresándose en U/l o unidades Karmen/ml.

Valores normales: hasta 17 U/l ó Hasta 36 unidades Karmen/ml

Q) UREA (Método de la diacetilmonoxima)

Fundamento: el diacetyl en medio ácido y caliente, reacciona con la úrea para producir un compuesto coloreado que es intensificado por la presencia de tiosemicarbazida, el color rojo así producido es proporcional a la concentración de úrea presente en la muestra.

Reactivos:

- 1) R. de diacetilmonoxima: disolver 1 g. de diacetilmonoxima, 0.2 g. de tiosemicarbazida y 9 g. de cloruro de sodio, en agua destilada hasta completar 1 litro. Guardar en refrigeración.
- 2) R. de ácido: en un matraz conteniendo 800 ml, de AD, añadir con cuidado 60 ml. de ácido sulfúrico concentrado y 10 ml. de ácido ortofosfórico 85%, luego agregar 0.1 g. de cloruro férrico; diluyendo finalmente con AD a 1 litro. Guardar en refrigeración.
- 3) Patrón: disolver 643 mg. de úrea pura anhidra en AD hasta 500 ml. (concentración: 129 mg. de úrea/100 ml.) Diluir 100 ml. de esta solución hasta 300 ml. con AD, por lo tanto la nueva concentración será de 43 mg/100 ml. Agregar gotas de cloroformo, guardar en frasco bien tapado y refrigerar.

Procedimiento:

- 1) Colocar en tres tubos:

	Problema	Patrón	Blanco
R. diacetilmonoxima	3 ml.	3 ml.	3 ml.
R. ácido	3 ml.	3 ml.	3 ml.
Suero	0.05 ml.	-.-	-.-
Patrón de 43 mg/100 ml.	-.-	0.05 ml.	-.-

- 2) Mezclar y colocar los tubos en baño de agua hirviendo por 15 minutos.
- 3) Enfriar por 5 minutos y leer con filtro verde o a 520 nm llevando a 0 el fotómetro con el blanco.

Resultados:

$$\text{Urea (mg x 100)} = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 43$$

Si la concentración de úrea sobrepasa los 120 mg. diluir el suero 1:10 con agua destilada y repetir el procedimiento utilizando el patrón de 129 mg. x 100 ml. de concentración y el resultado obtenido multiplicar por 10.

Valores normales: 20 – 40 mg. x 100 ml.

R) EXAMEN DE FLUIDOS BIOLÓGICOS

Examen del Líquido Seminal (Espermatograma)

Colección de la Muestra: Se necesitan 3 días de abstinencia sexual y el espécimen debe ser obtenido por masturbación, en un frasco estéril. Anotar la hora de la eyaculación.

Volumen: Se mide en probeta calibrada, usualmente es de 2 ml. ó más.

pH: varía de 7.2 – 7.8 .

Consistencia: con una varilla de vidrio se mide la filancia, 2cm se considera normal.

Liquefacción: El semen recién emitido es viscoso pero en 60 minutos ocurre liquefacción.

Movilidad: Colocar 1 gota de semen sobre una lámina y cubrir con una laminilla, y contar los espermatozoides inmóviles y móviles, considerándose como móviles los que tienen movimiento activo y hacia adelante (progresiva y anterógrada). Examinar a la hora, el 50% deben ser móviles.

Morfología: Preparar frotices ovalados como los que usan en bacteriología y fijarlos con alcohol etílico 95%, colorear con Hematoxilina-Eosina, Papanicolaou o Eosina. Contar varios cientos de espermatozoides con lente de inmersión para reportar el porcentaje de células normales. Usualmente 15% deben ser de morfología adecuada. Las anomalías incluyen: formas juveniles con residuos citoplasmáticos, deformidades en la cabeza, formas dobles, etc.

Leucocitos: < de 1×10^6 /ml

Recuento:

Equipos y reactivos:

- 1) Cámara Neubauer
- 2) Pipeta de glóbulos blancos
- 3) Diluyente: Bicarbonato de sodio 5 g.
Formol al 40% (puro) 1 ml.
Agua destilada csp 100 ml.

Procedimiento:

- 1) Con la pipeta de glóbulos blancos aspirar semen hasta la marca 0.5
- 2) Aspirar el diluyente hasta la marca 11 (dilución 1:20).
- 3) Agitar la pipeta por 2 minutos.
- 4) Descartar las 3 primeras gotas, y cargar una cámara de Neubauer.
- 5) Realizar el recuento en dos cuadrados grandes (los de 1 mm^2 de área).

Resultados:

No. de Espermatoz. = $\frac{\text{Espermatoz. contados en 2 cuadrados grandes}}{\text{Area contada x altura de la cámara x dilución}} \times 1000$
por ml. (Para convertir mm³ a ml.)

$$= \frac{\text{Espermatozoides contados} \times 1000}{2 \times 1/10 \times 1/20}$$

No. de Espermatozoides x ml. = Espermatozoides contados x 100,000

Valores Normales: 20 millones ó mas xml

Líquido Cefalorraquídeo (LCR)

Colección de la Muestra: Tomar en 3 tubos, cada uno con 2-4 ml. de LCR. El tubo 1, si está contaminado con sangre, puede descartarse; el 2 se usa para todas las pruebas requeridas y el 3 para cultivo.

Examen físico:

Color: normalmente es incoloro.

Sangre: La presencia de igual cantidad de hematíes en los 3 tubos y la existencia de hematíes crenados (crenocitos) indica que la sangre es proveniente de una hemorragia y que no es producto de una punción traumática.

Coágulo y película: El coágulo indica la presencia de fibrinógeno. La película está constituida por leucocitos y material fibrinoso, debe ser examinada por coloraciones de gram, Ziehl Neelsen, y cultivarla.

Examen Bioquímico:

Glucosa: La determinación se realiza como si fuera en sangre (ver pág. 36). Se recomienda tomar también una muestra de sangre, ya que normalmente la concentración en LCR varía entre 50-80% respecto al nivel de glucosa sanguínea.

Proteínas

Reactivos:

- 1) Ácido tricloroacético (TCA) al 12.5%; disolver 12.5 g. de TCA en agua destilada y completar a 100 ml.
- 2) Cloruro de sodio al 0.9% (suero fisiológico).
- 3) Patrón: Con un suero de concentración proteica conocido, ej. 6 g/100 ml. hacer una dilución con suero fisiológico, ej. 1:200 para obtener una concentración de 30 mg./100 ml. que servirá de solución patrón.

Procedimiento:

- 1) Colocar en 2 tubos

	Problema	Patrón
Patrón	-.-	4 ml.

LCR (centrifugado)	1 ml.	-.-
CINa 0.9%	3 ml.	-.-
Ácido TCA 12.5%	1 ml.	1 ml.

- 2) Mezclar bien y esperar 8 minutos.
- 3) Leer en absorbancia con filtro azul o a 420 nm, llevando a 0 el fotómetro con agua destilada.

Resultados:

Proteínas en = $\frac{\text{absorbancia del problema}}{\text{absorbancia del patrón}} \times 30 \times 4$ (dilución de la muestra)

mg/100 ml

Valores Normales: 15-45 mg./100 ml.

Examen citológico

Recuento celular:

Equipos y reactivos

- 1) Hemocitómetro (Cámara de Neubauer)
- 2) Pipeta de glóbulos blancos
- 3) Diluyente:
 - Cristal violeta 0.2 g.
 - Ácido acético 10 ml.
 - Agua destilada 100 ml.

Procedimiento:

- 1) Con la pipeta de glóbulos blancos tomar LCR previamente mezclado hasta la marca de 1.
- 2) Tomar el diluyente hasta la marca de 11 (dilución 1:10).
- 3) Mezclar bien.
- 4) Descartar algunas gotas y cargar ambos lados de la cámara de Neubauer. Reposar por 5 minutos.
- 5) Realizar el recuento en los 5 cuadros grandes (cuatro angulares y una central) de cada lado de la cámara; en total se cuentan 10 cuadrados.

Resultado:

No. de Células = $\frac{\text{Células contados en 10 cuadrados grandes}}{10 \times 1/10 \times 1/10}$

por mm³ Area contada x altura de la cámara x dilución del LCR

= $\frac{\text{Células contadas}}{10 \times 1/10 \times 1/10}$

No. de Células x mm³ = Células contadas x 10

Valores Normales: 0-5 células mononucleares x mm³.

Fórmula diferencial: Centrifugar el LCR, con el sedimento realizar una extensión en lámina, luego colorear con Wright y con lente de inmersión proceder a la identificación de las células, que deben reportarse porcentualmente ej.: 20% de linfocitos, 10% de eosinófilos, 70% de neutrófilos (polimorfonucleares). También se anotará la presencia de células neoplásicas, macrófagos ó células del tejido nervioso.

Examen Microbiológico: Con el sedimento deben hacerse coloraciones de gram, Ziehl Neelsen, tinta china (criptococo) y además realizarse los respectivos cultivos.

Líquidos Pleurales, Pericárdicos y Peritoneales

Colección de la Muestra: Debe tomarse unos 20 ml. de líquido y colocarlo en un frasco con gotas de heparina estéril ó 2 ml. de citrato de sodio al 4% y una pequeña cantidad en tubo seco para observar la presencia de coágulo.

Examen físico:

Color y transparencia: Normalmente amarillento y claro.

Gravedad específica: Se utiliza un hidrómetro, refleja la concentración proteica. Normalmente menor de 1.016.

Coágulo: Indica presencia de fibrinógeno, que sólo se encuentra cuando el daño mesotelial es severo.

Examen Bioquímico:

Proteínas: El líquido se centrifuga y el sobrenadante se procesa como suero (ver determinación de Proteínas totales pág. No. 39)

Glucosa: Se utiliza el sobrenadante y se procesa como suero (ver glucosa pág. No. 36).

Deshidrogenasa Láctica (DHL): Debe realizarse determinaciones en el suero y en el líquido, por los métodos usuales utilizados para sangre. En procesos inflamatorios y derrames por neoplasias la DHL se eleva marcadamente, mientras que en los transudados la elevación es menor.

Examen Citológico

Recuento Celular: Si son pocas células, mezclar bien, cargar ambos lados de una cámara de Neubauer y contar 10 cuadrados grandes (de 0.1 mm³), resultando el número de células por mm³. Cuando existan muchas células diluir al 1:10, 0.9 de diluyente con 0.1 de muestra y el resultado se multiplica por 10 .

Fórmula Diferencial: Centrifugar el líquido y con el sedimento realizar una extensión, se deja secar, y luego se colorea con Wright. Después proceder al contaje diferencial como en Líquido Cefalorraquídeo.

Examen Microbiológico: Realizar con el sedimento coloraciones de gram, Ziehl Neelsen y también cultivar.

