



MINISTERIO DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

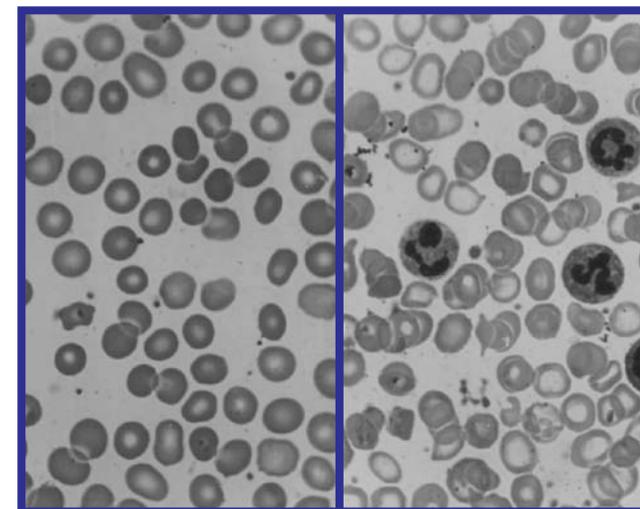
CENTRO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

República del Perú



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO EN TÉCNICAS BÁSICAS DE HEMATOLOGÍA

Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública



SERIE DE
NORMAS TÉCNICAS Nº 40



Instituto Nacional de Salud

Calle Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú

Apartado Postal 471 Teléfono: (0511) 471-9920 Fax: (0511) 471-0779

Correo electrónico: revmedex@ins.gob.pe

Página web: www.ins.gob.pe

Ministerio de Salud
Ministro

Dra. Pilar Mazzetti Soler

Viceministro

Dr. José Del Carmen Sara

Instituto Nacional de Salud
Jefe

Dr. César Náquira Velarde

Subjefe

Dr. César Cabezas Sánchez

Centro Nacional de Salud Pública
Director General

Dr. Víctor Suárez Moreno

Centro Nacional de Alimentación y
Nutrición
Director General

Dr. José Alejandro Ormachea Frisancho

Centro Nacional de Control de Calidad
Director General

Dr. Pedro Álvarez Falconí

Centro Nacional de Productos
Biológicos

Director General

Dr. Ricardo López Ingunza

Centro Nacional de Salud Intercultural
Director General

Dr. Oswaldo Salaverry García

Centro Nacional de Salud Ocupacional y
Protección del Medio Ambiente para la
Salud

Director General

Dr. Rolando Medina Chávez

Comité Editor
Instituto Nacional de Salud

Editor

Dr. César Cabezas Sánchez

Editor Asociado

Blgo. Rufino Cabrera Champe

Miembros

Dr. Pedro Álvarez Falconí

Dr. Zuño Burstein Alva

Dr. Eduardo Falconí Rosadio

Dr. Jorge González Mendoza

Dr. Alfredo Guillén Oneeglio

Dr. Oswaldo Salaverry García

Blgo. Miguel Cobos Zelada

Lic. Graciela Rengifo García

Nut. Rocío Valenzuela Vargas

Dr. Javier Vargas Herrera

Corrector de Estilo

Lic. Daniel Cárdenas Rojas

Coordinadora Administrativa

Lic. Gloria Aragonés Alosilla

Asistente Editorial

Lic. Melissa Daga Caycho



MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

República del Perú



**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO
EN TÉCNICAS BÁSICAS DE HEMATOLOGÍA**

ELABORACIÓN:

T. M. MARÍA MUÑOZ ZAMBRANO
Dra. CECILIA MORÓN CORTIJO

Catalogación hecha por el Centro de Documentación e Información
del Instituto Nacional de Salud (INS)

Muñoz Zambrano, María E.; Morón Cortijo, Cecilia G.
Manual de procedimientos de laboratorio en técnicas básicas de hematología / Elaborado
por María E. Muñoz Zambrano y Cecilia G. Morón Cortijo. -- Lima: Ministerio de
Salud, Instituto Nacional de Salud, 2005.
88 p.: 15 cm. -- (Serie de Normas Técnicas; 40)

1. HEMATOLOGÍA / métodos 2. LABORATORIOS/normas 3. TÉCNICAS Y
PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO 5. PERÚ
I. Muñoz Zambrano, María E.
II. Morón Cortijo, Cecilia G.
III. Instituto Nacional de Salud (Perú)
IV. Perú. Ministerio de Salud

ISBN 9972- 857 - 26 - 3 (O.C.)

ISBN 9972- 857 - 46 - 8 (N° 40)

ISSN 1607- 4904

Hecho el Depósito Legal N° 1501012005-1347

© Ministerio de Salud, 2005

Av. Salaverry, cuadra 8 s/n, Jesús María, Lima, Perú

Teléfono: (511) 431-0410

© Instituto Nacional de Salud, 2005

Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú

Teléfono: (511) 471-9920 Fax: (511) 471-0179

Correo electrónico: revmedex@ins.gob.pe

Página web: www.ins.gob.pe

Publicación aprobada con R.J. N° 111-2005-J-OPD/INS

Portada: A: Células rojas mostrando hipercromía.

B: Células blancas mostrando el "palillo de tambor".

Se autoriza su reproducción total o parcial, siempre y cuando se cite la fuente.

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| Presentación | 7 |
| Introducción | 9 |
| | |
| SECCIÓN 1: GENERALIDADES | 11 |
| 1.1 Objetivo | 11 |
| 1.2 Campo de aplicación | 11 |
| 1.3 Responsabilidades | 11 |
| 1.4 Documentos de referencia | 12 |
| | |
| SECCIÓN 2: MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD | 13 |
| | |
| SECCIÓN 3: OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS | 14 |
| 3.1 Objetivo | 14 |
| 3.2 Obtención de sangre venosa con jeringa | 14 |
| 3.3 Obtención de sangre venosa en tubos al vacío | 16 |
| 3.4 Obtención de sangre de la vena yugular externa | 18 |
| 3.5 Obtención de sangre capilar | 19 |
| | |
| SECCIÓN 4: ANTICOAGULANTES | 22 |
| 4.1 Características básicas de los anticoagulantes más usados en hematología | 22 |
| 4.2 Anticoagulantes sólidos | 22 |
| 4.3 Anticoagulantes líquidos | 24 |
| | |
| SECCIÓN 5: REALIZACIÓN Y TINCIÓN DEL FROTIS SANGUÍNEO | 25 |
| 5.1 Método de los dos portaobjetos | 25 |
| 5.2 Coloraciones usadas | 26 |
| 5.3 Tinción con colorante de Wright | 27 |
| | |
| SECCIÓN 6: HEMOGRAMA- HEMOGLOBINA- HEMATOCRITO | 29 |
| 6.1 Recuento leucocitario | 29 |
| 6.2 Recuento de glóbulos rojos | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 6.3 Determinación del volumen globular (Hto)..... | 35 |
| 6.4 Dosaje de hemoglobina..... | 38 |
| 6.5 Frotis de sangre periférica..... | 40 |
| 6.6 Fórmula leucocitaria..... | 41 |
| SECCIÓN 7: VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN..... | 43 |
| 7.1 Método de Westergren..... | 43 |
| 7.2 Método de Wintrobe..... | 44 |
| SECCIÓN 8: PERFIL DE HEMOSTASIA..... | 45 |
| 8.1 Principios generales..... | 45 |
| 8.2 Mecanismo de coagulación..... | 45 |
| 8.3 Exploración de la coagulación..... | 46 |
| 8.4 Obtención del plasma..... | 46 |
| 8.5 Tiempo de sangría..... | 47 |
| 8.5.1 Método de Ivy..... | 48 |
| 8.5.2 Método de Duke..... | 49 |
| 8.6 Tiempo de coagulación de sangre total (TCST)..... | 51 |
| 8.7 Tiempo de tromboplastina parcial activada (PTTK)..... | 54 |
| 8.8 Tiempo de trombina..... | 55 |
| 8.9 Tiempo de protrombina (Prueba de Quick)..... | 56 |
| SECCIÓN 9: RECUENTO DE RETICULOCITOS Y PLAQUETAS..... | 58 |
| 9.1 Recuento de reticulocitos..... | 58 |
| 9.2 Recuento de plaquetas..... | 60 |
| SECCIÓN 10: LEUCOGRAMA..... | 63 |
| 10.1 Granulocitos..... | 63 |
| 10.2 Agranulocitos..... | 65 |
| 10.3 Criterios para el desarrollo de un leucograma..... | 67 |
| SECCIÓN 11: ALTERACIONES ERITROCITARIAS..... | 79 |
| Alteraciones en el tamaño..... | 70 |
| Alteraciones en la forma..... | 71 |

| | |
|--|-----------|
| Alteraciones de color | 72 |
| Inclusiones anormales | 73 |
| BIBLIOGRAFÍA | 79 |
| ANEXO A: Preparación de colorantes y soluciones más usados en hematología | 81 |
| ANEXO B: Preparación de anticoagulantes | 85 |

PRESENTACIÓN

Con el propósito de uniformizar los procedimientos hematológicos que se realizan en los diversos laboratorios clínicos, el Instituto Nacional de Salud pone a disposición de la comunidad técnico-científica nacional el *Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología*, en el cual se incluyen todos los métodos empleados en el campo hematológico básico. De este modo se contribuye a mejorar la calidad de diagnóstico en los laboratorios de los servicios de salud.

El laboratorio de hematología cuenta con dos áreas básicas: Área de Hematimetría (hemograma, VSE, recuento de plaquetas, etc.) y Área de Hemostasia. Partiendo de esta estructura, en este manual nos referiremos a las técnicas básicas empleadas en estas áreas partiendo de la toma de muestra hasta la realización de las pruebas respectivas.

Es necesario enfatizar que para obtener resultados más confiables es importante, pero no imprescindible, automatizar el laboratorio, debido a que ello evitará el posible error humano, sobre todo en lo referente a recuentos celulares, valores de hemoglobina y constantes corpusculares ya que en estas variables se trabaja con cantidades exactas de sangre, hecho que es muy difícil de lograr cuando se usan los métodos manuales, lo mismo sucede al tratarse de las pruebas de hemostasia.

Esperamos que este manual constituya una herramienta de consulta en la Red Nacional de Laboratorios de Salud, además de una guía para el personal de laboratorio en general.

INTRODUCCIÓN

El presente manual ha sido elaborado en forma simple, didáctica y eminentemente práctica para que su contenido sea fácil de entender por el personal que labora en el laboratorio de hematología.

Se divide en tres partes:

1. En la primera parte se presentan los aspectos más importantes de la bioseguridad en el laboratorio.
2. En la segunda parte se exponen las principales técnicas básicas del laboratorio de hematología.
3. En la tercera parte se detallan las alteraciones más frecuentes de la serie roja y de la serie blanca de un hemograma.

El objetivo principal es protocolizar y estandarizar los procedimientos hematológicos que empiezan con la toma de muestra (siguiendo las pautas de control de calidad preanalítica) hasta el procesamiento de ésta (fase analítica) en la determinación correspondiente, y por último, en la emisión de los resultados (fase postanalítica). Debemos recalcar que cuando se realizan pruebas de hemostasia debe tenerse en consideración los cuidados comunes a toda prueba de laboratorio, es decir, las muestras deben obtenerse en condiciones apropiadas y rotularse debidamente. Esperamos que el presente manual sirva de guía efectiva y que pueda ser enriquecido con nuevos aportes con la finalidad de alcanzar un trabajo de calidad.

SECCIÓN 1

GENERALIDADES

1.1 OBJETIVO

Establecer y estandarizar los procedimientos básicos de un examen de hemograma, hemoglobina, hematocrito, recuento de plaquetas, velocidad de sedimentación y recuento de reticulocitos que sirvan de ayuda diagnóstica al clínico.

1.2 CAMPO DE APLICACIÓN

La aplicación de las técnicas hematológicas nos sirve para estandarizar los procedimientos a nivel nacional y para que sea de utilidad al personal técnico y profesional de los laboratorios clínicos.

1.3 RESPONSABILIDADES

- 1.3.1 El Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública, a través de su Dirección Ejecutiva de Laboratorios de Referencia, es responsable de autorizar la elaboración, la revisión y la actualización del presente manual, de acuerdo con los procedimientos aprobados por el Instituto Nacional de Salud.
- 1.3.2 Los directores de los establecimientos de salud son responsables de autorizar, proporcionar los recursos necesarios, y designar al personal responsable para la aplicación de las disposiciones contenidas en el presente manual.
- 1.3.3 El personal de los establecimientos de salud es responsable de planificar las acciones, organizar, controlar y capacitar al personal para cumplir las disposiciones contenidas en el presente manual.
- 1.3.4 Los jefes o responsables de los laboratorios deben asegurar el control interno de la calidad, la idoneidad del personal, equipos, materiales, reactivos e instalaciones.
- 1.3.5 El personal médico, profesional y técnico, es responsable de seguir las especificaciones contenidas en el presente manual y aplicar los procedimientos específicos indicados.

1.4 DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- 1.4.1 *Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud.* Organización Panamericana de la Salud. Publicación científica N° 439. N° 2, 1983.
- 1.4.2 *Manual de normas de bioseguridad.* Instituto Nacional de Salud. Serie de Normas Técnicas N° 18. 2.ª ed., 1997.

SECCIÓN 2

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

2.1 Para la obtención de muestras, el personal involucrado en los diferentes procesos para los exámenes hematológicos debe aplicar las medidas de bioseguridad establecidas en el *Manual de Bioseguridad*. Serie de Normas Técnicas N° 18.

2.2 Se debe controlar sobre todo:

2.2.1 Al personal que trabaja en el laboratorio de hematología.

2.2.2 El proceso de coloración en el que se debe aplicar las medidas de bioseguridad correspondientes al uso y manipulación de sustancias tóxicas o cancerígenas.

2.2.3 Ver lo referente a medidas de protección en caso de accidentes por inoculación.

SECCIÓN 3

OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

3.1 OBJETIVO

Establecer y uniformizar criterios en el procedimiento de obtención de muestras sanguíneas con un adecuado control de calidad, ya que de ello depende que el resultado del análisis de la muestra sea el correcto. Se efectuará en ayunas o no, dependiendo de la prueba a usar.

3.2 OBTENCIÓN DE SANGRE VENOSA CON JERINGA

3.2.1 Materiales y equipos requeridos

3.2.1.1 Algodón.

3.2.1.2 Alcohol al 70%.

3.2.1.3 Ligadura o torniquete de 25 a 30 cm de largo.

3.2.1.4 Jeringas de 5 mL.

3.2.1.5 Viales con anticoagulante EDTA.

3.2.2 Obtención de la muestra

3.2.2.1 Verificar que los elementos por utilizar estén listos, y que el paciente se sienta cómodo.

3.2.2.2 Aplicar el torniquete aproximadamente cuatro dedos por encima de la flexión del codo o a 10 cm del codo, sujetar con un medio nudo (Fig. 1).

3.2.2.3 Limpiar la zona con alcohol al 70% o alcohol yodado, en un área de 2 pulgadas (Fig. 2).

3.2.2.4 El paciente deberá abrir y cerrar la mano durante unos segundos y después la mantendrá cerrada, esto ayudará a visualizar las venas superficiales (Fig. 3).

3.2.2.5 Se retira el estuche protector de la aguja y se coge la jeringa de tal manera que el bisel se encuentre hacia arriba (Fig. 4).

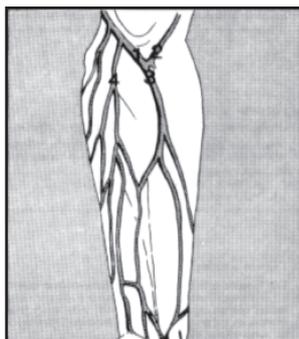
3.2.2.6 Se coloca la aguja en dirección paralela a la vena, se perfora la piel haciendo avanzar la aguja 0,5-1 cm en el tejido subcutáneo, luego se perfora la vena (Fig. 5).

- 3.2.2.7 Se aspira la jeringa hasta el volumen requerido.
- 3.2.2.8 Retirar el torniquete e indicar al paciente que deje de hacer puño. Se coloca el algodón seco encima de la punción y se retira la aguja (Fig. 6).
- 3.2.2.9 Retirar la aguja de la jeringa. Verter la muestra lentamente por las paredes del vial con anticoagulante. No olvidar colocar una gota en la lámina portaobjeto para realizar el frotis.
- 3.2.2.10 Agitar el vial en círculos sobre la mesa para homogeneizar la muestra con el anticoagulante.

PUNTOS PARA LA EXTRACCIÓN DE SANGRE

(Toma de muestra)

Se obtiene de las venas de la fosa cubital



PROCEDIMIENTO

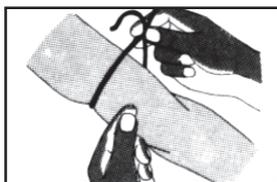


Fig. 1

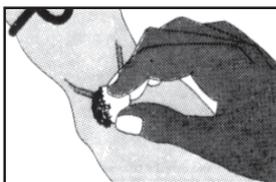


Fig. 2

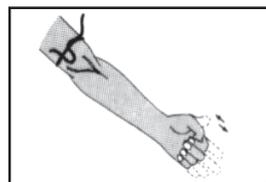


Fig. 3

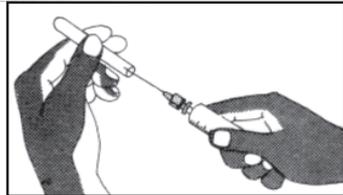


Fig. 4

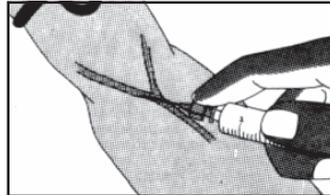


Fig. 5

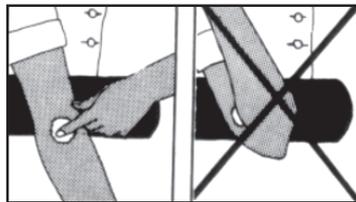


Fig. 6

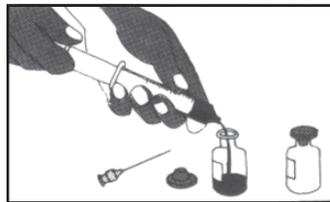


Fig. 7

3.3 OBTENCIÓN DE SANGRE VENOSA EN TUBOS AL VACÍO

3.3.1 Materiales requeridos

3.3.1.1 Algodón.

3.3.1.2 Alcohol al 70%.

3.3.1.3 Ligadura o torniquete de 25 a 30 cm de largo.

3.3.1.4 Tubos al vacío con anticoagulante EDTA (K_3), EDTA (Na_2) u otro anticoagulante.

3.3.1.5 Aguja con dispositivo para extracción de sangre al vacío:

- Nº 21 para adultos.
- Nº 22 para niños y neonatos.

De preferencia, ambas de bisel corto para evitar la coagulación.

3.3.2 Obtención de la muestra

- 3.3.2.1** Repetir los pasos de 3.2.2.1 a 3.2.2.4.
- 3.3.2.2** Se retira el estuche protector de la aguja y éste se enrosca al dispositivo para extracción de sangre al vacío.
- 3.3.2.3** Colocar la ligadura cuatro dedos por encima de la flexión del codo o 10 cm por encima de éste y pedir al paciente que abra y cierre la mano varias veces, para favorecer la dilatación de las venas.
- 3.3.2.4** Una vez escogida la vena, desinfectarla con una pieza de algodón embebido en etanol al 70%.
- 3.3.2.5** Se coloca la aguja en dirección paralela a la vena, se perfora la piel haciendo avanzar la aguja entre 0,5 cm y 1 cm en el tejido subcutáneo, se inserta el tubo al vacío por la parte posterior y no preocuparse por la cantidad de sangre extraída ya que el mismo sonido del vacío avisará que la extracción terminó (Fig. 8).
- 3.3.2.6** Retirar la ligadura tirando del extremo doblado.
- 3.3.2.7** Colocar un pedazo de algodón seco sobre la parte donde se encuentra oculta la aguja. Sacar la aguja con un movimiento rápido y depositarla en el recipiente de metal con desinfectante (Fig. 9).
- 3.3.2.8** Pedir al paciente que presione firmemente el algodón durante 3 minutos, con el brazo extendido. No se recomienda que se flexione el brazo a causa del riesgo que se forme un hematoma.
- 3.3.2.9** Mezclar por inmersión suave la sangre con el anticoagulante contenido en el tubo. No agitar el contenido.

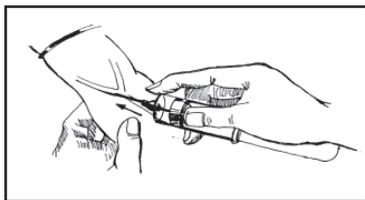


Fig. 8

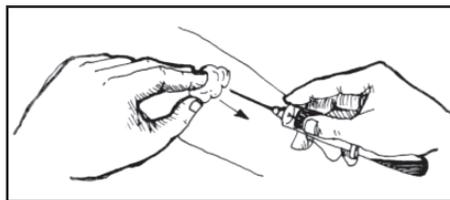


Fig. 9

3.3.3 Ventajas de una extracción de sangre venosa

3.3.3.1 Pueden hacerse repetidos exámenes con la misma muestra.

3.3.3.2 Parte de la muestra (plasma o suero) puede congelarse para referencia futura.

3.3.4 Desventajas de una extracción de sangre venosa

3.3.4.1 La punción venosa, por su largo procedimiento, requiere mayor preparación que el método capilar.

3.3.4.2 El método es técnicamente difícil en niños, individuos obesos y pacientes en shock.

3.3.4.3 La hemólisis debe ser evitada, pues se puede obtener una disminución en el recuento de eritrocitos.

3.3.4.4 Debe evitarse prolongada estasis venosa producida por el torniquete, pues produce hemólisis y otros cambios que ponen la sangre en un estado inadecuado para el análisis de gases, recuentos celulares, determinación de pH sanguíneo y algunas pruebas de coagulación.

3.3.4.5 La sangre anticoagulada si no es de obtención reciente no debe ser utilizada en extensiones de sangre, pues algunos anticoagulantes producen cambios en las plaquetas que pueden causar aglutinaciones, agregación plaquetaria y dificultan la identificación de leucocitos.

3.3.4.6 Puesto que algunos de los componentes de la sangre no son estables, los recuentos de leucocitos y plaquetas e índice de sedimentación deben realizarse antes de que pasen dos horas desde que se obtuvo la muestra.

3.4 OBTENCIÓN DE SANGRE DE LA VENA YUGULAR EXTERNA

3.4.1 Materiales requeridos

3.4.1.1 Algodón.

3.4.1.2 Alcohol al 70%.

3.4.1.3 Jeringas de 5 mL.

3.4.1.4 Viales con anticoagulante EDTA.

3.4.2 Obtención de la muestra

3.4.2.1 El paciente es cubierto por una sábana de manera que los brazos permanezcan inmovilizados a lo largo del cuerpo.

- 3.4.2.2** Al paciente se le coloca de cúbito dorsal sobre la mesa de examen o una camilla, de manera que la cabeza cuelgue sobre el final de la mesa y el cuerpo sea sujetado por un asistente.
- 3.4.2.3** Cuando el paciente grita la vena yugular externa se marca claramente.
- 3.4.2.4** Limpiar la zona en un área de 2 pulgadas con alcohol al 70% o alcohol yodado.
- 3.4.2.5** Se repiten los pasos de 3.2.2.5 a 3.2.2.7 de la extracción de sangre venosa con jeringa.
- 3.4.2.6** Retirar la aguja de la vena y presionar suavemente con un algodón seco, aproximadamente de 3 a 5 minutos. Pedir al paciente que permanezca echado diez minutos.
- 3.4.2.7** Se repiten los pasos de 3.2.2.9.
- 3.4.2.8** Se repiten los pasos de 3.2.2.10.

3.4.3 Ventajas

Constituye un buen método para la obtención de sangre en pacientes con shock con venas colapsadas.

3.4.4 Desventajas

Por lo delicado en su procedimiento no se recomienda como rutina, sólo en casos en que no se pueda obtener la muestra por métodos convencionales.

3.5 OBTENCIÓN DE SANGRE CAPILAR

Cuando la cantidad de sangre que se precisa es muy pequeña o cuando por diferentes motivos no pueda practicarse una punción venosa, debe recurrirse a la punción capilar.

3.5.1 Materiales requeridos

- 3.5.1.2** Algodón.
- 3.5.1.3** Alcohol al 70%.
- 3.5.1.4** Lancetas desechables (Fig. 10).

3.5.1.5 Papel filtro N° 2.

3.5.2 Procedimiento (Fig. 11):

3.5.2.1 La sangre capilar se obtiene de la cara lateral del dedo medio o anular en los adultos y del dedo gordo del pie o talón en los niños.

3.5.2.2 Desinfectar la zona con alcohol al 70%, secar con algodón estéril.

3.5.2.3 Punzar la piel con una lanceta estéril desechable (2 mm de profundidad).

3.5.2.4 Usar gasa estéril para desechar la primera gota y recoger las siguientes en tubos capilares. Evitar comprimir la extremidad para obtener sangre porque se altera la composición sanguínea.

3.5.3 Ventajas

3.5.3.1 Puede obtenerse con facilidad.

3.5.3.2 Es preferible cuando han de realizarse extensiones de sangre periférica.

3.5.4 Desventajas

3.5.4.1 Sólo se pueden obtener pequeñas cantidades de sangre y los exámenes de repetición requieren nuevas muestras.

3.5.4.2 La sangre en microtubos (capilares) frecuentemente se hemoliza interfiriendo con la mayoría de pruebas de laboratorio.

3.5.4.3 Los resultados obtenidos en pruebas con sangre capilar no pueden ser comparados con los resultados de las pruebas con sangre venosa.

3.5.4.4 El dedo no sólo es delicado sino difícil de desinfectar adecuadamente en el tiempo disponible.

3.5.4.5 En pacientes con resistencia disminuida a la infección (aquellos con leucemia, agranulocitosis, diabetes, uremia y enfermedades con deficiencias inmunológicas), una muestra tomada del dedo es mucho más probable que conduzca a una infección que otra tomada del brazo.

3.5.4.6 El recuento de eritrocitos y leucocitos, así como el recuento de plaquetas y reticulocitos, no debe realizarse en sangre capilar debido a la difícil estandarización del flujo sanguíneo capilar.