CAPITULO IV

HEMATOLOGIA

A) COLECCIÓN DE LA MUESTRA Y COLORACIONES

Generalidades:

- 1) Se obtiene sangre por punción venosa (ver pág. 25) o por punción del pulpejo del dedo (sangre capilar) con lanceta estéril.
- 2) Colocar una gota pequeña en una lámina portaobjetos para realizar un frotis.
- 3) Extraer la aguja de la jeringa y retirar la sangre en un frasquito o tubo con el respectivo anticoagulante, de acuerdo al examen que se practicará.
- 4) Mezclar bien los frasquitos sin producir espuma, con movimientos circulares y los tubos por inversión.

Procedimiento para el frotis:

- 1) Preparar una lámina, cuyo ancho se ha reducido unos 5 mm. y que servirá como "extendedora".
- 2) Colocar a 1 cm. del extremo de una lámina bien limpia y seca, una gota de sangre, directamente de la aguja, jeringa o del dedo; por delante de ella colocar un extremo de la lámina extendedora en ángulo de 30° y retroceder hasta que toque la gota que se extenderá a lo ancho de la primera lámina, luego se desliza la lámina extendedora siempre en ángulo de 30°, en forma rápida y uniforme, hacia el otro extremo, como se observa en la figura No. 7.
- 3) Si el ángulo entre las láminas es mayor el frotis será más grueso y viceversa.
- 4) Dejar secar las láminas a temperatura ambiente y rotular. Puede escribirse sobre ellas el nombre del paciente con la esquina de la otra lámina.

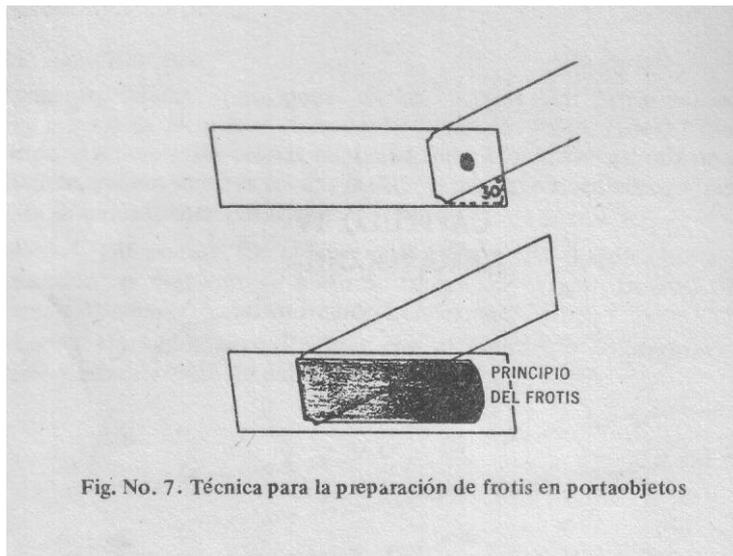


Fig. No. 7. Técnica para la preparación de frotis en portaobjetos

B) ANTICOAGULANTES:

- 1) **E.D.T.A.:** Las sales sódicas y potásicas del ácido etilendiaminotetracético (EDTA), por un mecanismo de quelación impiden que el calcio se ionice, ejerciendo de esta forma su acción anticoagulante. Una gota de los preparados comerciales evita la coagulación de 5 ml. de sangre.

Se utiliza principalmente para recuento de plaquetas, también es útil para recuento de rojos, blancos, reticulocitos y hemoglobina.

- 2) **Oxalatos** (Anticoagulante de Wintrobe): los oxalatos precipitan el calcio como sal, evitando la coagulación.

Se prepara disolviendo 1.2 g. de oxalato de amonio y 0.8 g. de oxalato de potasio en agua destilada, diluyendo hasta 100 ml.

Colocar en frasquitos 0.1 ml. de la solución por cada ml. de sangre, usualmente 0,3 – 0.4 ml. y poner a secar en estufa hasta que se observe un polvo blanco.

Se utiliza para hemoglobina, hematocrito, recuento de blancos, rojos y velocidad de sedimentación método Wintrobe.

- 3) **Citrato de Sodio:** Fija el calcio en forma no ionizada, evitando la coagulación. Se prepara disolviendo 3.8 g. de citrato de sodio en agua destilada diluyendo hasta 100 ml.

Se utiliza para velocidad de sedimentación método de Westergren: una parte de citrato para 4 partes de sangre (ej. 0.5 ml. para 2 ml.) y para las pruebas de coagulación: tiempo de protrombina, TPT, TT, Fibrinógeno, etc. combinando una parte del citrato para 9 partes de sangre (ej. 0.5 ml. para 4.5 ml.)

C) COLORACIONES:

- 1) **Coloraciones de Wright**

Preparación del colorante: utilizar la siguiente proporción: 1 g. de colorante en polvo de Wright para 600 ml. de alcohol metílico (metanol); disolver el colorante en un mortero echando el alcohol a pocos, triturar bien por 20 – 30 minutos,

hasta verter todo el alcohol. Guardar por un día en frasco oscuro, filtrar antes de usar siempre en frasco oscuro.

Agua tamponada: el pH. del agua que se utiliza debe estar en 6.4. Se preparan previamente dos tampones:

Tampón A: disolver 27.6 g. de fosfato ácido de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada

Tampón B: disolver 28.3 de fosfato alcalino disódico anhidro (Na_2HPO_4) en 1 litro de agua destilada.

Para preparar agua a pH 6.4 se utiliza la siguiente proporción:

Tampón A: 73.5 ml.

Tampón B: 26.5 ml.

Mezclar y completar a 200 ml. con agua destilada.

Nota: Una forma práctica de preparar agua tamponada es verter 0.4 – 0.5 ml. de carbonato de sodio al 10% (disolver 10 g. de carbonato de sodio en agua destilada diluyendo hasta 100 ml.) en 1 litro de agua destilada y ajustar el pH.

Procedimiento:

- a) El frotis bien seco se coloca sobre la gradilla de coloración.
- b) Cubrir toda la lámina con un volumen de colorante y dejar por 1 minuto.
- c) Diluir el colorante con 2 volúmenes de agua tamponada pH 6.4, mezclar bien, observándose la formación de una escarcha metálica y dejar por 6 minutos.
- d) Lavar con agua corriente y dejar secar colocando las láminas verticalmente.

Nota: Los tiempos indicados pueden variar de acuerdo a la antigüedad del colorante.

2) **Coloración de Giemsa:**

Preparación del colorante: Utilizar las siguientes proporciones:

 Giemsa en polvo, 600 mg.

 Metanol (libre de acetona), 50 ml.

 Glicerina neutra, 50 ml.

En un mortero pulverizar pequeñas porciones del colorante añadiendo glicerina e ir vertiendo en un matraz de 100 ml. hasta disolver todo el colorante, tapan el matraz con algodón y papel, colocar en baño de agua a 60°C por 2 horas agitándose cada 20 minutos. Enfriar y añadir el metanol. Guardar en frasco oscuro, dejar madurar por 2 semanas y filtrar antes de usar.

Agua Tamponada: El pH del agua debe estar en 7.

Utilizar las relaciones tampón A y B (ver coloración de Wright) de la siguiente manera:

Tampón A: 39 ml.

Tampón B: 61 ml.

Mezclar y completar a 200 ml. con agua destilada.

Procedimientos:

Sin destrucción de hematíes:

- a) El frotis seco se fija agregando un poco de alcohol metílico por 30 segundos.
- b) Esperar que el alcohol seque y agregar el colorante diluido (1 parte de colorante y 20 partes de agua tamponada)
- c) Dejar por 20 minutos y lavar con agua tamponada a pH 7.
- d) Dejar secar la lámina verticalmente.

D) HEMOGLOBINA

1) Método del cianuro de hemiglobina (antes cianmetahemoglobina)

Fundamento: el ferricianuro transforma el hierro de la hemoglobina del estado ferroso al férrico para formar hemoglobina, que se combina con el cianuro de potasio produciendo el cianuro de hemiglobina (CNHi) de color rojizo de intensidad proporcional a la concentración de hemoglobina.

Reactivos:

- a) Reactivo de Drabkin: Disolver 1 g. de bicarbonato de sodio, 50 mg. de cianuro de potasio (KCN) y 200 mg. de ferricianuro de potasio ($K_3Fe_2(CN)_6$) en agua destilada, hasta completar 1 litro, guardar en frasco oscuro a temperatura ambiente. Estable: 1 mes.
- b) Patrón de cianuro de hemiglobina (CNHi)
 - En el comercio se expenden patrones que usualmente contienen 60 mg. de cianuro de hemiglobina (CNHi) por 100 ml.
 - Se preparan diluciones con reactivo de Drabkin de tal manera que los patrones contengan concentración de 60 mg, 40 mg, 20 mg de CNHi.
 - Leer los tres tubos de absorbancia con filtro verde o a 540 nm, llevando el fotómetro a cero con agua destilada o Drabkin.
 - Para calcular la concentración de hemoglobina en cada tubo, realizar el siguiente cálculo:

$$Hb \text{ en g/100 ml.} = \frac{P \times D}{1,000}$$

P= Concentración del patrón

D= Dilución de la muestra de sangre que es 251 veces (ver procedimiento)

Concentración:

Así tendremos:	60	15 g/100 ml.
	40	10 g/100 ml.
	20	5 g/100 ml.

Luego graficar una curva patrón colocando en el eje de las ordenadas las lecturas en absorbancia y en la abscisa la concentración de hemoglobina en g/100 ml.

Procedimiento:

- a) En un tubo colocar exactamente 5 ml. de Drabkin.
- b) La sangre que puede utilizarse es de punción del dedo (sangre capilar) o de frasquito con anticoagulante de Wintrobe, bien mezclado.

- c) Con una pipeta de Sahli, tomar exactamente 0.02 ml. de sangre, limpiar externamente la punta de la pipeta y verter en el tubo con Drabkin, enjuagando 3 veces.
- d) Dejar en reposo por 10 minutos.
- e) Leer en absorbancia con filtro verde o a 540 nm, llevando a 0 el fotómetro con agua destilada.

Resultados:

La lectura en absorbancia del problema debe ser comparada en la curva patrón para encontrar a que concentración de hemoglobina corresponde expresándose en g/100 ml.

2) Método de Oxihemoglobina:

Se determina la hemoglobina como oxihemoglobina, no mide la carboxihemoglobina, metahemoglobina ni la sulfohemoglobina.

Reactivos:

- a) Reactivo de hidróxido de amonio: añadir 4 ml. de hidróxido de amonio NH₄OH a 1 litro de agua destilada y mezclar bien. Guardar bien tapado a temperatura ambiente.
- b) Curva patrón: puede realizarse con muestras de concentración de hemoglobina conocida o realizando una curva como por el método de cianmetahemoglobina.