EXTRACCIÓN DE SANGRE CAPILAR

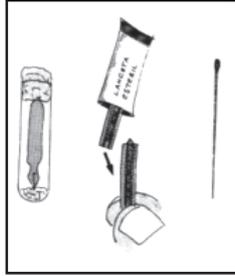


Fig. 10

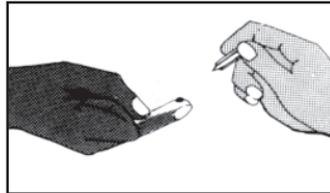


Fig. 11

SECCIÓN 4

ANTICOAGULANTES

Una vez extraída la sangre, ésta puede conservarse coagulada o mantenida incoagulable mediante la adición de un anticoagulante.

4.1 CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE LOS ANTICOAGULANTES MÁS USADOS EN HEMATOLOGÍA

- No alterar el tamaño de los hematíes.
- No producir hemólisis.
- Evitar al máximo la agregación plaquetaria.
- No alterar la morfología de los leucocitos.

La sangre tratada con anticoagulante debe procesarse lo antes posible, incluso mantenida bajo refrigeración (4 °C) si no pasan de las 2 horas. El tiempo máximo entre la extracción de la sangre y su procesamiento depende del coagulante de elección y no debe ser más de 4 horas, a excepción del anticoagulante EDTA (etilendiaminotetracético) que puede ser hasta 24 horas (en refrigeración a 4 °C).

Los anticoagulantes pueden emplearse en forma sólida o líquida. Los primeros están indicados para la determinación de los parámetros hematológicos, ya que no producen, como los anticoagulantes líquidos, dilución de la sangre.

4.2 ANTICOAGULANTES SÓLIDOS

4.2.1 EDTA

Es la sal disódica o tripotásica del ácido etilendiaminotetracético. La sal disódica (Na₂EDTA) es menos soluble que la sal tripotásica (K₃EDTA). Estos compuestos realizan su acción a través de un efecto quelante sobre el calcio, al fijarlo impiden su activación y, por ende, la coagulación sanguínea.

4.2.1.1 Ventajas

- Respeto la morfología eritrocitaria (especialmente la sal tripotásica) y leucocitaria, de manera que permite una demora de dos horas en la realización del frotis sanguíneo después de la extracción sanguínea.
- Asegura la conservación de los elementos formes sanguíneos durante 24 horas si la sangre se mantiene a 4 °C.
- Al inhibir la aglutinación de las plaquetas, facilita su recuento o su expresión semicuantitativa a partir del frotis.
- La concentración recomendada de EDTA es de 1,5 mg/mL de sangre. Una mayor cantidad de anticoagulante puede producir retracción celular, con disminución del hematocrito, y un aumento de la concentración media de la hemoglobina. Un exceso de sangre con relación al anticoagulante produce formación de microagregados que pueden alterar los resultados. El empleo de tubos al vacío con una gota (50 μ L) de EDTA tripotásica comercial para 5 mL de sangre es de interés práctico dado que es cien veces más soluble facilitando la mezcla de sangre con anticoagulante.

4.2.1.2 Desventajas

Usado en exceso afecta a los eritrocitos y a los leucocitos, a los cuales les produce encogimiento y cambios en su forma, por ello debe cuidarse de agregar la cantidad correcta de sangre al anticoagulante.

4.2.2 Anticoagulante de Wintrobe

Es una mezcla de oxalato de amonio y potasio. Actúa por precipitación del calcio, es fácil de preparar. Se emplea en forma de polvo en proporción de 2 de oxalato de amonio por 1 de oxalato de potasio. La cantidad recomendada es de 2 mg x mL de sangre. Este anticoagulante no afecta el volumen globular medio y puede usarse para determinaciones de hemoglobina, hematocrito y recuento globular, pero para los extendidos queda limitada a los primeros minutos, tampoco es útil para el recuento plaquetario porque produce formación de agregados plaquetarios.

4.2.3 Heparina

El nombre de heparina proviene del griego *hepar*, que significa hígado, ya que fue aislado por primera vez de las células de este tejido. Es un mucopolisacárido ácido. Presenta el inconveniente de que si no se agita rápidamente con la sangre después de extraída pueden formarse microcoágulos, aunque no altera el volumen eritrocitario ni la morfología de los leucocitos. No es recomendable para el frotis sanguíneo porque produce un fondo azul en la lámina.

La heparina de sodio o litio puede usarse en forma sólida o líquida, en proporción de 0,1 - 0,2 mg de heparina por 1 mL de sangre.

4.3 ANTICOAGULANTES LÍQUIDOS

4.3.1 Citrato trisódico

Es de elección para las pruebas de hemostasia y la velocidad de sedimentación. Actúa a través de la precipitación del calcio. La concentración depende de la prueba por realizar.

- Para pruebas de hemostasia se emplea en proporción de 1: 9 (0,5 mL de anticoagulante para 4,5 mL de sangre total).
- Para la determinación de la VSG (Velocidad de Sedimentación Globular) es 1:4 (0,5 mL de anticoagulante para 2 mL de sangre).

4.3.2 Oxalato sódico

Recomendado también para las pruebas de hemostasia. Se emplea en proporción de un volumen de anticoagulante para 4 vol. de sangre.

SECCIÓN 5

REALIZACIÓN Y TINCIÓN DEL FROTIS SANGUÍNEO

La práctica del frotis sanguíneo, también llamado extendido, es de gran importancia en hematología ya que el diagnóstico de muchas enfermedades hematológicas puede realizarse con sólo observar las características morfológicas de las células sanguíneas, de manera que éste no debe ser excesivamente grueso ni excesivamente fino. Todas las láminas por usar, sobre todo nuevas, deben ser limpiadas con algodón y alcohol al 70% para eliminar la grasa que viene adherida.

5.1 MÉTODO DE LOS DOS PORTAOBJETOS

5.1.1 Materiales

- Alcohol al 70%.
- Algodón.
- Lanceta descartable.
- Portaobjetos de vidrios limpios y desgrasados (25 x 75 mm).

5.1.2 Fundamento

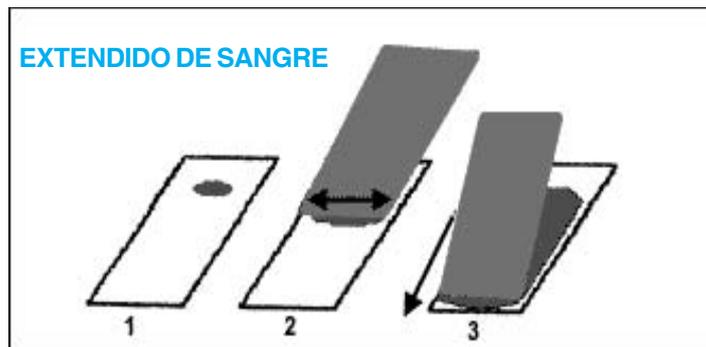
Consiste en la extensión de una gota de sangre sobre un portaobjeto (25 x 75), empleando el canto biselado de otro portaobjeto de igual dimensión (Fig. 12).

5.1.3 Procedimiento

- 5.1.3.1** Una vez extraída la sangre con cualquiera de las metodologías, se coloca una pequeña gota de sangre (5 μ L) (aprox. 3 mm de diámetro) sobre un portaobjeto a 2 cm aproximadamente de uno de los extremos.
- 5.1.3.2** Colocar el canto de otro portaobjeto esmerilado sobre la superficie del primer portaobjeto (en la que se encuentra la gota de sangre) formando un ángulo de 45°.
- 5.1.3.4** Deslizar suavemente y a velocidad moderada el portaobjeto sobre el otro en sentido longitudinal, hasta que la gota de sangre quede bien extendida sobre la superficie del primer portaobjeto. El grosor del

frotis sanguíneo puede variar según sea el ángulo que formen entre sí ambos portaobjetos. Así, si es superior a 45° , la extensión obtenida será gruesa y corta, si es inferior a 45° será larga y fina. El secado del frotis es a temperatura ambiente y en posición horizontal.

Fig. 12



- ❖ **Zona excesivamente gruesa:** Se halla en la región inmediata al punto de partida de la extensión (cabeza). En ella se aprecia siempre un aumento de linfocitos.
- ❖ **Zona excesivamente fina:** Corresponde al final de la extensión y termina en un área donde las células adoptan una posición acartonada (barbas). En esta región existe un exceso de granulocitos y monocitos.
- ❖ **Zona ideal:** Corresponde a la región intermedia del frotis y en ella existe un reparto equilibrado de células.

5.2 COLORACIONES USADAS

Una vez seco el frotis, se procede a la tinción hematológica con el colorante de Romanowsky, constituido por la mezcla de eosina y azul de metileno. Dentro de éstas tenemos:

- 5.2.1 Colorante de Giemsa.
- 5.2.2 Colorante de May-Grunwald.
- 5.2.3 Colorante de Wright.
- 5.2.4 Colorante de Leishman.

Preparación de colorantes (Anexo A)

- ❖ Para el estudio de las células sanguíneas utilizar el colorante 5.2.3 y 5.2.4.
- ❖ Para el estudio de hemoparásitos utilizar el colorante 5.2.1.
- ❖ Utilizar el colorante 5.2.2 para casos especiales en que se desee observar con mayor claridad y especificidad los gránulos de los neutrofilos.

5.3 TINCIÓN CON COLORANTE DE WRIGHT

5.3.1 Fundamento

El colorante de Wright va a permitir suministrar un medio para estudiar la sangre y determinar las variaciones y anomalías de estructura, forma y tamaño de los eritrocitos, su contenido de hemoglobina y sus propiedades de coloración. La información obtenida de un frotis de sangre periférica depende en gran parte de la calidad del extendido y la coloración.

5.3.2 Materiales

5.3.2.1 Colorante de Wright (Anexo A).

5.3.2.2 Frasco gotero.

5.3.2.3 Solución amortiguada tamponada (Anexo A).

5.3.3 Procedimiento

5.3.3.1 Una vez obtenido el frotis sanguíneo, se le dejará secar entre 15 y 20 minutos.

5.3.3.2 Luego se coloca la preparación en un soporte y se cubre con el colorante de Wright, dejándolo por espacio de 5 minutos.

5.3.3.3 Posteriormente se añade solución amortiguada tamponada en partes iguales hasta obtener un brillo metálico, dejando 6 minutos adicionales.

5.3.3.4 Finalmente se lava con agua corriente y se deja secar.

5.3.3.5 Se coloca en el microscopio y, con pequeño aumento, se revisa la calidad de la coloración, la cantidad aproximada de glóbulos blancos y se escoge el sitio para iniciar el recuento. Se coloca una gota de aceite de inmersión y se enfoca a un aumento de 100x

La forma de los glóbulos rojos se examinará detenidamente observando además del color (cantidad de hemoglobina), presencia de plaquetas, su agrupación y distribución.

5.3.3.6 Posteriormente, se hace el recuento diferencial de glóbulos blancos en 100 células, para lo cual se deberá conocer las diferencias entre neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos.

Una extensión de sangre bien teñida debe caracterizarse por una buena diferenciación de las estructuras subcelulares en los leucocitos, una coloración rosada de los hematíes y la ausencia de precipitados. Los defectos más frecuentes observados en la tinción del frotis sanguíneo son:

Coloración excesivamente azul, debido a:

- ❖ Frotis excesivamente grueso.
- ❖ Lavado insuficiente.
- ❖ Tinción muy prolongada.
- ❖ Empleo de colorante excesivamente alcalino.

Coloración con una tonalidad rosada:

- ❖ El colorante, el tampón o el agua de lavado tienen un pH demasiado ácido.

Presencia de precipitados:

- ❖ Obedecen a una acción excesiva del colorante. Esto se puede evitar con la filtración.

SECCIÓN 6

HEMOGRAMA-HEMOGLOBINA-HEMATOCRITO

El hemograma de Shilling constituye uno de los exámenes de laboratorio más usados en el campo de la hematología. Comprende las siguientes pruebas:

6.1 RECUENTO LEUCOCITARIO

Principio

La sangre anticoagulada se deposita en un líquido que permite evidenciar los leucocitos, manteniéndolos visibles, mientras que los eritrocitos son hemolizados. El recuento del número de leucocitos o glóbulos blancos se expresa por mm^3 (milímetro cúbico).

6.1.1 Equipos

- Microscopio.
- Hemocitómetro (Cámara de Neubauer).

Consta de los siguientes elementos:

- ♦ Una lámina portaobjeto gruesa, en el centro se hallan dos superficies cuadrículadas iguales separadas del resto de la lámina por surcos y dos 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.

La altura entre el cubreobjetos y la lámina portaobjetos es de 0,1 mm.

Cada cuadrícula mide 3 mm de lado y se divide en 9 cuadrados grandes. Cada uno de los cuales mide 1 mm^2 de superficie, que se subdivide a su vez en 16 cuadrados medianos. El cuadrado grande central se divide en 25 cuadrados pequeños y cada uno de ellos en 16 cuadraditos. Cada cuadrado pequeño mide 0,2 mm de lado ($0,04 \text{ mm}^2$ de superficie), y cada cuadradito mide 0,05 mm de lado ($0,0025 \text{ mm}^2$ de superficie).

6.1.2 Materiales y reactivos requeridos

- 6.1.2.1** Pipeta de glóbulos blancos (De Thoma) o pipeta automática (de 0 a 100 mL). Presenta cerca del extremo superior una marca de 11, inmediatamente continúa una dilatación (bulbo) que contiene una perla que funciona como mezcladora, luego sigue el extremo más largo de la pipeta (tallo) que está dividida en 10 partes, con 2 marcas: 1 (parte final del bulbo) y 0,5 (a la mitad del tallo). Se le acopla a su extremo superior 1 tubo de goma y una bombilla para aspirar.
- 6.1.2.2** Diluyente de glóbulos blancos: Solución de Turk al 1%.
- 6.1.2.3** Contador manual (Sólo si fuera necesario).
- 6.1.2.4** Papel filtro.

6.1.3 Procedimiento

- 6.1.3.1** Una vez obtenida la sangre con anticoagulante o sangre capilar del dedo, se procede a aspirar la sangre con la pipeta de glóbulos blancos hasta la marca de 0,5 y a limpiar la punta con papel absorbente.
- 6.1.3.2** Introducir la pipeta en el tubo que contenga solución de Turk y absorber hasta la marca de 11 (no debe haber burbujas).
- 6.1.3.3** Tapar ambos extremos y proceder a mezclar manualmente o en un rotador automático por 2 ó 3 minutos.
- 6.1.3.4** Monte la laminilla de vidrio en la cámara para recuento que debe estar limpia y seca.
- 6.1.3.5** Agitar la pipeta y descartar las cuatro primeras gotas para luego colocar una gota pequeña de esta solución en la cámara.
- 6.1.3.6** Deje reposar por espacio de 3 minutos para que las células se sedimenten.
- 6.1.3.7** Enfocar con objetivo de 10x y contar en 4 cuadrados grandes angulares. Cuando se usa la pipeta automática, se toma 20 mL (0,02 mL) de sangre total con anticoagulante o sangre capilar con anticoagulante y se diluye en un tubo que contenga 380 mL de solución de Turk (aquí tenemos una dilución 1:20).

LECTURA

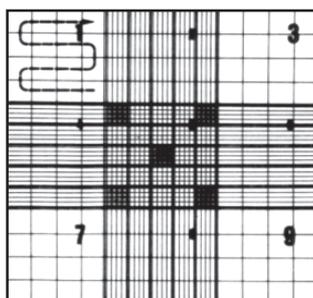


Fig. 13

La lectura se realiza en los campos 1, 3, 7 y 9 como está indicado en la figura. Además de los leucocitos contados dentro de cada uno de los cuadrantes, se deben contar todos los leucocitos que se encuentren adheridos en la línea horizontal superior y vertical exterior, o de lo contrario, todos los leucocitos, adheridos a la línea horizontal inferior y vertical interior.

6.1.4 Resultados

$$\text{N}^\circ \text{ de leucocitos x mm}^3 = \frac{\text{leucocitos contados en 4 campos}}{\text{altura x dilución x área}}$$

$$\text{Reemplazando} = \frac{\text{leucocitos contados en 4 campos}}{1/10 \times 1/20 \times 4}$$

$$= \frac{\text{leucocitos contados en 4 campos}}{4/200}$$

$$= \frac{X/1}{4/200} = \text{N}^\circ \text{ leucocitos contados x } 50$$

6.1.5 Valores de referencia

5000 - 10 000 leucocitos / mm³

6.1.6 Corrección de valores para restar eritrocitos nucleados

Los normoblastos no se destruyen (lisis) en el líquido de dilución, por lo tanto pueden observarse al realizar el recuento leucocitario y confundirse con los leucocitos, de tal manera que se debe emplear la siguiente fórmula:

Cálculo:

La concentración del número de normoblastos (por litro) es:

Número de normoblastos contados x concentración o número de leucocitos
100 + N° de normoblastos contados

Ejemplo:

Si se cuentan 50 normoblastos y la concentración del número de leucocitos es 16 x 10⁹/l, la concentración del número de normoblastos será:

$$\frac{50}{100 + 50} \times 16 = 5,3 \times 10^9/l$$

y la concentración de leucocitos corregida será: 16 - 5,3 = 10,7 x 10⁹/l

En unidades tradicionales las concentraciones de normoblastos y leucocitos se expresan por milímetro cúbico. En tales unidades el cálculo correspondiente al ejemplo que se ha dado sería:

$$\frac{50}{100 + 50} \times 16\ 000 = 5300 / \text{mm}^3$$

Recuento corregido de glóbulos blancos o leucocitos = 16 000 - 5300 = 10 700 / mm³

Fuente: *Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud. OPS, N° 2.*

6.2 RECUENTO DE GLÓBULOS ROJOS

Principio

La sangre se diluye en un líquido que nos permite observar claramente los hematíes, luego esta dilución se coloca en una cámara de Neubauer con la ayuda de una pipeta automática o pipeta Pasteur y se cuentan en el microscopio a un objetivo de 40x para calcular el número de glóbulos rojos por mm^3 .

6.2.1 Equipos

- Microscopio.
- Hemocitómetro (cámara de Neubauer).

6.2.2 Materiales y reactivos requeridos

6.2.2.1 Pipeta de glóbulos rojos (De Thoma) o pipeta automática (de 0-100 mL). Presenta cerca del extremo superior una marca de 101, inmediatamente continúa una dilatación (bulbo) que contiene una perla roja mezcladora, luego sigue el tallo (extremo más largo), el cual está dividido en 10 partes con 2 marcas: 1 acabando el bulbo y 0,5 a la mitad del tallo. Se requiere igual que el recuento de leucocitos una boquilla para aspirar.

6.2.2.2 Diluyente de glóbulos rojos: Cloruro de Sodio al 0,9% (ver anexo).

Diluyente de Hayem (ver anexo).

6.2.2.3 Contador manual (sólo si fuera necesario).

6.2.2.4 Papel filtro.

6.2.3 Procedimiento

6.2.3.1 Mezclar la sangre obtenida con el anticoagulante o tomar sangre capilar.

6.2.3.2 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 dilución será 1/100. Limpiar la punta con gasa o papel absorbente.

6.2.3.3 Introducir la pipeta en el tubo o frasquito conteniendo diluyente (Hayem) y llenar de líquido de dilución hasta la marca de 101.

6.2.3.4 Se coloca en un rotador automático o se hace rotar manualmente de 2 a 3 minutos.

6.2.3.5 Agitar bien la pipeta y descartar 3 a 4 gotas del tallo, luego colocar una gota pequeña cerca de un extremo de la cámara para que por capilaridad se llene exactamente.

6.2.3.6 Hacer el recuento con objetivo de 40x.

Se puede realizar con la pipeta automática, se toma 20 mL (0,02mL) de sangre total con anticoagulante, o sangre capilar y se deposita en un tubo de 12 x 75 que contenga 4 mL de solución de Hayem (aquí se tiene una dilución de 1:200). Se deja reposar aproximadamente 5 minutos y se procede a cargar la cámara con la misma pipeta usando un nuevo tip. El inconveniente aquí es el gasto de reactivo (4 mL) pero las medidas son mas exactas.

- 6.2.3.7 Dejar en reposo por 3 minutos.
- 6.2.3.8 Enfocar la cuadrícula a 10x, luego con el objetivo de 40x contar sobre el cuadrado grande central de la cámara sólo en 5 cuadrados pequeños: uno central y cuatro angulares (80 cuadraditos en total).
- 6.2.3.9 En el recuento se incluyen 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 los correspondientes a los límites inferior y derecho. Se hace el recuento en los puntos ABCD y E y se sigue los mismos parámetros del recuento de leucocitos.

LECTURA

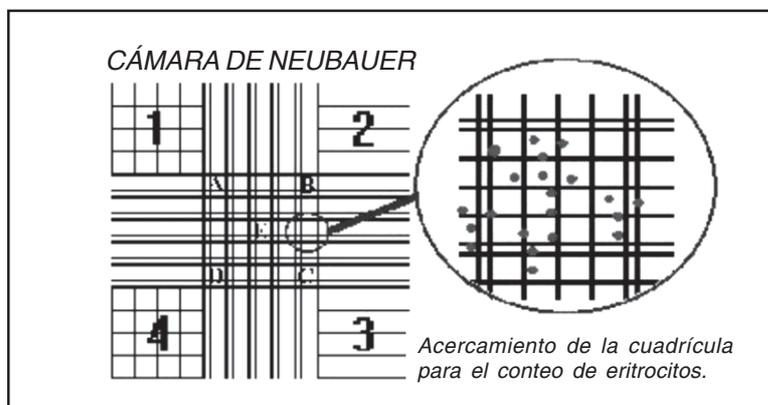


Fig. 14

6.2.4 Resultados

$$\text{N}^\circ \text{ de hematíes x mm}^3 = \frac{\text{hematíes contados en 5 cuadrados pequeños}}{\text{altura} \times \text{dilución} \times \text{área}}$$

$$\text{Reemplazando} = \frac{\text{hematíes contados en 5 cuadrados pequeños}}{1/10 \times 1/200 \times 1/5}$$

$$= \frac{\text{hematíes contados en 5 cuadrados pequeños}}{1/10\ 000}$$

$$= \text{hematíes contados} \times 10\ 000$$

6.2.5 Valores de referencia

(Unidades tradicionales millones de células/mm³).

| | |
|-------------------------|-----------------------|
| Hombres | 4 500 000 - 5 500 000 |
| Mujeres | 4 000 000 - 5 000 000 |
| Niños (4 años) | 4 200 000 - 5 200 000 |
| Lactantes (1 - 6 meses) | 3 800 000 - 5 200 000 |
| Recién nacidos | 5 000 000 - 6 000 000 |

Fuente: *Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud*. OPS, N° 2.

6.3 DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN GLOBULAR (Hematocrito)

Mide la fracción que comprende a los glóbulos rojos (masa globular), respecto al volumen total de la muestra de sangre venosa o capilar. Puede expresarse en porcentaje o como valor decimal.

$$\text{Hto} = \frac{\text{altura de la columna de glóbulos rojos}}{\text{altura de la columna de sangre total}} \\ (\text{glóbulos rojos más plasma})$$

6.3.1 Método de Wintrobe

Materiales requeridos:

- Tubo de Wintrobe graduado de 0 - 100 mm.
- Pipetas Pasteur o pipetas de transferencia.
- Tapón de goma.

Procedimiento:

- ◆ Llenar la sangre extraída con anticoagulante con una pipeta pasteur, comenzando desde el fondo hasta la marca superior de 100 mm, teniendo cuidado de no provocar espuma.
- ◆ Tapar el tubo con un tapón de goma para evitar la evaporación.
- ◆ Centrifugar a 3000 rpm por 30 minutos.

Resultados (lectura):

Del tubo graduado se mide directamente el nivel de la columna de glóbulos rojos.

Valores de referencia:

Hombres : 40% - 54%

Mujeres : 38% - 48%

Fuente: *Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud.* OPS, N° 2.

6.3.2 Método de microhematocrito

Materiales requeridos:

- Capilares rojos y azules (75 mm x 1,5 mm).
- Plastilina.

Procedimiento:

- ◆ Tomar la muestra en capilares rojos heparinizados directamente del pulpejo del dedo, o utilizar capilares azules sin heparina para sangre venosa con anticoagulante de Wintrobe o EDTA. Debe llenarse aproximadamente 70% - 80% del capilar.
- ◆ Ocluir (tapar) un extremo del capilar con plastilina.
- ◆ Colocar el capilar sobre la plataforma del cabezal de una centrífuga de microhematocrito, con el extremo ocluido adherido al reborde externo de la plataforma.
- ◆ Centrifugar por 5 minutos entre 10 000 - 12 000 rpm.

Resultados (lectura)

La lectura se realiza con una escala estandarizada que expenden en el comercio.

Uso de la escala:

- ◆ Sostenga el tubo frente a la escala de manera que el fondo de la columna de eritrocitos (no el extremo inferior del tubo) quede exactamente al mismo nivel de la línea horizontal correspondiente al cero.
- ◆ Desplace el tubo a través de la escala hasta que la línea marcada con el número 1,0 quede al nivel del tope de la columna de plasma. Vigile que el fondo de la columna de eritrocitos continúe sobre la línea cero. El tubo debe encontrarse completamente en posición vertical.
- ◆ La línea que pase al nivel del tope de la columna de eritrocitos indicará la fracción de volumen de éstos.

Valores de referencia:

| | |
|---------------------|-----------|
| Hombres | 40% - 50% |
| Mujeres | 38% - 44% |
| Niños (5 años) | 38% - 44% |
| Lactantes (3 meses) | 37% - 42% |
| Recién nacidos | 50% - 58% |

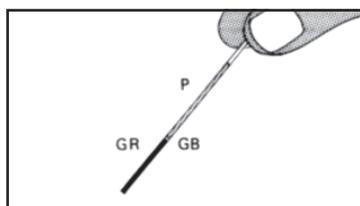


Fig. 15

La disposición celular es:

- Parte superior, una columna de plasma.
- En la interfase están los leucocitos y plaquetas.
- Parte inferior está la columna de eritrocitos (Fig. 15).

Fuente: *Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud*. OPS, N° 2.