Procedimiento:

- a) En un tubo colocar exactamente 5 ml. del reactivo de hidróxido de amonio.
- b) Con una pipeta de Sahli añadir exactamente 0.02 ml. de sangre capilar (dedo) o con anticoagulante y enjuagar la pipeta 3 veces.
- c) Mezclar bien y leer inmediatamente o si el tubo se tapa puede leerse en cualquier momento.
- d) Leer en absorbancia con filtro verde o a 540 mm llevando el fotómetro a 0 con el reactivo de hidróxido de amonio o agua.

Resultados:

La lectura en absorbancia del problema debe ser comparada en la curva patrón para encontrar a qué concentración de hemoglobina corresponde expresándose en g/100 ml.

Valores normales: para ambos métodos:

Hombres 14-18 g/100 ml.

Mujeres 12-16 g/100 ml.

E) HEMATOCRITO

Fundamentos: Mide la fracción que comprende a los glóbulos rojos, respecto al volumen total de una muestra de sangre venosa. Puede expresarse en porcentaje o como un número decimal.

$$\text{Hto} = \frac{\text{Altura de la columna de glóbulos rojos}}{\text{Altura de la columna de sangre total (g. rojos + plasma)}}$$

Procedimiento:

- 1) **Método de Wintrobe**

- a) Se utiliza el tubo de Wintrobe el cual se halla graduado en dos columnas, de 0 a 100 mm ascendente y descendente.
- b) La sangre previamente tomada con anticoagulante de Wintrobe o EDTA, debe mezclarse bien.
- c) Con una pipeta Pasteur o una aguja gruesa de punción lumbar, llenar con sangre el tubo de Wintrobe comenzando desde el fondo hasta la marca superior de 10 (100 mm), teniendo cuidado de no provocar espuma.
- d) Tapar el tubo con tapón de goma o esparadrapo para evitar la evaporación.
- e) Centrifugar a 3,500 rpm. (2,500 g.) x 30 minutos, en una centrifuga de 15 cm. de radio efectivo (del centro del cabezal hasta el fondo de un portatubo colocado horizontal).

Resultados:

- a) Si se expresa en porcentaje, observar hasta qué altura en mm. alcanzan los glóbulos rojos, sin considerar la capa blanca que incluye leucocitos y plaquetas.
- b) Si se expresa en decimales dividir los mm alcanzados por la columna total de sangre.

Valores normales: **hombres:** de 40 a 54%

Mujeres: de 37 a 47%

2) **Microhematocrito**

- a) Tomar la muestra a en capilares de (7 cm. x 1 mm.) heparinizados para sangre capilar de pulpejo del dedo, o utilizar capilares sin heparinizar para sangre con anticoagulante de Wintrobe o EDTA. Debe llenarse aproximadamente 70% del capilar.
- b) Ocluir un extremo del capilar con plastilina.
- c) Colocar el capilar sobre la plataforma del cabezal de una centrifuga de microhematocrito, con el extremo no ocluido hacia el centro del aparato y el ocluido adherido al reborde externo de la plataforma.
- d) Centrifugar por 5 minutos entre 10,000 a 12,000 g.

Resultados: Medir las columnas de sangre total y la de glóbulos rojos con una regla milimétrica y hacer los cálculos como el método de Wintrobe para expresar en decimales o en porcentaje. También existen en el comercio cartillas para leer los microhematocritos facilitando la labor rutinaria.

F) VELOCIDAD DE SEDIMENTACION

Fundamento: Mide la tendencia de los eritrocitos a sedimentar, al colocar sangre anticoagulada en un tubo en posición vertical.

Procedimiento:

1) **Método de Westergren:**

- a) En n un tubo conteniendo 0.5 cm. de citrato de sodio al 3.8% (ver Anticoagulantes pag. 50) verter 2 cm. de sangre obtenida por punción venosa y mezclar por inversión.

- b) Ser utiliza el tubo de Westergren que se halla graduado de 0 a 200 mm. de arriba hacia abajo y presenta los extremo abiertos.
- c) Antes de las dos horas o si se refrigera hasta 6 horas se puede cargar el tubo de Westergren aspirando la sangre como una pipeta hasta la marca de 0, se coloca en reposo vertical por una hora sobre una gradilla especial que obtura ambos extremos.

Resultados: Inmediatamente leer los mm descendidos por la columna de glóbulos rojos, es decir, medir la columna de plasma por encima del nivel de los glóbulos rojos sedimentados.

Valores normales:

Hombres	hasta 10 mm. a la hora
Mujeres	hasta 15 mm. a la hora.

2) **Método de Wintrobe:**

- a) Tomar unos 2 ml. de sangre venosa en un frasquito con 2 décimos de anticoagulante de Wintrobe seco (ver Anticoagulantes), mezclar bien por rotación.
- b) Antes de las dos horas cargar el tubo de Wintrobe con la sangre bien mezclada utilizando una pipeta Pasteur o aguja de punción lumbar, llenando el tubo desde el fondo hasta la marca de 0 evitando la formación de espuma.
- c) Dejar en reposo vertical por una hora sobre la gradilla adecuada.

Resultados: Inmediatamente leer los mm. descendidos por la columna de glóbulos rojos.

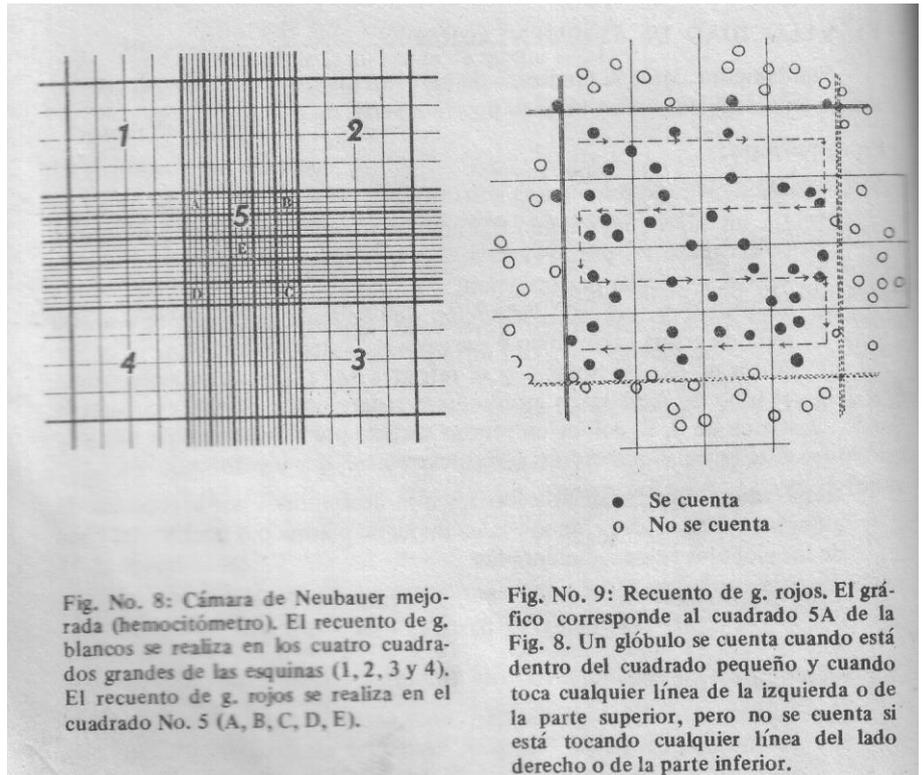
Valores normales:

hombres	hasta 5 mm. a la hora
mujeres	hasta 10 mm. a la hora.

G) RECUENTO DE GLOBULOS ROJOS

1) **Equipos y reactivos:**

- a) **Cámara de Neubauer mejorada** (Hemocitómetro)



Esta cámara consta de:

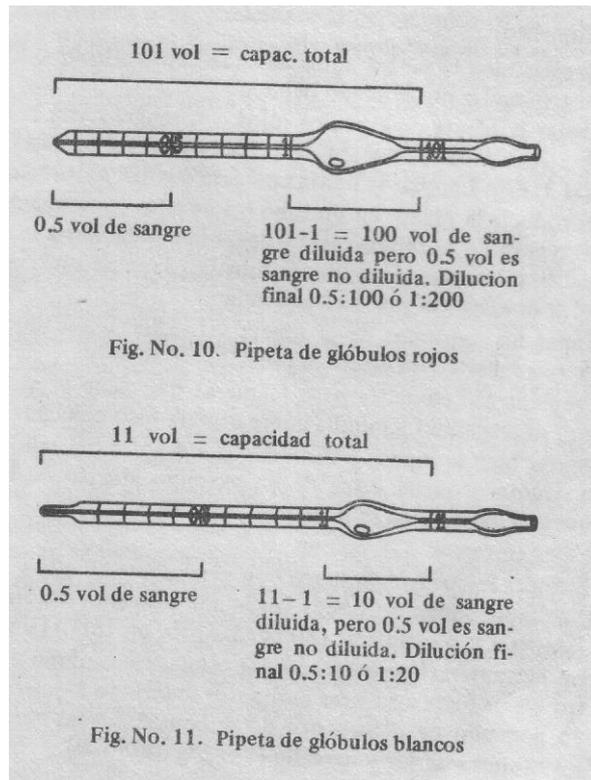
- Una laminilla portaobjetos gruesa, en cuyo centro se hallan 2 superficies cuadrículadas iguales, separadas del resto de la lámina por surcos y 2 barras transversales algo más elevadas.
- Una laminilla cubreobjetos ópticamente plana que al colocarse sobre las barras elevadas de la lámina forma una cámara entre el cubreobjetos y la superficie cuadrículada (cuadrícula).

Medidas:

- La altura entre el cubreobjetos y la cuadrícula es de 0.1 mm.
- Cada cuadrícula mide 3 mm. de lado y se divide en 9 cuadrados grandes, cada uno de 1 mm de lado o sea 1 mm² de superficie que se subdivide en 16 cuadrados medianos.
- El cuadrado central se divide en 25 cuadrados pequeños y cada uno de ellos en 16 cuadraditos.
- Cada cuadrado pequeño mide 0.2 mm de lado (0.4 mm² de superficie), y cada cuadradito mide 0.5 mm de lado (0.0025 mm² de superficie).

b) Pipeta de glóbulos rojos (de Thoma)

Presenta cerca del extremo superior una marca de 101, inmediatamente continúa una dilatación (bulbo) que contiene una perлита roja mezcladora, luego sigue el extremo más largo de la pipeta (tallo) que está dividido en 10 partes, con dos marcas: 1 (acabando el bulbo) y 0.5 a la mitad del tallo. Se utiliza



acoplándole a su extremo superior un tubo de látex (tipo ligadura) con una boquilla para aspirar.

c) Diluyentes de glóbulos rojos

Puede utilizarse:

- Cloruro de sodio al 0.9%: disolver 0.9 g. de cloruro de sodio en agua destilada hasta completar 100 ml.
- Diluyente de Hayem:
Cloruro de mercuríco 0.5 g.
Sulfato de sodio, 5 g.
Cloruro de sodio, 1 g.
Agua destilada c.s.p., 200 ml. Disolver y filtrar.