6.4 DOSAJE DE HEMOGLOBINA

Principio

La sangre se diluye en líquido de Drabkin, el cual hemoliza los hematíes y convierte la hemoglobina en cianometahemoglobina (cianuro de hemoglobina). La solución que se produce se lee por medio de un espectrofotómetro o fotocolorímetro. Su grado de absorbancia es proporcional a la cantidad de hemoglobina que contenga la sangre.

6.4.1 Materiales y reactivos

6.4.1.1 Un colorímetro fotoeléctrico o un espectrofotómetro.

6.4.1.2 Pipetas:

- ◆ Una pipeta para sangre (pipeta de Sahli) graduada hasta 0,02 mL, con tubo de goma y boquilla.
- ◆ Una pipeta de vidrio graduada de 5 mL.

6.4.1.3 Tubos de ensayo.

6.4.1.4 Reactivo de Drabkin para dilución.

Este reactivo se puede adquirir en tabletas o polvos para disolver en 1 litro de agua destilada. Si se dispone de una balanza analítica la preparación se puede hacer en el laboratorio. Esta solución se puede conservar durante un mes en un frasco de vidrio oscuro. Deséchese si se enturbia.

El líquido de Drabkin no debe enfriarse demasiado, pues puede causar una decoloración con reducción del ferrocianuro.

Referencia para cianometahemoglobina (estandarizada):

Esta solución se puede adquirir en el comercio o en un laboratorio de referencia.

En las soluciones de referencia comerciales casi siempre indica la concentración en miligramos por 100 mL (generalmente en mg%).

Se preparan diluciones con reactivo de Drabkin de tal manera que los patrones contengan concentraciones de 60 mg, 40 mg, 20 mg de CNHi.

Leer los tubos en absorbancia con filtro verde a 540 nm, llevando el fotómetro a cero con el reactivo de Drabkin.

Para calcular la concentración de hemoglobina en cada tubo, realizar el siguiente cálculo:

$$\text{Hb en g/100 mL} = \frac{P \times D}{1000}$$

P = Concentración del patrón.

D = Dilución de la muestra de sangre,
que es 251 veces.

Para una concentración de patrón de :

60 mg 15 g/100 mL

40 mg 10 g/100 mL

20 mg 5 g/100 mL

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

6.4.2 Calibración del colorímetro

Antes de usar el colorímetro para calcular la hemoglobina se debe elaborar una curva de calibración. Con esta curva se puede preparar un gráfico y un cuadro de valores de hemoglobina.

6.4.3 Procedimiento

- 6.4.3.1** En un tubo de 13 x 100 colocar exactamente 5 mL de reactivo de Drabkin.
- 6.4.3.2** La sangre que puede utilizarse es de punción del dedo (sangre capilar) o de sangre venosa recién extraída.
- 6.4.3.3** Con una pipeta automática o pipeta de Salhi se toma exactamente 0,02 mL (20 μ L) de sangre total, limpiar luego la punta de la pipeta y se vierte en el tubo que contenga reactivo de Drabkin. Se enjuaga 3 veces y se mezcla.
- 6.4.3.4** Dejar en reposo por espacio de 5 a 15 minutos.
- 6.4.3.5** Leer en absorbancia con filtro verde a 540 nm llevando a cero el fotómetro con agua destilada / Drabkin.

6.4.4 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.

6.4.5 Valores de referencia:

| | |
|----------------------|------------------|
| Niños al nacer | 13,6 - 19,6 g/dL |
| Niños de 1 año | 11,3 - 13,0 g/dL |
| Niños de 10 -12 años | 11,5 - 14,8 g/dL |
| Mujeres | 11,5 - 16,5 g/dL |
| Hombres | 14,0 - 18,0 g/dL |

Fuente: *Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud*. OPS, N° 2.

6.5 FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA

Se debe considerar lo siguiente:

6.5.1 Calidad del frotis

Debe abarcar 80% de la lámina con cabeza, cuerpo y cola. Extensiones gruesas dificultan la visualización e identificación celular, mientras que las delgadas originan una distribución anormal de los elementos.

6.5.2 Eritrocitos

Se estudia su tamaño, forma, color y si existen inclusiones o elementos extraños como se verá más adelante.

6.5.3 Plaquetas

Estudiar tanto cualitativa como cuantitativamente, debiendo observarse de 3 a 10 plaquetas aproximadamente por 100 glóbulos rojos o varias plaquetas y grupos ocasionales por campo. Visto con objetivo de inmersión, no debe existir menos de una plaqueta por campo.

6.6 FÓRMULA LEUCOCITARIA

La fórmula leucocitaria tiene por objetivo determinar los porcentajes de las distintas clases de leucocitos normales y anormales en la sangre. A partir de los porcentajes puede incluso calcularse el número real de cada clase de leucocitos por mm³ de sangre (valor absoluto), conociéndose el total de leucocitos.

Por ejemplo:

Si se tiene 60% de neutrófilos segmentados y el recuento total de leucocitos total es de 20 000, entonces la cifra absoluta de neutrófilos segmentados sería:

$$60/100 \times 20\ 000 = 12\ 000 \text{ (valor absoluto)}$$

Valores de referencia absolutos de neutrófilos segmentados = 3000 - 5000

Conclusión: Los valores relativos sólo nos sirven cuando los valores totales de leucocitos se encuentran dentro del valor normal. En caso contrario (leucocitosis o leucopenia) se debe emplear la fórmula para obtener el valor real, y así determinar que elemento celular se encuentra fuera del rango normal, sea elevado o disminuido.

6.6.1 Procedimiento

6.6.1.1 Se examina la lámina a pequeño aumento para comprobar si los elementos celulares están bien distribuidos.

6.6.1.2 Si es favorable se examina con el objetivo de inmersión. La parte ideal para visualizar células para la fórmula leucocitaria es en la parte final del cuerpo y comienzos de la cola, recorriendo la lámina de izquierda

a derecha o de arriba hacia abajo hasta contar 100 leucocitos incluidos los agranulocitos y granulocitos. Aquí no se incluyen los elementos inmaduros de sangre roja.

6.6.1.3 A medida que se va contando, se va anotando el número de cada una de las clases de glóbulos blancos observados.

6.6.1.4 Se determina luego los porcentajes de cada uno de ellos para luego comparar con los porcentajes normales.

6.6.1.5 Si se tiene en el recuento de leucocitos valores por encima de 10 000 y por debajo de 5000 se debe repetir el recuento.

6.6.2 Valores de referencia

| LEUCOCITOS | VALORES RELATIVOS (%) | VALORES ABSOLUTOS (%) |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Neutrófilos segmentados | 55-65 | 3000-5000 |
| Neutrófilos abastoados | 3-5 | 150-400 |
| Eosinófilos | 0,5-4,0 | 20-350 |
| Basófilos | 0-0,5 | 10-60 |
| Monocitos | 4-8 | 100-500 |
| Linfocitos | 25-35 | 1500-4000 |

Fuente: *Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud. OPS, N° 2.*

SECCIÓN 7

VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN

La velocidad de sedimentación es un examen hematológico que no está incluido en el desarrollo de un hemograma; sin embargo, es una prueba muy importante por su gran sensibilidad, pues resulta normal en las enfermedades funcionales, así como en los procesos inactivos o estrictamente locales.

7.1 MÉTODO DE WESTERGREN

Fundamento

Este examen mide la tendencia de los eritrocitos a sedimentar, al colocar sangre anticoagulada en un tubo en posición vertical. Se lee macroscópicamente la columna de plasma al cabo de una hora de reposo.

Materiales

- Tubos de Westergren.
- Soporte para tubos de Westergren.

Procedimiento

En un tubo que contiene 0,5 ml de anticoagulante citrato de sodio al 3,8% se extrae sangre venosa, se mezcla mediante movimientos rotatorios sobre una superficie lisa.

Se vierte mediante una pipeta Pasteur o una jeringa de metal en el tubo de Westergren, el cual tiene una graduación de 0 a 200 mm de arriba hacia abajo y presenta ambos extremos abiertos.

La sangre debe llenarse hasta la marca cero, se coloca en posición vertical sobre una gradilla especial que obtura ambos extremos.

7.1.2 Resultados

Medir los milímetros descendidos de glóbulos rojos mediante la columna de plasma por encima del paquete globular.

7.1.3 Valores de referencia

| | | |
|---------|---|--------------------------|
| Hombres | : | 1 - 10 mm de altura/hora |
| Mujeres | : | 3 - 14 mm de altura/hora |

7.2 MÉTODO DE WINTROBE

Fundamento

Al igual que el método de Westergren, este método mide la tendencia de los eritrocitos a la sedimentación al colocar sangre anticoagulada en un tubo pequeño. Se lee la columna de plasma al cabo de una hora de reposo.

7.2.1 Procedimiento

El mismo que para el método de Westergren.

7.2.3 Resultados

Medir los milímetros descendidos de glóbulos rojos mediante la columna de plasma por encima del paquete globular.

7.2.4 Valores de referencia

| | | |
|---------|---|----------------|
| Hombres | : | 0 - 5 mm/hora |
| Mujeres | : | 0 - 10 mm/hora |

Fuente: *Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud. OPS, N° 2.*

SECCIÓN 8

PERFIL DE HEMOSTASIA

8.1 PRINCIPIOS GENERALES

Cuando se realizan pruebas de hemostasia se debe considerar los cuidados comunes a toda prueba de laboratorio. Entre estos tenemos:

- 8.1.1 Uso de anticoagulantes indicados: El tipo y la proporción del anticoagulante deben ser evaluados para cada muestra.
- 8.1.2 Luego de centrifugar la sangre, el plasma obtenido es activado por contacto con el vidrio. Esto puede alterar algunas pruebas, por ello se sugiere usar recipientes de superficies “no humedecibles”, como el plástico o el vidrio siliconizado.
- 8.1.3 El material debe estar escrupulosamente lavado, ya que residuos de proteínas pueden contener sustancias tromboplásticas.
- 8.1.4 El material de vidrio debe lavarse tres veces con detergente y luego ser puesto en mezcla sulfocrómica por lo menos durante seis horas, luego debe enjuagarse con agua destilada varias veces.
- 8.1.5 Las pruebas deben realizarse lo antes posible y, si hay demora, las muestras se podrán en congelación a 4 °C.
- 8.1.6 Las pruebas se realizan siempre en duplicado y usando controles. Las muestras controles serán obtenidas usando la misma técnica empleada para obtener las muestras problema (*pool* de plasmas) o en forma comercial.

8.2 MECANISMO DE COAGULACIÓN

Didácticamente podemos dividir el mecanismo de activación de la coagulación en tres etapas:

- 8.2.1 La generación de la tromboplastina o activador de la protrombina (primera fase de la coagulación sanguínea).
- 8.2.2 La generación de la trombina (segunda fase de la coagulación sanguínea).
- 8.2.3 La formación de la fibrina (tercera fase de la coagulación sanguínea).

8.3 EXPLORACIÓN DE LA COAGULACIÓN

INTRODUCCIÓN

La exploración global de la coagulación sanguínea puede realizarse mediante varias pruebas que miden el tiempo que tarda en coagular la sangre o el plasma. No sirve para el diagnóstico del déficit de un factor en particular, pero suministra una idea general sobre el estado de la vía intrínseca y de la vía común.

Para ello existe un conjunto de principios elementales y comunes a todas las técnicas que es preciso conocer para evitar errores en las determinaciones.

8.3.1 Limpieza del material de vidrio

Las pipetas y los tubos de hemólisis deben estar muy limpios. Los restos de detergente o de plasma influyen sensiblemente en el análisis.

8.3.2 Disolución y conservación de los reactivos

Para disolver los reactivos debe emplearse agua bidestilada procurando no agitar (evitar la formación de espuma y burbujas). Cuando se emplee plasma control, el tiempo indicado por las diferentes firmas comerciales debe ser respetado.

Los reactivos que deben conservarse a unos 4 °C se guardarán en la nevera. Si existe algún tiempo de caducidad, éste viene siempre indicado en el lote correspondiente. Asimismo, la estabilidad de los reactivos una vez disueltos está indicada en cada una de las correspondientes metodologías de trabajo. Antes de su empleo, los reactivos deben estabilizarse a la temperatura indicada en la normativa correspondiente.

8.4 OBTENCIÓN DEL PLASMA

A una parte de citrato trisódico estéril 0,1 mol/L se le añade nueve partes de sangre (1/10). La punción debe ser directa en la vena. No debe aspirarse violentamente para evitar la formación de espuma y con ello la existencia de un cierto grado de hemólisis, lo que haría inservible el plasma para la realización de las diferentes pruebas.

Una vez extraída la sangre, se centrifuga durante 15 minutos a 3500 rpm. El plasma sobrenadante se trasvasa cuidadosamente a otro tubo de hemólisis y puede conservarse hasta cuatro horas a 4 °C antes de su utilización.

8.4.1 Tiempo de incubación

El tiempo de incubación del plasma con los reactivos correspondientes debe ser muy exacto y la temperatura siempre a 37 °C. Cuando no se empleen métodos automatizados, el tiempo se medirá mediante un cronómetro, el cual debe dispararse simultáneamente con la adición del reactivo y pararse en el instante en que se inicia la coagulación.