2) Procedimiento:

- a) Mezclar bien la sangre anticoagulada con Wintrobe o EDTA o tomar sangre capilar por punción del dedo.
- b) Llenar la pipeta de glóbulos rojos con sangre hasta la marca de 0.5, para realizar una dilución de 1:200 y si se carga hasta 1 la solución será 1:100. Limpiar la punta con gasa o papel absorbente.
- c) Introducir la pipeta en un tubo o frasquito conteniendo un poco del diluyente de glóbulos rojos y llenar la pipeta, hasta la marca de 101, haciéndola rotar, para que se movilice la perla mezcladora. No permitir que ingrese aire o escape sangre.
- d) Tapar los extremos de la pipeta y mezclar manualmente o colocar en una mezcladora eléctrica por 1´.
- e) Preparar el hemocitómetro (cámara) que debe estar limpio y seco con su respectiva laminilla cubre cámara bien colocada.

- f) Agitar bien la pipeta y descartar 3 a 4 gotas del tallo, luego colocar una gota pequeña cerca de un extremo abierto de la cámara para que por capilaridad se llene exactamente.
- g) Dejar en reposo 3' y contar.
- h) Enfocar la cuadrícula luego con el objetivo de 40x y contar sobre el cuadrado grande central de la cámara, solo en 5 cuadrados pequeños: 1 central y 4 angulares (80 cuadraditos en total) (Ver figura No. 8).
- i) En la numeración se incluye las células que cubren o tocan por dentro o por fuera las líneas limitantes superior e izquierda en el cuadrado pequeño de recuento y no se consideran las correspondientes a los límites inferior y derecho (Ver figura No. 9).

3) **Resultados.**

$$\begin{aligned} \text{No. De g. rojos x mm}^3 &= \frac{\text{No. de g. rojos en 5 cuadrados pequeños}}{\text{Área contada x altura de la cámara x}} \\ &\quad \text{dilución de la sangre} \\ &= \frac{\text{Glóbulos rojos contados}}{1/5 \times 1/10 \times 1/200} \end{aligned}$$

No de glóbulos rojos x mm³ = No. de glóbulos rojos contados x 10,000

- 4) **Valores normales.**
- | | |
|---------|---|
| Hombres | de 4.2 a 5.4 millones x mm ³ |
| Mujeres | de 3.8 a 5.2 millones x mm ³ |

H) RECUENTO DE GLOBULOS BLANCOS

1) **Equipos y reactivos**

- a) **Hemocitómetro** (cámara de Neubauer)
- b) **Pipeta de glóbulos blancos** (de Thoma)
Es una pipeta muy parecida a la de glóbulos rojos, con las mismas partes solo que el bulbo es más pequeño y en lugar de la marca de 101 tiene el No. 11 de tal manera que al tomar sangre hasta la marca de 0.5 y diluyente hasta 11, tenemos una dilución de 1:20.
- c) **Diluyente de glóbulos blancos:** ácido acético al 2%. diluir 2 ml. de ácido acético glacial en agua destilada hasta completar 100 ml.

2) **Procedimiento:**

- a) Mezclar bien la sangre anticoagulada con Wintrobe o EDTA o tomar sangre capilar del dedo.
- b) Llenar sangre con la pipeta de glóbulos blancos hasta la marca de 0.5 y limpiar la punta con gasa o papel.
- c) Introducir la pipeta en un tubo conteniendo un poco de diluyente de glóbulos blancos y llenar la pipeta hasta la marca de 11 haciéndola rotar para que se movilice la perla mezcladora. No permitir que ingrese aire ni se escape sangre.
- d) Tapar ambos extremos de la pipeta y mezclar manualmente o con una mezcladora eléctrica por 1 minuto.
- e) Preparar el hemocitómetro (cámara) que debe estar limpio y seco con su laminilla cubre-cámara bien colocada.
- f) Agitar la pipeta y descartar 3 a 4 gotas del tallo para luego colocar una gota pequeña cerca de un extremo abierto de la cámara, para que por capilaridad se llene exactamente.
- g) Dejar en reposo por 3 minutos.
- h) Enfocar la cuadrícula y luego con el objetivo de 40x contar en los cuatro cuadrados grandes angulares (ver figura No. 8)

En forma semejante al recuento de glóbulos rojos, la enumeración incluye las células que cubren o tocan por dentro o por fuera las líneas limitantes superior e izquierda en el cuadrado grande de recuento y no se consideran las correspondientes a los límites inferior y derecho (Ver figura No. 9)

3) **Resultados:**

$$\text{No. de leucocitos} = \frac{\text{G. blancos contados en 4 cuadrados grandes}}{\text{X mm}^3} = \frac{\text{Área contada} \times \text{Altura de la cámara} \times \text{dilución}}{\text{de la sangre}}$$

$$= \frac{\text{Glóbulos contados}}{4 \times 1/10 \times 1/20}$$

$$\text{No. de leucocitos} \times \text{mm}^3 = \text{glóbulos contados} \times 50$$

4) **Valores normales:** de 5,000 a 10,000 x mm³

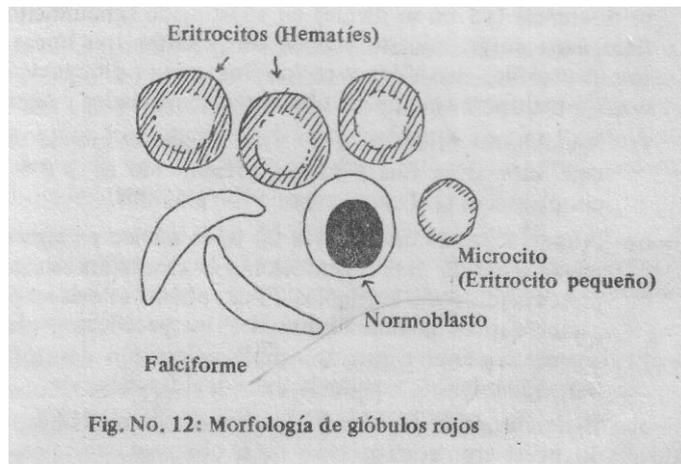
I) MORFOLOGIA DE LOS GLOBULOS ROJOS (Eritrocitos)

La serie eritrocítica se inicia probablemente en una célula multipotencial en la médula ósea que luego origina el pronormoblasto, éste al normoblasto basófilo, continúa el normoblasto policromatófilo que determina el normoblasto ortocromático, el cual se diferencia (ya no se divide) en reticulocito y finalmente en eritrocito.

El frotis de sangre periférica en determinados estados puede mostrar células a partir del normoblasto policromatófilo, pero normalmente deben observarse solo eritrocitos maduros.

- 1) **Normoblasto policromatófilo:** Mide unas 11 u de diámetro, el núcleo es de localización central y contiene cromatina gruesa, su citoplasma es violáceo (policromático) por la hemoglobina y la relación de tamaño núcleo/citoplasma es casi 2:1. Deben ser informados en porcentaje por 100 glóbulos rojos.
- 2) **Normoblasto ortocromático:** mide unos 8 a 9 u de diámetro, el núcleo es más pequeño con tendencia a ser excéntrico, su citoplasma es rosado y la relación núcleo/citoplasma es 1:2. Deben ser informados en porcentaje x 100 glóbulos rojos.
- 3) **Reticulocitos:** Luego que desaparece el núcleo del normoblasto ortocromático, queda una célula que presenta en su interior ribosomas precipitados, los cuales al ser teñidos con colorantes vitales, se observan como una red azulada. En 2 días al madurar los reticulocitos desaparece esta red y origina el eritrocito.
Recuento de reticulocitos (ver más adelante)
- 4) **Eritrocito:** mide de 7 a 8 u, no presenta núcleo, su citoplasma es bicóncavo y de color rosado con una zona pálida central (normalmente 1/3 de la célula).
- 5) **Alteraciones frecuentes de los eritrocitos:**
 - a) Alteraciones de tamaño:
 - Macroцитosis: los glóbulos rojos miden más de 8 u de diámetro.
 - Microцитosis: los glóbulos rojos miden menos de 6 u de diámetro.
 - Anisocitosis. Variación exagerada en el tamaño de los glóbulos rojos.
 - b) Alteraciones en la coloración.

- Hiper Cromía: las células se tiñen totalmente de rosado sin observarse la palidez central.
 - Hipocromía. se observa incremento de la palidez central de los hematíes.
 - Policromatofilia: se observa glóbulos rojos de tamaño aumentado y con citoplasma de coloración ligeramente azulada.
 - Target Cell. las células semejan un bull de tiro, con una zona central rosada de concentración de hemoglobina, rodeada de una zona clara y periféricamente nuevamente una zona rosada.
- c) Alteraciones en la forma:
- Acantocitos: son glóbulos rojos de bordes dentados como espinas.
 - Esquistocitos: son fragmentos de glóbulos rojos de distintas formas, característicos de los casos de hemólisis.
 - Ovalocitos y esferocitos: las células adoptan la forma ovalada o esférica.
 - Drepanocitos (Sickle-Cells): son células alargadas, curvadas de extremos puntiagudos que tienen forma de hoz.
 - Poiquilocitos: son células que presentan una marcada variación en la forma.



- d) Inclusiones eritrocíticas:
- Punteado basófilo: son gránulos basófilos que se presentan en el citoplasma, se relacionan directamente con el aumento de reticulocitos.
 - Anillos de Cabot: son anillos que se observan en forma de aro o de número 8.
 - Cuerpo de Heinz: son formaciones redondeadas hasta de 3 u de diámetro localizadas habitualmente en la periferie de la célula. No se observan con la coloración de Wright, pero sí con azul de metileno o azul brillante de Cresil.
 - Cuerpos de Howell Jolly: son formaciones esféricas hasta de 1 u de diámetro que se tiñen de color azulado con el colorante de Wright.

Resultados:

La alteración en la forma, tamaño y las inclusiones, deben ser informadas en porcentaje por 100 eritrocitos.

J) MORFOLOGIA DE LOS GLOBULOS BLANCOS (Leucocitos)

Los leucocitos comprenden: los granulocitos, monocitos y linfocitos.

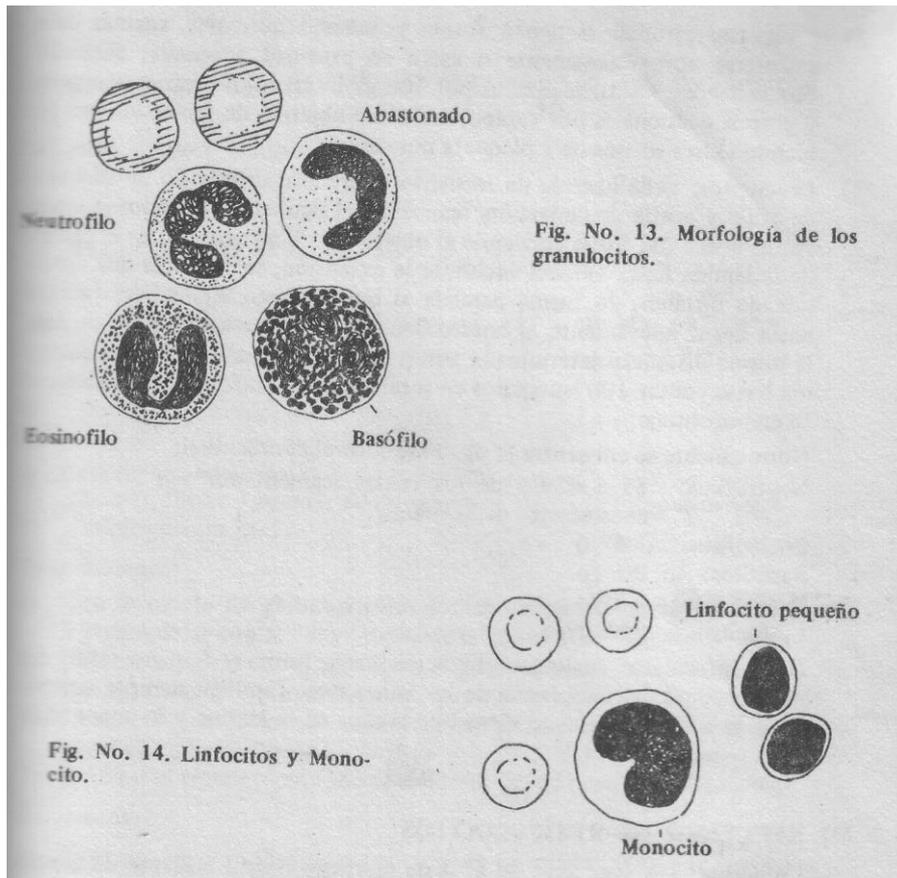
- 1) **Granulocitos:** se originan probablemente de una célula multipotencial en la médula ósea que luego origina el mieloblasto, éste al promielocito, continua el mielocito que determina el metamielocito (juvenil), el cual se diferencia (ya no se divide) en abastonado (granulocito en banda) y finalmente en granulocito segmentado. Existen tres líneas de granulocitos: neutrófilos, basófilos y eosinófilos, que se diferencian en igual forma. Normalmente solo deben observarse abastonados y segmentados.
- a) **Mieloblasto:** Mide 20 a 25 u, el núcleo es grande cuadrangular u oval, cromatina fina y pálida, presentando de 2 a 5 nucléolos. El citoplasma es azul claro, escaso y sin gránulos.
 - b) **Promielocito:** mide de 15 a 20 u, el núcleo es algo más pequeño, puede tener discreta indentación y la cromatina es algo condensada, presentando 1 a 3 nucléolos. El citoplasma es más amplio y presenta característicos gránulos azurófilos, inespecíficos y progresivamente aparecen gránulos que toman la coloración neutrófila, eosinófila (naranja) o basófila, según la línea de diferenciación.
 - c) **Mielocito:** mide de 15 a 17 u, el núcleo es moderadamente indentado, posee cromatina gruesa y no se observan nucléolos. El citoplasma presenta los gránulos específicos según la línea de diferenciación y puede notarse una zona clara vecina al núcleo correspondiente al aparato de Golgi.
 - d) **Metamielocito (juvenil):** mide de 12 a 17 u, el núcleo es excéntrico y marcadamente indentado o arriñonado. El citoplasma es más abundante y representa gránulos inespecíficos y específicos.
 - e) **Abastonados (granulocitos en banda):** mide 10 a 15 u, el núcleo es alargado y curvado y puede presentar 1 a 2 constricciones o estrecheces, pero no son segmentaciones completas. El citoplasma presenta gránulos inespecíficos y específicos.
 - f) **Segmentado:** mide de 10 a 15 u, el núcleo es excéntrico, la cromatina es espesa y presenta de 2 a 5 lóbulos conectados entre sí por puentes de membrana nuclear. El citoplasma presenta gránulos inespecíficos y específicos.
 - g) **Anormalidades frecuentes de los granulocitos**
 - Granulaciones tóxicas: son gránulos basófilos oscuros casi negros que se observan en el citoplasma de los neutrófilos durante las infecciones severas y estados tóxicos.
 - Vacuolas tóxicas: pueden observarse en el citoplasma de los neutrófilos y eosinófilos en los casos de infecciones o parasitosis severa.
 - Cromatina sexual: son proyecciones de la cromatina nuclear en forma de palillo de tambor que se halla en un promedio de 7 x 500 neutrófilos en mujeres normalmente. Indica la presencia del cromosoma sexual: x
 - Hipersegmentación de los neutrófilos: son neutrófilos con 6 o más segmentaciones, se observa en las anemias por deficiencia de vitaminas B-12 y ácido fólico, síndrome de Down y otras anomalías congénitas.
- 2) **Linfocitos:** Se originan en la médula ósea en una célula multipotencial que genera el linfoblasto, éste determina el prolinfocito que finalmente resulta el linfocito. Además debe considerarse que existen 2 poblaciones de linfocitos, los dependientes del timo (linfocitos T) y los dependientes del equivalente de la bursa en el hombre (linfocitos B) probablemente el tejido linfoide intestinal y otros.
- a) **Linfoblasto.** mide de 15 a 20 u, el núcleo es redondo, central, parecido al mieloblasto, sólo que es de bordes más irregulares y de mayor tamaño, casi

llenando el citoplasma. Se puede observar 1 a 2 nucléolos. El citoplasma no tiene gránulos.

- b) **Pro-linfocito.** mide unas 15 u, el núcleo puede ser ligeramente indentado. El citoplasma a veces presenta algunos gránulos azules.
 - c) **Linfocitos:** pueden ser. i) Linfocitos pequeños (6 a 9 u), mayormente son linfocitos T.
ii) Linfocitos grandes (17 a 30 u) mayormente son linfocitos B.
El linfocito pequeño tiene un núcleo redondo que ocupa casi todo el citoplasma y la cromatina es densa. El citoplasma es escaso y basófilo, puede contener algunos gránulos azurófilos.
El linfocito grande presenta un núcleo oval discretamente indentado, la cromatina es densa y puede observarse un nucléolo. El citoplasma es abundante, azul pálido, puede contener gránulos azurófilos y los límites son indentados.
 - d) **Alteraciones de los linfocitos:**
 - Linfocitos atípicos (virocitos o linfocitos plasmocitoides) miden de 15 a 30 u. El núcleo es irregular, indentado, excéntrico y pueden observarse nucléolos. El citoplasma es amplio y azul pudiendo presentar gránulos azurófilos y vacuolas; los límites pueden ser indentados circundando las células vecinas. Se ven en: mononucleosis infecciosa, hepatitis viral, herpes zoster, enfermedades autoinmunes, etc. Pueden hallarse normalmente hasta en un 10%.
 - Linfocitos con mitosis o binucleados: puede encontrarse en enfermedades virales, leucemia linfocítica o en la extensión hematológica de linfoma.
 - Linfocitos vacuolados: pueden verse en linfocitos atípicos y en los linfocitos reaccionales por efecto de la radiación o quimioterapia.
- 3) **Monocitos:** Se originan de una célula multipotencial de la médula ósea que luego determinará el monoblasto y éste al promonocito que resultará finalmente en monocito.
- a) **Monoblasto:** no se puede aún diferenciar con certeza del mieloblasto y se cree que el mieloblasto puede originar células tanto mieloides como monocíticas.
 - b) **Promonocito:** mide de 15 a 23 u, el núcleo es grande, redondo cerebroide e indentado y suelen observarse 1 ó 2 nucléolos. El citoplasma es escaso de color gris azulado con finos gránulos azurófilos.
 - c) **Monocito:** mide de 14 a 20 u, el núcleo es en forma de herradura y a veces lobulado, no observándose nucléolos. El citoplasma es más abundante, gris azulado, opaco y contiene algunos gránulos azurófilos.

K) MORFOLOGIA DE LAS PLAQUETAS

Se originan en una célula multipotencial en la médula ósea que determinará al megacarioblasto, el cual por replicación nuclear en promegacariocitos que maduran a megacariocitos granulares, que finalmente liberan las plaquetas. Las plaquetas son las únicas que se ven al examen de sangre periférica normal.



L) EXAMEN DEL FROTIS DE SANGRE

Se considera lo siguiente:

- 1) La calidad del frotis, que debe ser de coloración nítida y espesor adecuado, las extensiones gruesas dificultan la identificación y las delgadas originan una distribución anormal de los elementos.
- 2) Eritrocitos: estudiar su tamaño, forma, coloración (concentración de hemoglobina) y si existen inclusiones o elementos extraños, hematozoarios (malaria) o Bartonella (enfermedad de Carrión).
- 3) Plaquetas: estudiar si tienen forma y tamaño normales, además debe calcularse aproximadamente si están en cantidad adecuada, debiendo observarse de 3 a 10 plaquetas por 100 glóbulos rojos o varias plaquetas o grupos ocasionales por campo, visto con objetivo de inmersión, no debiendo existir menos de una plaqueta por campo. El recuento aproximado de plaquetas puede obtenerse contando 10 campos , calculando el promedio y multiplicando por 20,000.
- 4) Leucocitos: debe hacerse un recuento diferencial utilizando un objetivo de 100x y aceite de inmersión, realizando el siguiente recorrido: se inicia en un borde del frotis corriendo el objetivo verticalmente hacia el centro de la lámina hasta 1/3 del ancho de la extensión, se continúa una determinada distancia en forma paralela al borde, luego seguir hacia afuera hasta llegar nuevamente al borde, finalmente recorrer a lo largo de éste la misma distancia determinada

anteriormente y otra vez iniciar el esquema hasta contar 100 leucocitos en total, debiendo informar cada elemento en porcentaje.

Normalmente se encuentra la siguiente fórmula:

Neutrófilos: 55 a 65% de los cuales segmentados son 50-60% y abastionados de 3-5%.

Eosinófilos: 1-4%

Basófilos: 0-1%

Monocitos: 4-8%

Linfocitos: 25-30%

Debe informarse cualquier alteración en la forma y tamaño tanto del núcleo como del citoplasma de los leucocitos. También siempre compararse la cantidad de leucocitos observados en la lámina y la encontrada en la numeración total.

M) RECUENTO DE RETICULOCITOS

Colorante: Disolver 1g. de azul de metileno o azul brillante de cresilo en 100 ml. de solución salina fisiológica, añadir 0.4 g. de citrato de sodio, mezclar bien y filtrar para usar.

Procedimiento:

- 1) Colocar 3 gotas de colorante filtrado en un tubo.
- 2) Añadir 4 gotas de sangre capilar o con anticoagulante de Wintrobe EDTA.
- 3) Mezclar bien e incubar por 12' a temperatura ambiente o de preferencia a 37°C.
- 4) Realizar en láminas frotices delgadas y secar al medio ambiente.
- 5) Contar 1000 glóbulos rojos con objetivo de inmersión y contar los glóbulos que contengan gránulos o filamentos como redes de color azul oscuro (reticulocitos).