8.4.2 Causas de error

8.4.2.1 En la obtención del plasma

- Estasis venosa prolongada. Favorece la fibrinólisis local.
- Punción venosa inadecuada.
- Dilución errónea del plasma. Proporción de sangre-anticoagulante inexacta. Esta proporción (una parte de citrato trisódico + nueve partes de sangre) debe mantenerse con toda exactitud.
- Tiempo de centrifugación inadecuado.
- Presencia de hemólisis en el plasma.
- Conservación prolongada del plasma antes de realizar la prueba. Ello conduce a un descenso de la actividad de los factores lábiles (V y VIII) y, por tanto, el plasma debe ser analizado dentro de las dos o cuatro horas de practicada la extracción.

8.4.2.2 En la realización de la técnica

- Errores de pipeteo.
- Empleo de los reactivos inadecuados o caducados.
- Empleo de los reactivos mal preparados.
- Empleo de una temperatura inadecuada.
- Tiempos de incubación inexactos.
- Empleo de agua no destilada.

Método de exploración *in vivo*

8.5 TIEMPO DE SANGRÍA: Método de Ivy.

Método de Duke.

8.5.1 Método de Ivy

Principio

Mediante esta prueba se estudia la adhesión de las plaquetas al endotelio vascular y su capacidad para formar el trombo plaquetario que detiene la hemorragia a nivel de un vaso de pequeño calibre. Consiste, por tanto, en realizar una pequeña herida y medir el tiempo que tarde en dejar de sangrar.

Materiales

- ◆ Esfingomanómetro o tensiómetro de mercurio.
- ◆ Lanceta (dispositivo descartable estandarizado para tiempo de sangría).
- ◆ Cronómetro.
- ◆ Papel Wathman N° 1, cortado en círculos.
- ◆ Venda compresiva.
- ◆ Algodón y alcohol.

Técnica

- ◆ Exponer el antebrazo del paciente y escoger una zona libre de vénulas, hematomas, heridas y otros. Si el paciente tiene marcada cantidad de vellos, afeite la zona.
- ◆ Limpie con alcohol la zona escogida.
- ◆ Coloque el tensiómetro en el brazo del paciente y regúlelo a 40 mm Hg.
- ◆ Se extrae la lanceta de su reservorio estéril y se quita el seguro. No deben pasar más de 30 a 60 segundos entre la inflada del tensiómetro y la producción de la incisión.
- ◆ Se presiona el disparador al mismo tiempo que el cronómetro y un segundo después retire el dispositivo.
- ◆ Cada 30 segundos secar con el papel de filtro, no tocar los bordes de la incisión para no interferir con el tapón plaquetario. Se anota el tiempo que tarda en cesar la hemorragia, lo que corresponde al tiempo de sangría.

Interpretación del resultado

El valor normal del tiempo de sangría según esta metodología es de 2 a 8 minutos, por lo que los valores superiores a 10 minutos pueden ser ya considerados patológicos. Cuando el tiempo se alarga más de 20 minutos, puede detenerse la hemorragia aplicando sobre la herida una compresa de algodón o gasa estéril si es muy profunda.

Limitaciones

- ◆ Si existe trombocitopenia menor de 50 000/mm³ el tiempo debe ser prolongado.
- ◆ Debe tenerse cuidado de que el paciente no haya ingerido medicamentos que interfieran la función plaquetaria, como aspirina u otros, hasta 7 a 8 días antes de la prueba.

Interpretación

El tiempo de sangría por este método es la mejor valoración de la función plaquetaria. La prolongación del tiempo en esta prueba se encuentra en trombocitopenias o las enfermedades de alteración funcional de las plaquetas, como son la enfermedad de Von Willebrand, la tromboastenia de Glasmann, el Síndrome de Bernard-Soulier, la enfermedad de Storage Pool y otras. Mide *in vivo* la adhesión, la agregación y la liberación plaquetaria como respuesta del organismo a la lesión vascular.

Al realizar esta prueba, debe tenerse siempre en cuenta que la ingesta previa de ácido acetilsalicílico puede alterar los resultados.

8.5.2 Método de Duke

Con una lanceta se hace una pequeña incisión en el lóbulo de la oreja. La sangre fluye por esta incisión y se mide el tiempo que transcurre hasta que se detiene el sangrado.

Este ensayo se lleva a cabo:

- Para diagnosticar ciertos padecimientos hemorrágicos.
- Antes de realizar operaciones quirúrgicas.
- Antes de efectuar una punción en el hígado o el bazo.

Materiales

- ◆ Una lanceta estéril.
- ◆ Éter.
- ◆ Filtro de papel (o papel secante).
- ◆ Si es posible, un cronómetro o, en su lugar, un reloj con segundero.

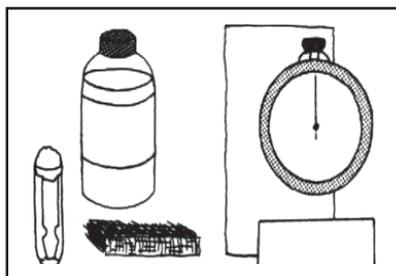


Fig. 1

Método

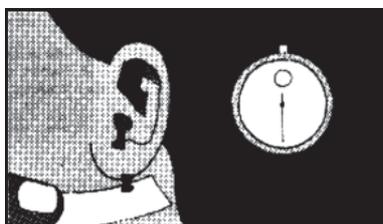
1. Limpie con suavidad el lóbulo de la oreja utilizando una pieza de algodón embebida en éter. No frote. Déjese secar (Fig. 2).



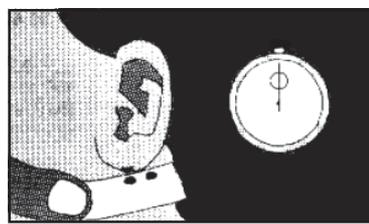
2. Haga la incisión en el lóbulo de la oreja con cierta profundidad, al mismo tiempo cronometrar. La sangre deberá fluir libremente sin que se necesite exprimir el lóbulo de la oreja (Fig. 3).



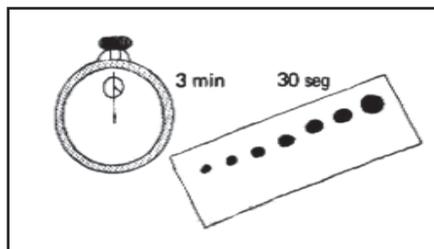
3. Después de 30 segundos. Recoja la primera gota de sangre en una esquina del papel secante. No toque la piel con el papel (Fig. 4).



4. Espere otros 30 segundos y recoja la segunda gota de sangre con el papel secante, un poco más adelante de la primera (Fig. 5).



5. Cuando las gotas de sangre dejen de fluir, detener el cronómetro (o anote el tiempo transcurrido según el reloj, o contar el número de gotas recogidas en el papel secante y multiplicarlo por 30 segundos) (Fig. 6).



Resultados

Comunique el tiempo de sangrado redondeándolo al medio minuto más cercano.

Observaciones

Si el tiempo de sangrado se prolonga examine una extensión de sangre teñida según el método de Romanowski para observar si las plaquetas son escasas.

Interpretación del resultado

El valor de referencia del tiempo de sangría según este método es de 1 a 4 segundos.

8.6 TIEMPO DE COAGULACIÓN DE SANGRE TOTAL (TCST): Método de Lee-White

Principio

Se observa la formación del coágulo en tubos de vidrio en condiciones estandarizadas; esta prueba mide el mecanismo intrínseco de la coagulación.

Materiales (Fig. 1)

- ◆ Un baño maría a 37 °C, o un matraz al vacío, con agua a la misma temperatura.
- ◆ Dos tubos de ensayo limpios, de 10 x 75 mm, del mismo calibre, marcados en el nivel de 1 mL.
- ◆ Un cronómetro.
- ◆ Utensilios y materiales para punción venosa.

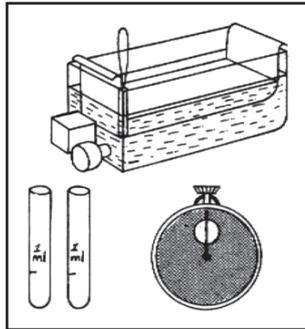
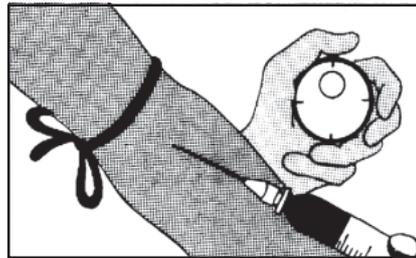


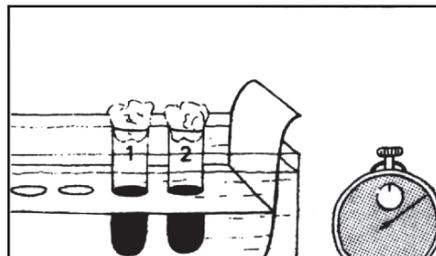
Fig. 1

Método

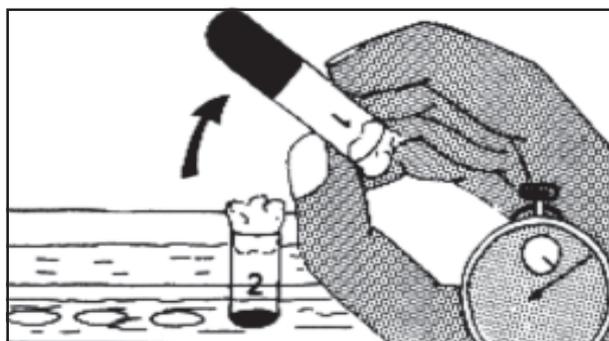
1. Mediante una jeringa de material plástico extraiga poco más de 3 mL de sangre venosa, puncione la vena rápidamente, de la manera adecuada. Cronometrar el tiempo desde el momento que la sangre entra a la jeringa (Fig. 2).



2. Llenar cada uno de los tubos de ensayo con 1 mL de sangre. Taponar con parafilm. Colocar en baño maría a 37 °C (Fig. 3).



3. Después de 3 a 5 minutos sacar el primer tubo del baño maría. Inclinar hacia un plano de 90° en rotación a intervalos de 30 segundos hasta que la sangre coagule (la sangre no fluye cuando el tubo está en posición horizontal) (Fig. 4).
4. Examine el segundo tubo inmediatamente después que haya coagulado la sangre del primero, lo que por lo general es inmediato. Cronometrar. Se notifica como tiempo de coagulación la media de los dos tubos.



Resultados

El tiempo normal de coagulación en tubo es de 5 a 15 minutos a 37 °C.

Interpretación

- ◆ El tiempo de coagulación está prolongado cuando hay severa deficiencia de todos los factores de coagulación, excepto en la trombocitopenia y deficiencia de factor VII o XIII. También está prolongado en presencia de heparina o anticoagulantes circulantes endógenos. Un tiempo de coagulación normal no excluye un desorden de la hemostasia.
- ◆ Es una prueba muy poco dolorosa y es prolongada apenas cuando la deficiencia es severa.
- ◆ El factor deficiente puede estar a 5% de lo normal sin afectar la prueba.

8.7 TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA (PTTK)

Principio

Esta prueba mide la fase intrínseca de la coagulación, en presencia de una "tromboplastina parcial" (cefalina), la cual sustituye la acción del factor plaquetario tres. Se obtiene máximo efecto de contacto por la adición del kaolín.

Materiales:

- ◆ Plasma citratado del paciente.
- ◆ Plasma citratado control.
- ◆ Cefalina kaolín (comercial).
- ◆ Cloruro de calcio 0,025 M.
- ◆ Pipetas automáticas de 0,1 mL.
- ◆ Cronómetro.

Método:

- ◆ Precalentar el cloruro de calcio a 37 °C en baño maría por 5 minutos.
- ◆ En un tubo de 12 x 75 mm a 37 °C, añadir 0,1 mL de plasma y 0,1 mL de la solución de cefalina kaolín previamente agitada. Accionar el cronómetro. Agitar. Incubar a 37 °C por 10 minutos.
- ◆ Añadir 0,1 mL de cloruro de calcio (Ca Cl₂). Accionar el segundo cronómetro. Agitar los tubos suavemente a intervalos de 10 segundos, hasta 30 segundos, y agitar rápidamente hasta la formación del coágulo. Anotar el tiempo.
- ◆ Estudiar el plasma del paciente y control por duplicado. Varias pruebas pueden ser realizadas simultáneamente a intervalos de dos minutos.

Resultados

Se anota el tiempo que tarda en coagular.

Interpretación

El PTTK es una prueba importante de despistaje, detectando las deficiencias más insignificantes (debajo de 25% de los niveles normales) de los factores XII, XI, IX, VIII, X, V. Esta prueba es mucho más sensible que el TCST para la detección de estas deficiencias. Su utilidad más importante es en la detección de las deficiencias congénitas de los factores VIII y IX. No detecta deficiencias del factor plaquetario tres y factores VII y XIII. Esta prueba está alargada también en presencia de heparina.

Valores de referencia

De 30 a 45 segundos.

Observación

En el mercado existen varios preparados comerciales. Si se utiliza cualquiera de estos preparados, seguir estrictamente las indicaciones del fabricante.

8.8 TIEMPO DE TROMBINA

Principio

Mide el tiempo durante el cual el fibrinógeno presente en el plasma se transforma en fibrina por la adición de una cantidad estandarizada de trombina. Explora la última fase de la coagulación con excepción del factor XIII.

Material

- ◆ Plasma citratado del paciente.
- ◆ Plasma citratado control.
- ◆ Trombina en solución salina 0,9% diluir con 6 mL.
- ◆ Cronómetro.