Resultados:

$$\text{Reticulocitos \%} = \frac{\text{Reticulocitos encontrados en 1000 glóbulos rojos}}{10}$$

Valores normales: Hasta 1.5 %

N) RECUENTO DE PLAQUETAS

Equipos y Reactivos

- 1) Cámara de Neubauer (hemocitómetro)
- 2) Pipeta de glóbulos rojos
- 3) Placa de Petri
- 4) Diluyente: Clorhidrato de Procaína 3 g.
Cloruro de Sodio 0.20 g.
Agua destilada c.s.p. 100 ml.
Disolver, filtrar y guardar en refrigeración, hasta por dos semanas.
- 5) Anticoagulante EDTA.

Procedimiento:

- 1) Con la pipeta de glóbulos rojos tomar sangre completa hasta la marca 1 y completar con el diluyente hasta la marca 101(dilución 1/100).
- 2) Colocar la pipeta en un agitador por 2 minutos.
- 3) Descartar las tres primeras gotas, cargar una cámara de Neubauer y dejar en reposo por 15 minutos en una placa Petri en cuyo fondo se coloca un pape filtro humedecido.
- 4) Realizar el recuento en todo el cuadrado grande central de la cámara.

Resultados:

No. de Plaquetas

$$\begin{aligned} \text{por mm}^3 &= \frac{\text{Plaquetas contadas en un cuadrado grande central}}{\text{Área contada} \times \text{Altura de la cámara} \times \text{dilución de la sangre}} \\ &= \frac{\text{Plaquetas contadas}}{1 \times 1/10 \times 1/100} \end{aligned}$$

No. de plaquetas por $\text{mm}^3 = \text{Plaquetas contadas} \times 1000$

Valores normales: 150,000-400,000 x mm^3 .

Ñ) TIEMPO DE COAGULACION DE SANGRE COMPLETA (Método de Lee White)

Fundamento: Es el tiempo que requiere una muestra de sangre colocada en un tubo a 37°C, para formar un coágulo firme. Detecta alteraciones del sistema **intrínseco** de coagulación y sirve para el control de pacientes heparinizados.

Procedimiento:

- 1) Extraer 5ml. de sangre venosa por punción cuidadosa y paralelamente se pone en marcha de un reloj.
- 2) Retirar la aguja de la jeringa y colocar 1ml. de sangre en 3 tubos secos, enumerados de 1 al 3 que se encuentran depositados en un baño de agua a 37°C.
- 3) Después de 5 minutos, inclinar el tubo No.3 en un ángulo de 45° cada 30 segundos, hasta que la sangre esté completamente coagulada, luego sucesivamente seguir con los tubos 2 y 1.

Resultados:

El tiempo de coagulación es el tiempo registrado para el tubo No.1.

Valores normales: de 5 a 15 minutos.

O) TIEMPO DE SANGRADO O SANGRIA

Fundamento: Es el tiempo que demora el sangrado de una herida estandarizada. Indica la capacidad de las plaquetas para realizar hemostasia.

Procedimiento:

-Método de IVY:

- 1) Colocar el brazalete del tensiómetro en el brazo e insuflar hasta 40 mm. de Hg y mantener esta presión.
- 2) Limpiar con alcohol la cara anterior del antebrazo y secar.
- 3) Realizar una incisión de 9 mm. de longitud x 1 mm. de profundidad (existen en el comercio pequeños equipos estandarizados), y paralelamente poner en marcha un reloj.
- 4) Secar cada 30 segs. con papel filtro las gotas de sangre, teniendo cuidado de no tocar los bordes de la herida.

Resultados:

Se registra el tiempo hasta cuando la herida deje de sangrar.

Valores normales: de 1 a 6 minutos.

-Método de Duke

- 1) Con una lanceta se realiza una punción de 3 mm. de profundidad en la parte inferior del lóbulo de la oreja y se pone en marcha un reloj.
- 2) Secar cada 30 segundos con papel filtro sin tocar la herida.

Resultados:

Se registra el tiempo que cese el sangrado.

Valores normales: de 1 a 3 minutos.

P) TIPIFICACION DE GRUPOS SANGUINEOS A,B,O (Sistema ABO)

Fundamento: La identificación de glóbulos rojos en el sistema ABO se realiza haciendo reaccionar los glóbulos rojos A, B y AB por separado, produciéndose un fenómeno de aglutinación en caso de ser positiva la reacción.

Procedimiento:

-En tubo:

- 1) Rotular 2 tubos A y B
- 2) Preparar una suspensión de glóbulos rojos del paciente al 4 % en suero fisiológico obtenido de sangre fresca, oxalatada o coagulada previamente lavados con suero fisiológico 2 veces.
- 3) Colocar en A: una gota de suero anti A más una gota de glóbulos rojos al 4 % en suero fisiológico. Colocar en B: una gota de suero anti B más una gota de glóbulos rojos al 4 % en suero fisiológico. Mezclar bien ambos tubos.
- 4) Centrifugar los tubos por 20 segundos.

Resultados:

Desprender suavemente el sedimento y examinar macroscópica y microscópicamente para observar aglutinación; reportar de acuerdo al siguiente cuadro:

Grupo	Tubo con Anti A	Tubo con Anti B
O	-	-
A	+	-
B	-	+
AB	+	+

Nota: (-) No aglutinación

(+) Si aglutinación

-En lámina:

- 1) En una placa de porcelana blanca con depresiones circulares, colocar 1 gota de suero anti A, anti B, anti-A-B en 3 diferentes depresiones, rotuladas como A,B y O respectivamente.
- 2) Preparar de la muestra desconocida una solución al 10 % de glóbulos rojos en suero fisiológico, usando sangre fresca, coagulada, oxalatada o citratada añadir una gota pequeña en cada depresión rotulada.
- 3) Con un aplicador de madera (mondadientes), uno, diferente cada vez, mezclar las gotas.
- 4) Balancear la placa con movimientos circulares por 2 minutos.

Resultados:

Observar la presencia de aglutinación macroscópicamente y reportar de acuerdo al cuadro anterior. El grupo O no reaccionará con suero anti A., anti B ni con anti A-B.

Q) TIPIFICACION DEL RH (Sistema Rhesus)

Fundamento: La identificación de glóbulos rojos que poseen el antígeno (Ag) D (denominados Rh positivos) se realiza haciendo reaccionar los glóbulos rojos desconocidos con un suero conocido que contiene anticuerpos (Acs) contra Ag D produciéndose un fenómeno de aglutinación en caso de ser positiva la reacción.

Procedimiento:**-En tubo:**

- 1) Preparar una suspensión al 5 % de glóbulos rojos en suero fisiológico de la muestra problema
- 2) Colocar una gota de suero anti D en un tubo y añadir 2 gotas de la suspensión de glóbulos rojos.

3) Mezclar y centrifugar por 15 segundos.

Resultados:

Resuspender suavemente y observar la presencia de aglutinación macroscópica y microscópicamente.

Presencia de aglutinación = Rh positivo

Si no existe aglutinación = Rh negativo

-En placa:

1) Preparar una suspensión de glóbulos rojos al 40-50 % en su propio plasma o suero.

2) Una gota de anti D en una lámina portaobjetos y añadir 2 gotas de la suspensión de glóbulos rojos.

3) Mezclar con un aplicador de madera extendiendo las gotas en un círculo de 3 cm. de diámetro.

4) Colocar la lámina sobre la caja de Diamond (es una caja alargada movable que presenta en su interior un bulbo eléctrico que produce calor), de tal forma que la lámina con la muestra alcancen una temperatura de 37 a 39°C.

5) Mover la caja de Diamond por 2 minutos.

Resultados:

Observar la presencia de aglutinación.

Aglutinación: Rh positivo.

No aglutinación: Rh negativo.

R) PRUEBAS CRUZADAS

Fundamento: Son pruebas realizadas entre los glóbulos rojos del posible donante para una transfusión y el suero de un receptor, para determinar cualquier incompatibilidad entre ellos.

Procedimiento:

1) Colocar en 2 tubos marcados S y P, 2 gotas de suero fresco del receptor.

2) Tomar sangre del probable donante del mismo tipo ABO Y Rh que el receptor y preparar una suspensión al 5% de glóbulos rojos en suero fisiológico

3) Añadir una gota de la suspensión de glóbulos rojos a los 2 tubos S y P, mezclar bien.

4) El tubo S dejarlo en reposo por 15 minutos y luego observar si presenta aglutinación.

5) El tubo P debe centrifugarse por 1 minuto y observar si existe aglutinación. Luego agregar 2 gotas de albúmina al 22%, mezclar e incubar a 37°C por 15

minutos. Centrifugar 1 minuto y observar si existe hemólisis o aglutinación tanto macroscópica como microscópicamente.

- 6) Si en el tubo P no se observa aglutinación, lavar los glóbulos rojos con suero fisiológico por 3 veces, decantar y agregar 2 gotas de suero antiglobulina (suero de Coombs) mezclar y centrifugar, finalmente observar macroscópica y microscópicamente si existe aglutinación.

Resultados:

Si no se observa aglutinación o hemólisis en cualquiera de los pasos descritos, significa que existe compatibilidad, en caso contrario es incompatible.

Nota: Puede abreviarse esta serie de pruebas en casos de urgencia, suprimiéndose el paso 6.

CAPITULO V

INMUNOLOGA

A) GENERALIDADES

La respuesta inmunológica en el hombre se evidencia por dos mecanismos: el humoral (anticuerpos) y el celular (mediado por células). Los procesos humorales consisten en las reacciones entre antígenos y anticuerpos, mientras que los procesos celulares incluyen las interacciones entre antígenos y linfocitos T (dependientes del timo), que actúan, ya sea directamente o a través de sustancias que no son anticuerpos.

- **Antígeno (Ag):** es una sustancia extraña (macromolécula) que cuando es introducida dentro del organismo induce en el sistema inmune la producción de inmunoglobulinas (anticuerpos) que reaccionarán específicamente solo con ese antígeno.
- **Hapteno:** Es una sustancia de peso molecular inferior al de un antígeno, que es incapaz de inducir la formación de anticuerpos a no ser que se le acople a otra molécula como por ejemplo una proteína, de tal manera que los anticuerpos podrían reaccionar tanto con la molécula como con el hapteno aún si este último es acoplado a otra molécula diferente a la original.
- **Anticuerpos (Ac):** Son inmunoglobulinas sintetizadas por las células plasmáticas derivadas de los linfocitos B, en respuesta a la presencia de un antígeno y reaccionan específicamente con él. En el hombre existen cinco clases principales de inmunoglobulinas (Ig) que son: IgG, IgA, IgM, IgD y IgE.

B) METODOS PARA DETECTAR REACCIONES ANTIGENO-ANTICUERPO

- **Aglutinación:** consiste en la agregación visible de un antígeno soluble (aglutinógeno) con su correspondiente anticuerpo (aglutinina): Ejemplos: aglutinaciones para *S. typhi* y *Brucella*. Los antígenos solubles pueden adsorberse sobre: eritrocitos, partículas de látex o bentonita y son aglutinados por los anticuerpos específicos visualizándose muy claramente la reacción. Ej: prueba de látex para artritis reumatoide.
- **Precipitación:** Este fenómeno ocurre cuando un antígeno soluble interactúa en solución con su anticuerpo respectivo. Las pruebas pueden realizarse en tubos o capilares. Ej. Test para Proteína C.

- **Inmunodifusión:** Consiste en que el fenómeno inmunológico de la precipitación se concreta al difundir tanto el antígeno como el anticuerpo a través de un medio de soporte semisólido como la agarosa, poliacrilamida o almidón. Existen varias modalidades como la difusión simple, doble difusión, inmunodifusión radial, etc. Ej. detección de gammaglobulinas.
- **Inmunolectroforesis:** comprende dos procesos, la electroforesis y la reacción antígeno anticuerpo. La electroforesis es la separación de los componentes de una proteína que migran a diferentes distancias en un medio de soporte tamponado (agarosa poliacrilamida o acetato de celulosa) sobre el que se ha hecho actuar corriente eléctrica. Con una de estas fracciones migradas que constituye el antígeno, actúa el anticuerpo específico que se encuentra incorporado en el medio de soporte, formándose líneas de precipitación que significa la presencia de complejos antígeno-anticuerpo. Existen modalidades como: método en una dimensión (rocket inmunolectroforesis), en dos dimensiones (electroforesis cruzada).
- **Contrainmunolectroforesis** (Inmunolectroforesis en una dimensión con doble difusión). Sirve para identificar antígeno así como anticuerpo. El antígeno líquido y el respectivo anticuerpo (o viceversa) son depositados en dos hoyos realizados sobre un gel tamponado de agarosa que se coloca en una cámara de electroforesis (corriente eléctrica). Al pasar la corriente eléctrica tanto el antígeno como el anticuerpo se mueven el uno hacia el otro y se reúnen formando una línea de precipitación. Ej.: detección de antígenos bacterianos en líquido Cefalorraquídeo.
- **Fijación de Complemento:** se fundamenta en dos propiedades del complemento, el complemento se utiliza (al ligarse) cuando sucede una reacción Ag-Ac y el complemento se requiere para que suceda la hemólisis de eritrocitos sensibilizados. La prueba consiste en dos reacciones Ag-Ac: el sistema no hemolítico y el sistema indicador de hemólisis. El primero está compuesto de antígeno y su correspondiente (probable) anticuerpo (suero problema); al que se añade complemento fresco y el segundo consiste en eritrocitos y Acs. antieritrocitos (hemolisinas) resultando en eritrocitos sensibilizados. Si sucede en la primera reacción, unión Ag-Ac, el complemento quedará ligado y al añadirse el sistema indicador no existirá complemento para poder ocasionar hemólisis (prueba positiva); pero si no existió unión Ag-Ac el complemento quedará libre de tal manera que al añadir el sistema indicador se observará hemólisis (prueba negativa). Ejemplo: se utiliza para detección de anticuerpos contra histoplasma, virus, etc.
- **Anticuerpos Fluorescentes:** en este procedimiento se marca un anticuerpo con una sustancia fluorescente como la fluoresceína isotiocianato formando lo que se denomina conjugado fluorescente. Existen dos métodos: la inmunofluorescencia directa (IFD), en que el anticuerpo marcado (conjugado) es usado para buscar directamente la presencia del antígeno en frotis o secciones de tejido y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) en la que el anticuerpo se hace reaccionar con el antígeno y recién sobre este anticuerpo se añade un anticuerpo (antiinmunoglobulina) marcado con fluoresceína. En ambos

casos los preparados se observan bajo un microscopio de fluorescencia, evidenciándose en los casos positivos una fluorescencia característica.

- **Radio inmunoensayo (RIE)** : se fundamenta en la competencia de un antígeno radiomarcado (con Iodo 125, Tritio, etc.) de concentración conocida con una concentración desconocida del mismo antígeno (problema) por los sitios de ligazón del respectivo anticuerpo, que se encuentra en una proporción constante. Si suponemos que 100 moléculas de anticuerpo ligan 100 moléculas de antígeno , luego al añadir 100 moléculas de antígeno radiomarcado y 100 moléculas sin marcar (problema) la mitad del antígeno marcado será desplazado del anticuerpo , formandose una relación de antígenos ligados/libres de 1:1 , por lo tanto ocurre una reducción del 50% en la ligazón del antígeno marcado si la concentración del antígeno en la muestra problema es exactamente la misma que la del antígeno marcado conocido. Otras relaciones de los antígenos ligados/libres pueden ser usados para determinar otras concentraciones del antígeno desconocido. Ejemplo: investigación de hormonas tiroideas.
- **Enzima inmunoensayo (ELISA o EIA)** : se marca un anticuerpo con una enzima (conjugado enzimático) que es utilizado para detectar un antígeno o un anticuerpo , para este último tiene que emplearse un anti anticuerpo marcado. Las enzimas más comunes son la fosfatasa alcalina o la peroxidasa. La actividad enzimática, después de concluida la reacción inmunológica , es evidenciada al añadir el respectivo substrato cromogénico (produce color) y detectado visualmente o por un fotolorímetro. Ejemplos: a) Detección de rotavirus en heces: requiere que el antígeno se ligue con dos moléculas de anticuerpo. Colocamos la muestra de heces , (conteniendo el antígeno viral) en un pocillo o tubo recubierto de anticuerpos contra rotavirus sucediendo la ligazón del antígeno con la 1era. molécula de anticuerpo, luego se añade Ac. marcado con peroxidasa contra rotavirus (2da. molécula de Ac.) que se unirá con la parte libre que queda del Ag. Viral (técnica del sándwich Ac-Ag-Ac marcado). Después se lava y se añade el substrato cromogénico como en el tubo queda enzima ligada en la reacción inmunológica se observará la presencia de un color azul que nos indicará positividad, pero si no existió reacción inmunológica en el paso de lavado se elimina todo resto de enzima y no se observará color. b) Detección de Acs. contra virus VIH : el suero del paciente conteniendo supuestamente el anticuerpo contra el virus se coloca en uno de los pozos de una placa grande para despistaje múltiple, en cuyo fondo se encuentra el virus VIH inactivado (antígeno), sucediendo la reacción Ag. viral Ac. del paciente, después se añade un anti anticuerpo o Ac. antiinmunoglobulina humana marcada con fosfatasa alcalina, que reaccionará con el anticuerpo del paciente que ya está ligado al Ag. Viral; luego se lava y se añade el substrato cromogénico evidenciándose color en caso de actividad, que se observa con fotolorímetro o visualmente.

C) SEROLOGIA DE LA SIFILIS

Prueba de VDRL (Venereal Disease Research Laboratory)

Fundamento: En los pacientes con sífilis existe en el suero un anticuerpo denominado reagina, que al reaccionar con el antígeno aislado de tejidos animales, denominado cardiolipina, se produce un fenómeno de floculación.

Reactivos

Existen en el comercio reactivos para preparar como los de BBL, Difco, etc.

Solución salina tamponada, que contiene cloruro de sodio al 1% a pH 6.

Antígeno de VDRL : es una solución que contiene cardiolipina 0.03%, colesterol y lecitina.

Preparación de la suspensión de antígeno:

- Los reactivos deben estar a temperatura ambiente.
- Colocar 0.4 ml de solución salina tamponada (SST) en el fondo de un frasco redondo de 30 ml.
- Se agrega 0.5 ml de antígeno gota a gota (empleando la mitad terminal de una pipeta de 1ml), teniendo cuidado que caiga sobre la SST, mientras se hace rotar el frasco sobre una superficie plana, describiendo un círculo de 5 cm de diámetro 3 veces por segundo.
- Se prosigue haciendo rotar el frasco por 10 segundos más.
- Añadir 4.1 ml de SST con una pipeta de 5ml.
- Tapar el frasco y agitar fuertemente por 10 segundos.
- El antígeno así preparado puede usarse por 24 horas.

Procedimiento

Cualitativo

- 1) Colocar 0.05 ml del suero problema inactivado sobre uno de los anillos de una placa de serología. Para inactivar el suero colocar por 30 minutos en un baño de agua a 56°C.
- 2) Se añade a cada suero una gota (1/60 ml o 0.017 ml) de la suspensión de antígeno, para tal fin puede utilizarse una aguja n° 18 que se le ha cortado justo debajo del bisel, debiendo gastarse 60, más o menos 2 gotas por ml, al ser calibrada con una jeringa de 2 ml.
- 3) Se coloca la lámina por 4 minutos, sobre un rotador de 180 rpm, que describe un círculo de 2cm de diámetro.

Resultados

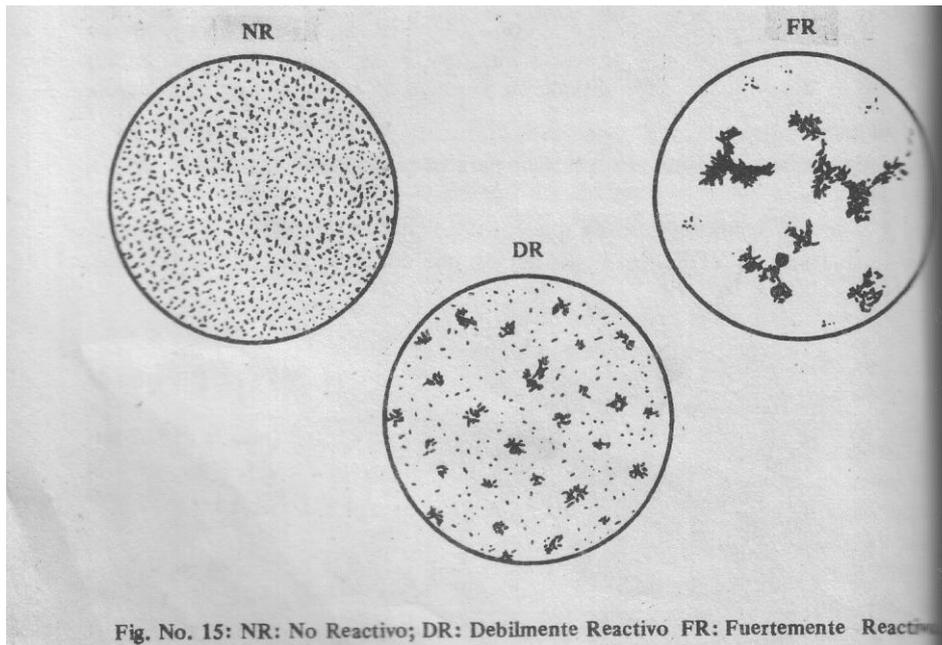
Leer bajo el microscopio con el objetivo de 10X para observar la presencia de grumos que semejan agrupaciones de bacilos cortos.