Método

- ◆ Colocar en un tubo de 12 x 75 mm en baño maría a 37 °C 0,2 mL de plasma.
- ◆ Incubar un (1) minuto.
- ◆ Añadir 0,1 mL de trombina y poner en marcha el cronómetro.
- ◆ Medir el tiempo de coagulación.
- ◆ Hacer igual con plasma control normal (ambos por duplicado).

Resultados

Se anota el tiempo que tarda en coagular.

Interpretación

Son causas comunes de prolongación del tiempo de trombina: presencia de heparina o aumento de los productos de degradación del fibrinógeno/fibrina, hipofibrinogenemia, disfibrinogenemia o presencia de una paraproteína que interfiera con la polimerización del fibrinógeno.

Valores de referencia

De 19 ± 2 segundos.

En los casos en que se desea demostrar si existe exceso de heparina se realiza el tiempo de trombina con adición de sulfato de protamina.

8.9 TIEMPO DE PROTROMBINA (Prueba de Quick)

Principio

Mide el tiempo que tarda en coagular una muestra de plasma, desprovisto de plaquetas y anticoagulado con citrato sódico, al ponerlo en contacto con una suspensión de tromboplastina cálcica (sustituto de la tromboplastina tisular fisiológica). El resultado se da en porcentaje referido al de un plasma testigo.

Según la relación:

$$\text{INR} = \frac{\text{R}^{\text{ISI}}}{\text{Tiempo de Quick muestra}} \times \text{Tiempo de Quick testigo}$$

La prueba de Quick también se conoce con el nombre de tiempo de protrombina, explora la vía extrínseca y común de la coagulación en las que intervienen los factores I (fibrinógeno), II (protrombina), V, VII y X.

Es una prueba de gran interés y muy utilizada con fines de *screening*, diagnóstico y control del tratamiento con anticoagulantes orales.

Materiales

- ◆ Plasma citratado del paciente.
- ◆ Plasma normal de control.
- ◆ Pipetas de 0,1 mL y 0,2 mL.
- ◆ Cronómetro.

Método

- ◆ El tubo conteniendo la tromboplastina cálcica (Ortho) debe ser incubado a 37 °C (dependiendo del volumen 5 a 10 minutos).

- ◆ En un tubo de 10 x 75 mm añadir 0,1 mL de plasma del paciente.
- ◆ Incubar a 37 °C por 1 ó 2 minutos.
- ◆ Añadir 0,2 mL de tromboplastina previamente calentada en el tubo con el plasma del paciente; simultáneamente, disparar el cronómetro. Mover el tubo para mezclar los reactivos. Dejar el tubo en reposo a 37 °C por aproximadamente 8 ó 10 segundos.
- ◆ Remover el tubo del baño maría y mover el tubo por inclinación hasta que el coágulo se forme. Anotar el tiempo.
- ◆ Repetir duplicado del paciente y control.

Resultados

Se anota el tiempo que tarda en coagular.

Interpretación

El tiempo de protrombina es expresado en segundos con el valor del control (cada cual es la media de pruebas duplicadas). El valor del control (y paciente) depende de la tromboplastina y de la concentración del citrato y hematocrito. Un tiempo de protrombina prolongado indica deficiencia de los factores II, V, VII o X también está prolongado en la hipofibrinogenemia y heparinemia.

El tiempo de protrombina es utilizado como una prueba de despistaje y también como control para pacientes anticoagulados con drogas antagonistas de la vitamina K.

Valores de referencia

12 a 14 segundos.

SECCIÓN 9

RECuento DE RETICULOCITOS Y PLAQUETAS

9.1 RECuento DE RETICULOCITOS

Los reticulocitos son glóbulos rojos inmaduros formados por ARN y protoporfirina en el citoplasma.

Fundamento

Los reticulocitos contienen una fina red de ARN y protoporfirina que se puede teñir con el azul de cresil brillante. Este colorante en combinación con una misma cantidad de sangre anticoagulada se mezcla y con la ayuda de la temperatura (baño maría) se produce la coloración de estos eritrocitos jóvenes visualizándose en los frotices sanguíneos por microscopía.

Materiales

- ◆ Láminas portaobjetos.
- ◆ Tubos de ensayos de 12 x 75 mm.
- ◆ Embudo.
- ◆ Filtro de papel.
- ◆ Pipetas Pasteur con chupones.
- ◆ Contador manual (no imprescindible).
- ◆ Solución saturada de azul de cresil brillante (filtrada).

Procedimiento

- ◆ En el tubo de ensayo colocar dos gotas de sangre total con anticoagulante.
- ◆ Inmediatamente adicionar con la ayuda de una pipeta Pasteur la misma cantidad de colorante.
- ◆ Mezclar la solución.
- ◆ Se coloca luego en baño maría por espacio de 10 a 15 minutos.
- ◆ Se realizan frotices sanguíneos.
- ◆ Se lee con objetivo de 100x.

Resultados

Examine por lo menos 100 eritrocitos con el objetivo de inmersión. Cuente cuidadosamente:

- ◆ Cantidad total de glóbulos rojos.
- ◆ Número total de reticulocitos que haya entre ellos.

El recuento se ha venido haciendo clásicamente de forma manual mediante la observación en el microscopio óptico. El resultado se da en porcentaje sobre cada 100 hematíes. Es más útil calcular el número de reticulocitos por litro, mediante la fórmula:

$$\text{Reticulocitos/L} = \frac{\% \text{ reticulocitos} \times \text{número hematíes/L}}{100}$$

Observación

En la actualidad existe la posibilidad de hacer el recuento rutinario de forma automática, mediante aparatos específicamente diseñados al respecto, bien a través de adaptaciones de los clásicos autoanalizadores para hemogramas. En estos casos se puede conocer, además, las distintas proporciones de reticulocitos según su grado de maduración, su volumen medio y el índice de maduración.

Valores de referencia

| | |
|----------|------------|
| Adultos | 0,5 - 1,5% |
| Al nacer | 2,5 - 6,0% |

Causas de aumento

El número de reticulocitos aumenta en todas las circunstancias en las que existe un incremento de la eritropoyesis, tales como en la hemólisis, como respuesta a sangrados o tras el inicio de un tratamiento antianémico que ha resultado eficaz.

Causas de disminución

Como la producción de reticulocitos es necesaria para compensar las pérdidas fisiológicas de glóbulos rojos maduros, una disminución de su número es la expresión de un estado arregenerativo o hiporregenerativo de la serie

roja. Esta circunstancia es típica de anemias aplásicas, anemias carenciales y enfermedades inflamatorias y neoplásicas.

9.2 RECUENTO DE PLAQUETAS

Principio

El recuento de plaquetas se realiza directamente en un microscopio de contraste de fases, previa lisis de los hematíes, o también se puede observar en un microscopio convencional.

Recuento en cámara

Materiales

- ◆ Hemocitómetro o cámara de Neubauer.
- ◆ Solución de procaína (Anexo A).
- ◆ Pipetas automáticas de 100 a 1000 mL y 0 a 100 mL.
- ◆ Cámara húmeda.
- ◆ Tubos de plástico de 12 x 75.
- ◆ Microscopio convencional.

Método

- ◆ Mezclar bien la muestra de sangre obtenida con EDTA.
- ◆ Hacer una dilución de 20 uL de sangre total con 380 uL de solución de procaína en un tubo de plástico de 12 x 75 (dilución 1/20).
- ◆ Dejar en reposo por 15 minutos en una gradilla.
- ◆ De esta dilución, llenar en cámara de Neubauer.
- ◆ Dejar en reposo por 15 minutos en cámara húmeda.
- ◆ Enfocar con objetivo de 45x y contar las plaquetas en el retículo central de 1 mm² cuadrado.
- ◆ Calcular el número total de plaquetas según la fórmula que se lee a continuación:

Resultados

Se aplica la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} \text{N}^\circ \text{ de plaquetas x mm}^3 &= \frac{\text{plaquetas contadas en 5 cuadrados pequeños}}{\text{altura x dilución x área}} \\ \text{Reemplazando} &= \frac{\text{plaquetas contadas en 5 cuadrados pequeños}}{1/10 \times 1/20 \times 1/5} \\ &= \frac{\text{plaquetas contadas en 5 cuadrados pequeños}}{1/1000} \\ &= \text{plaquetas contadas x 1000} \end{aligned}$$

Valores de referencia

150 000 - 450 000 plaquetas/mm³

Recuento en lámina

Se cuentan 10 campos con objetivo de 100x y se multiplica por 1000 que es la fórmula convencional para recuento de plaquetas.

Valores de referencia

150 000 - 450 000 plaquetas/mm³

Causas de aumento (trombocitosis)

- ◆ La trombocitosis puede ser secundaria a un estímulo medular inespecífico (posthemorrágica o tras una crisis hemolítica), paraneoplásica o posquirúrgica. Es especialmente importante la que se produce tras la esplenectomía.
- ◆ La trombocitopenia esencial aislada es muy rara, pero puede aparecer asociada a trastornos mieloproliferativos. En estos casos, las plaquetas pueden ser funcionalmente inoperantes y cursar, paradójicamente, con hemorragias.

Causas de disminución (Trombopenia)

- ◆ Es fundamental descartar que no se haya producido un error de lectura como consecuencia de una agregación parcial de las plaquetas en la muestra estudiada. Especialmente llamativos son los casos en los que existe una agregación precisamente en presencia de EDTA, que es el anticoagulante utilizado para mantener incoagulable la muestra de sangre en la que se ha de realizar la lectura.
- ◆ Las verdaderas trombopenias pueden obedecer a una causa central (generalmente asociada a leucopenia y anemia), periférica (inmunológica, secuestro, consumo) o mixta (vímica). La púrpura trombocitopénica idiopática es relativamente frecuente.

SECCIÓN 10

LEUCOGRAMA

Los leucocitos se dividen en:

10.1 GRANULOCITOS

Aquellos que tienen gránulos específicos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los gránulos observados en extendido están cargados de lisosomas y enzimas hidrosolubles que son agentes antibacterianos necesarios para la digestión de partículas fagocitarias. Aquí tenemos:

10.1.1 Neutrófilos

Neutrófilos abastados (Fig. 1)

Es el granulocito en banda. Mide de 10_m a 14_m, núcleo condensado que puede presentar una ó dos constricciones, pero no tiene puente de cromatina. El citoplasma presenta gránulos específicos e inespecíficos, membrana celular lisa, citoplasma de color ligeramente rosado dependiendo de la coloración.

Neutrófilos segmentados (Fig. 2)

Mide igualmente de 10_m a 14_m, núcleo que presenta mayor condensación y está formado por varios lóbulos (hasta 4) unidos por puentes de cromatina. El citoplasma está cargado de gránulos.

Alteraciones leucocitarias de los neutrófilos

- **Granulaciones tóxicas**

Son gránulos basófilos más oscuros que lo normal y se observan durante el transcurso de infecciones severas y estadios tóxicos.

- **Vacuolas tóxicas (Fig. 4)**

Se observan en el citoplasma de los neutrófilos durante infecciones severas y estados tóxicos.

- **Cuerpos de Dohle (Fig. 5)**

Son áreas teñidas de azul en el citoplasma de los polimorfonucleares neutrófilos y se encuentra en infecciones, especialmente en neumonías.

- **Palillo de tambor (Fig. 6)**

Es un pequeño apéndice (cromatina sexual) que permite conocer el sexo del individuo mediante una simple observación en un frotis de sangre

periférica en los neutrófilos. Se presenta en las mujeres.

- **Polisegmentación (Fig. 7)**

Son neutrófilos con 5 o más lobulaciones. Se observa en las anemias por deficiencia de vitamina B-12 y ácido fólico, Síndrome de Down y otras anomalías.

Además existe aumento (neutrofilia) en:

- ⇒ Infecciones bacterianas por agentes piogénicos.
- ⇒ Abscesos y septicemias.
- ⇒ Procesos inflamatorios y necrosis tisular.
- ⇒ Trastornos metabólicos por intoxicación.
- ⇒ Procesos malignos: Carcinoma.
- ⇒ Hemorragias y hemólisis.
- ⇒ Postesplenectomía.

- **Desviación a la izquierda**

Significa el aumento de las formas inmaduras (en banda o cayado, y juveniles) dentro de los neutrófilos. Constituye un importante valor diagnóstico y pronóstico. Puede observarse en: infecciones e intoxicaciones.

- **Desviación a la derecha**

Corresponde a la hipersegmentación nuclear. La mayoría de PMN presentan más de 5 lobulaciones. Ocurre en:

- ⇒ Anemia perniciosa.
- ⇒ Hipersegmentación constitucional hereditaria.
- ⇒ Reacciones mieloides de la sepsis.
- ⇒ Afecciones hepáticas.
- ⇒ Leucemia mieloide.
- ⇒ En la agonía.

Existe disminución (neutropenia) en:

- ⇒ Aplasia medular
- ⇒ Mieloptisis de la médula ósea
- ⇒ Agentes citotóxicos

⇒ Granulopoyesis inefectiva (anemias megaloblásticas).

10.1.2 Eosinófilos (Fig. 8)

Son parecidos a los neutrófilos, pero son algo mayores. Generalmente el núcleo es bilobulado y lo que más caracteriza a esta célula es la presencia de gránulos color naranja-marrón vistos claramente, muchas veces estos gránulos hacen que se pierda la membrana celular por el rompimiento de ésta, ya que estas células son muy frágiles.