Presencia de grumos : Reactivo

No se observan grumos: No reactivo

Cuantitativo

- 1) Numerar 5 tubos y colocar en el tubo n°1 1 ml del suero problema.
- 2) En los tubos 2,3,4 y 5 colocar 0.5 ml de suero fisiológico.



- 3) Tomar 0.5 ml de suero del tubo n°1 y colocar en el tubo n°2 , mezclar bien, tomar 0.5 ml de esa solución y agregar al tubo n°3, mezclar y así sucesivamente hasta el tubo n° 5.
- 4) De esta manera tenemos que las diluciones del suero en orden creciente serán:
 Tubo n°1 = 1:1 (suero sin diluir: 1 dilución)
 Tubo n°2 = 1:2 (2 diluciones)
 Tubo n°3 = 1:4 (4 diluciones)
 Tubo n°4 = 1:8 (8 diluciones)
 Tubo n°5 = 1:16 (16 diluciones)
- 5) Tomando el contenido de cada tubo, realizar el mismo procedimiento que para una prueba cualitativa.

Resultados

Reportar la dilución más alta que resulte reactiva. Ejem. si hasta el tubo n°3 (4 diluciones) resulta reactivo pero ya no en el tubo n°4 , el resultado se informará como : Reactivo 4 diluciones.

D) AGLUTINACIONES PARA BRUCELLAS, SALMONELLA TIFICA Y SALMONELLAS PARATIFICAS AY B

Equipos y reactivos

- 1) Una placa de vidrio dividida en 5 columnas verticales y cada una de ellas subdivididas en 4 cuadrados.
- 2) Pipetas de 0.2 ml graduadas en centésimos.
- 3) Fuente de luz
- 4) Frascos goteros de antígenos: paratífico A, paratífico B, Brucella y para salmonella tífica se utilizan tífico O y tífico H.

Procedimiento

- 1) Cada columna de cuadrados servirá para cada antígeno.

- 2) Colocar en cada una de las 5 columnas en forma descendente: 0.04 ml, 0.02 ml, 0.01 ml y 0.05 ml del suero problema.
- 3) Añadir el antígeno respectivo verticalmente en cada una de las columnas de la siguiente manera:
 - 1era columna: 1 gota del antígeno a cada cuadrado
 - 2da. columna: 1 gota de antígeno H a cada cuadrado
 - 3era. columna : 1 gota de antígeno P.A. a cada cuadrado
 - 4ta. Columna: 1 gota del antígeno P.B. a cada cuadrado
 - 5ta. Columna: 1 gota del antígeno de Brucella a cada cuadrado
- 4) Mezclar con palillo de madera.
- 5) Movilizar la placa haciéndola oscilar con movimientos circulares por 3 minutos.
- 6) Observe la presencia de aglutinación, ayudándose con una fuente de luz y colocando la placa sobre un fondo negro.

Resultados:

Las cantidades de suero utilizados corresponden a las siguientes diluciones

0.04 ml de suero = 1/40

0.02 ml de suero = 1/80

0.01 ml de suero = 1/160

0.05 ml de suero = 1/320

Se debe informar para cada antígeno la dilución más alta que ocasiona una aglutinación franca. Ejemplo: si en el cuadrado conteniendo 0.02 ml de suero (dilución 1/80) y antígeno tífico H se produce aglutinación franca, pero ya no se observa en el siguiente cuadrado con 0.01 ml de suero (dilución 1/160), se informará que el suero problema es positivo en un título 1/80 para el antígeno tífico H de salmonella tífica.

E) PRUEBA DE EMBARAZO

Las pruebas de embarazo detectan la presencia en orina de hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (GCH), producida por el tejido trofoblástico Placentario durante la gestación o por tumores de origen trofoblástico en hombres y mujeres.

En la práctica diaria las pruebas que se utilizan mayormente se basan en la inhibición de la hemaglutinación o del látex. Comercialmente existen conjuntos de reactivos (kit) para realizar la prueba en tubo o en lámina, de diversas marcas , Gravindex, Pregnosticón, Planotest o Gamma.

Fundamento: se necesitan glóbulos rojos o partículas de látex cubiertas con GCH (servirán de antígeno) y un suero anti GCH (anticuerpos contra GCH).

Cuando la orina no contiene GCH al mezclarse con el suero anti GCH no sucede nada , pero al añadir los glóbulos rojos o las partículas de látex cubiertas con GCH sucede una reacción antígeno anticuerpo visualizándose una aglutinación (prueba negativa)

Si la orina contiene GCH al reaccionar con el suero anti GCH, lo neutraliza , pero no se visualiza y finalmente al agregar los glóbulos rojos o las partículas de látex no sucede ninguna reacción (prueba positiva).

Procedimiento en placa

Seguir las indicaciones de cada fabricante para la obtención de buenos resultados.

El procedimiento usual en lámina es como sigue:

- 1) La muestra de orina debe ser tomada como para examen de orina completa y de preferencia procesar antes de las 12 horas, en caso contrario refrigerarse hasta por 24 horas.
- 2) Con un dispensador descartable colocar una gota de orina en una lámina e fondo oscuro.
- 3) Añadir una gota de suero anti GCH, mezclar y luego oscilar la lámina circularmente por 30 segundos.
- 4) Añadir una gota de partículas de látex cubiertas con GCH, mezclar luego oscilar la lámina por 2 minutos y observar la presencia de aglutinación.

Resultados: Aglutinación: Negativo (no existe gestación)

No aglutinación: Positivo (gestación)

F) DOSAJE SEMICUANTITATIVO DE GCH

Pueden realizarse pruebas semicuantitativas para el dosaje de Gonadotrofina Coriónica Humana (GCH) en orina de 24 horas. Debe conocerse la sensibilidad del reactivo y seguir las indicaciones del fabricante.

Procedimiento

- 1) Recolectar orina de 24 horas, conservada en refrigeradora, medir el volumen total, mezclar bien y tomar una muestra representativa para la prueba.
- 2) Realizar en tubos diluciones de la orina con agua destilada como sigue: al 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 , etc.
- 3) Con el contenido de cada tubo realizar una prueba de embarazo

Resultados

La dilución más alta que ocasione un resultado positivo nos indicará la cantidad de GCH, aplicando los siguientes cálculos:

V= ml de orina en 24 hrs.

D = dilución de orina . Ej. 2,4,8,16, etc

S = sensibilidad de la prueba. Ej. 1,1.5, 3 UI/ml de orina (especificado por cada fabricante)

UI de GCH/24 horas = $V \times D \times S$

Ejemplo: si la paciente trajo 1,500 ml de orina de 24 hrs., la sensibilidad de la prueba es de 1UI de GCH/ml de orina y la prueba resultó positiva hasta el tubo 1/16 = dilución 16 , los cálculos serían :

UI/24hrs = $1500 \times 16 \times 1$

UI/24hrs = 24,000

G) FACTOR REUMATOIDEO (FR)

Fundamento: el FR es un anticuerpo IgM dirigido contra un anticuerpo IgG, por lo tanto es un anti anticuerpo y se encuentra en el 80% de los sueros de pacientes con artritis reumatoide.

Se determina con una prueba de látex, utilizando glóbulos rojos o partículas de látex cubiertos con IgG que al reaccionar con el FR (anti IgG) , del suero problema ,se produce un fenómeno de aglutinación.

Procedimiento

Existen en el comercio conjuntos de reactivos preparados (seguir las instrucciones del fabricante), usualmente se realizan los siguientes pasos:

- 1) Usar suero fresco; conservado en refrigeradora, diluyéndose antes de usar al 1:20 con tampón de glicina.
- 2) Colocar 1 gota del suero diluido en uno de los círculos de una placa serológica con fondo negro y agregar 1 gota del reactivo de látex cubierto con inmunoglobulina G, previamente bien agitado.
- 3) Mezclar con un palillo y balancear la placa en forma circular por 2 minutos.

Resultados

Observar la presencia de aglutinación:

Suspensión homogénea lechosa = Negativo

Aglutinación franca : Positivo

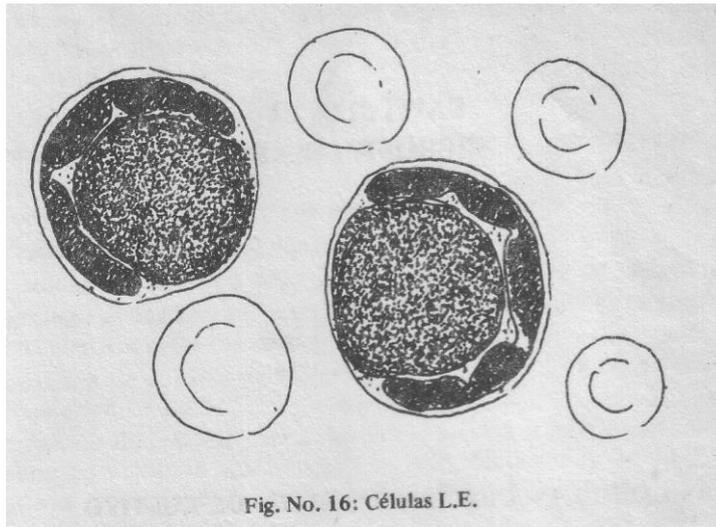
Nota: debe incluirse sueros controles positivos y negativos.

H) CELULAS DE LUPUS ERITEMATOSO (células LE)

Fundamento : Un anticuerpo IgG (Factor LE) presente en el suero o plasma del paciente, reacciona contra la nucleoproteína liberada de algunos leucocitos dañados durante la prueba. El complejo nucleoproteína – anticuerpo con la presencia de complemento es fagocitado por un leucocito neutrófilo o monocito resultando la formación de la célula LE.

Procedimiento

- 1) Tomar en un tubo 7 ml de sangre venosa y colocar en estufa a 37°C por 30 minutos o a temperatura ambiente por 2 horas.
- 2) Pasar todo el contenido del tubo (coágulo y suero) a través de un colador de alambre de cobre, con la ayuda de una bagueta, hacia otro recipiente colocado debajo.
- 3) El material así filtrado se coloca en varios tubos de hematocrito de Wintrobe.
- 4) Centrifugar los tubos por 5 minutos a 2,000 rpm.
- 5) Descartar el suero sobrenadante con una pipeta Pasteur hasta 2 mm sobre la capa blanca de leucocitos.
- 6) Luego se extrae la capa blanca , se realizan frotices en varias láminas y se colorean con Wright.



Resultados: deben encontrarse dos o más células LE en la lámina para ser considerada positiva.

Las células LE se observan como un neutrófilo o monocito cuyo núcleo se halla aplanado y desplazado hacia la periferie, por haber fagocitado una masa abalonada, homogénea, de color rosado violáceo , generalmente de mayor tamaño que un hematíe.