Patología: Existe aumento en:

- Infecciones parasitarias.
- Reacciones alérgicas.
- Enfermedades cutáneas.
- Neoplasias.

10.1.3 Basófilos (Fig. 9)

La característica más importante de esta célula es la cantidad de gránulos de color azul negrozco que se encuentra ocupando toda la célula (esto cuando la célula es madura) y parte de la célula cuando ésta es inmadura. Presenta un núcleo que muchas veces no logra observarse por la cantidad de gránulos que contienen histamina y heparina.

Patología: Existe aumento en:

Leucemia por basófilos.

10.2 AGRANULOCITOS

No poseen gránulos. Aquí tenemos a los linfocitos y monocitos.

10.2.1 Linfocitos. Pueden ser:

- Linfocitos grandes.
- Linfocitos pequeños.

⇒ Linfocitos grandes (Fig. 11a)

Miden de 15_m a 25_m, presentan generalmente un núcleo ligeramente oval discretamente indentado, la cromatina es densa pero no tanto como en el linfocito pequeño (esto lo puede confundir con el monocito). Citoplasma abundante, azul pálido y puede contener gránulos azurófilos inespecíficos.

Patología

• Linfocitos atípicos (Fig. 12)

Llamados también virus linfocitos, células linfomonocitoides, células activadas de Turk, células de Turk, virocitos, inmunoblastos, etc. Miden de 15_m a 30_m, núcleo irregular, indentado, excéntrico y puede observarse nucleolos. El citoplasma es amplio, color azul tenue, y puede presentar gránulos azurófilos y vacuolas. Estas células pueden observarse en mononucleosis infecciosa, hepatitis viral, herpes zoster, enfermedades autoinmunes y normalmente pueden hallarse hasta en 5%.

- Linfocitos con mitosis o binucleados (Fig. 13)

Pueden encontrarse en enfermedades virales.

- Linfocitos vacuolados (Fig. 14)

En caso de linfocitos que reaccionan por efecto de la radiación ultravioleta o respuesta a tratamientos de quimioterapia.

⇒ Linfocitos pequeños (Fig. 11b)

Miden de 9_m a 15_m, presentan un núcleo que ocupa casi toda la célula, excéntrico, cromatina fuertemente densa. El citoplasma es escaso, basófilo y puede contener gránulos azurófilos inespecíficos.

10.2.2 Monocitos (Fig. 10)

Son los leucocitos de mayor tamaño en la sangre (14_m a 20_m). Su núcleo es generalmente excéntrico, aunque puede ser central. Su cromatina nuclear es laxa, distribuida en forma regular, la forma del núcleo generalmente es de una madeja de lana o arriñonada, aunque puede tener forma de un abastonado. El citoplasma es de color gris y puede presentar gránulos inespecíficos (azurófilos) que carecen de significado clínico.

Patología: Están elevados en:

- Tuberculosis.
- Endocarditis bacteriana.
- Enfermedades virales como sarampión, rubéola, etc.
- Colagenosis, neoplasias, etc.

10.3 CRITERIOS PARA EL DESARROLLO DE UN LEUCOGRAMA

- 10.3.1** Se considera leucocitosis cuando la cifra de glóbulos blancos excede de 10 000.
- 10.3.2** Se considera leucopenia cuando la cifra de glóbulos blancos es inferior a 5 000.
- 10.3.3** No olvidar que el ejercicio produce leucocitosis fisiológica de consideración, de allí que el recuento debe hacerse en condiciones basales.
- 10.3.4** En los granulocitos debe informarse el número de lobulaciones del núcleo. A mayor edad de la célula mayor el número de lóbulos y lo contrario.



Fig. 1. Neutrófilo abastonado y neutrófilo segmentado

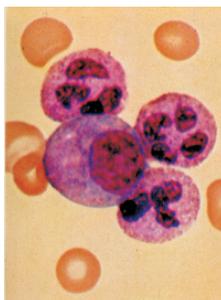


Fig. 2. Neutrófilos segmentados

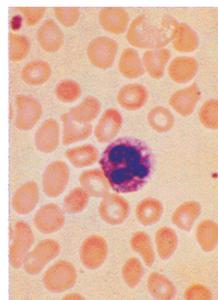


Fig. 3. Granulaciones tóxicas

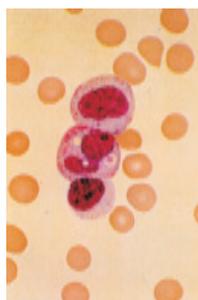


Fig. 4. Vacuolas tóxicas

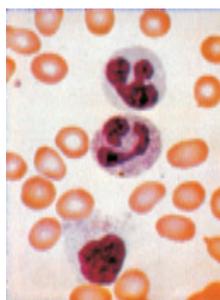


Fig. 5. Cuerpos de Dohle

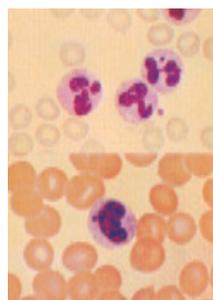


Fig. 6. Palillo de tambor

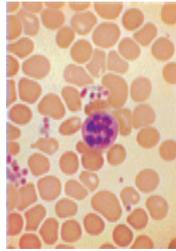


Fig. 7. Polisegmentación

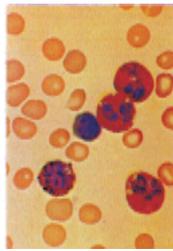


Fig. 8. Tres eosinófilos, una célula basófila y un linfocito

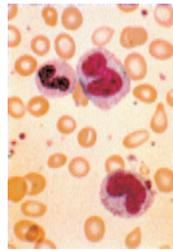


Fig. 9. Monocitos

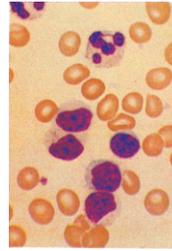


Fig. 10. Linfocitos grandes y pequeños

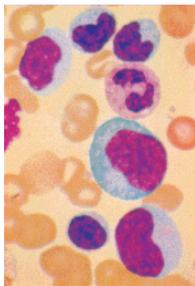


Fig. 11. Linfocitos atípicos

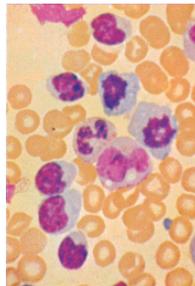


Fig. 12. Linfocitos en mitosis

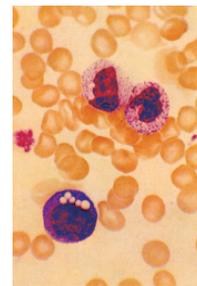


Fig. 13. Linfocitos vacuolados

SECCIÓN 11

ALTERACIONES ERITROCITARIAS

Aquí se encuentran incluidas las células progenitoras de la serie roja que normalmente se encuentra en la médula ósea, pero cuando éstas pasan a sangre periférica antes de su maduración en normocitos o hematíes pueden indicar alguna patología como leucemias, anemias u otras alteraciones celulares. Aquí tenemos:

PRONORMOBLASTO (Fig. 1a)

Es una célula primitiva (inmadura) de aproximadamente 25 μ m a 35 μ m de diámetro, citoplasma basófilo, presencia de 1 a 2 nucleolos, existe una condensación ligera de la cromatina, citoplasma ligeramente excéntrico. Esta célula se divide en:

NORMOBLASTO BASÓFILO (Fig. 1b)

Es ligeramente menor que el pronormoblasto, 12 μ m a 18 μ m, citoplasma igualmente basófilo, pero, se diferencia del anterior en que ya no presenta nucleolos y su cromatina nuclear es más condensada ya que es un elemento menos inmaduro. El siguiente paso en la maduración es:

NORMOBLASTO POLICROMATÓFILO (Fig. 1c)

Es una célula que mide de 12 μ m a 16 μ m, aunque usualmente puede ser mayor que el normoblasto basófilo, presenta núcleo excéntrico y lo que más caracteriza a esta célula es que ya presenta pequeñas cantidades de hemoglobina citoplasmática que se traduce en un color violeta (azul y rojo). Su cromatina es más condensada que la anterior.

NORMOBLASTO ORTOCROMÁTICO (Fig. 1d)

Mide de 10 μ m a 14 μ m, esta célula es bien característica y no debe confundirse con el linfocito ya que prácticamente es un hematíe nucleado, como también se le conoce. Presenta su citoplasma rosado, núcleo totalmente excéntrico

como una bola maciza. Este normoblasto ya no se divide, sino que pierde su núcleo por un mecanismo de expulsión y se convierten en:

RETICULOCITOS (Fig. 2)

Estos todavía presentan en su citoplasma restos de ARN y protoporfirina resultados de la conversión del normoblasto ortocromático a reticulocito y solo se pueden observar con coloraciones especiales. En sangre periférica se les puede observar como elementos macrocíticos y policromatófilos.

NORMOCITOS O HEMATÍES (Fig. 3)

Discos cuya biconcavidad hace que aparezcan con cierta palidez central al no captar el colorante en esa zona. Miden aproximadamente de $7,2\mu\text{m}$ a $7,4\mu\text{m}$ y puede llegar hasta ocho. Presenta un pigmento respiratorio que le da el color rosado característico que es la hemoglobina que se encarga del transporte de oxígeno. Más adelante se explicarán las alteraciones más frecuentes de estos elementos celulares.

Se dividen en:

- ◆ Alteraciones en tamaño.
- ◆ Alteraciones en su forma.
- ◆ Alteraciones de color.
- ◆ Inclusiones anormales.

◆ Alteraciones en el tamaño

Llamadas también anisocitosis. Pueden ser de dos tipos:

Macrocitos (Fig. 4): Hematíes que presentan un tamaño superior al normal (más de $9\mu\text{m}$) y su expresión máxima es el megalocito. Suelen aparecer en la anemia megaloblástica debida a déficit de vitamina B_{12} o ácido fólico. Se suele observar cuando hay un aumento de la actividad eritropoyética, como un mecanismo de compensación a la pérdida de los hematíes, sea por anemia severa o hemorragias. En la sangre periférica se pueden observar como hematíes grandes policromatófilos o reticulocitos.

Microcitos (Fig. 5): Hematíes que presentan un tamaño inferior al normal (menos de 6μ) y se encuentran en pacientes con anemia ferropénica y talasemias.

◆ **Alteraciones en la forma**

Llamadas también poiquilocitosis. Entre éstos tenemos:

Esferocitos (Fig. 6): Son hematíes esféricos como unas pelotas, no son bicóncavos, presentan un diámetro inferior al normal pero más grueso. Su vida media es de 14 días, producen taponamiento de los vasos sanguíneos. Se encuentran en la enfermedad esferocitosis hereditaria o enfermedad de Minkowski-Chauffard (defecto congénito de la membrana eritrocitaria). También pueden ser adquiridos por factores extraeritocitarios.

Codocitos (Fig. 7): Llamados también dianocitos. En la región central presentan un área con mayor contenido hemoglobínico (zona densa). La interfase entre la membrana celular y el centro es transparente. Se encuentran en hemoglobinopatías, talasemias, anemia ferropénica y en algunas hepatopatías crónicas con aumento de colesterol y fosfolípidos.

Drepanocitos (Fig. 8): Son hematíes cuya membrana hemática se altera y se hace falciforme (forma de hoz o media luna). Su apariencia es propia del estado homocigoto de la hemoglobina S. Su enfermedad se conoce como drepanocitosis hereditaria.

Eliptocito (Fig. 9): Los hematíes son alargados (ovalocitos). Se encuentran en la enfermedad llamada ovalocitosis hereditaria. Su presencia se debe a una alteración congénita de la membrana del hematíe, aunque puede ser adquirida en caso de una anemia megaloblástica, ferropénica o arregenerativa.

Crenocitos (Fig. 10): Son aquellos que presentan membrana ondulante e irregular. Se encuentran en algunas anemias hemolíticas. Este fenómeno puede ser inducido *in vitro* exponiendo los hematíes a una solución hipertónica. Cuando la característica es muy notable puede emplearse el término equinocito.

Equinocitos (Fig. 11): También llamados acantocitos. Las prominencias de la membrana eritrocitaria son más aguzadas (alargadas) y distribuidas irregularmente. Se encuentran en la acantocitosis que se caracterizan por la ausencia de lipoproteínas plasmáticas.

Dacriocitos (Fig. 12): Son hematíes en forma de lágrima. Se encuentran en la anemia ferropénica, anemia megaloblástica y talasemia.

Esquistocitos (Fig. 13): Son fragmentos hemáticos. Se encuentran en anemias hemolíticas, microangiopatías, quemaduras y con más evidencias en individuos esplenectomizados.

Estomatocitos (Fig. 14): Son hematíes que en lugar de una depleción central clara tienen una banda pálida central que les da un aspecto de boca. Se hereda como carácter autosómico dominante. Esta enfermedad es causada por anomalía hereditaria de la membrana eritrocitaria.

Selenocitos (Fig. 15): Son eritrocitos alterados que adoptan forma semilunar. Es un artificio de técnica que aparece especialmente en frotices sanguíneos de pacientes anémicos.

Excentrocitos: Son hematíes con distribución irregular de la hemoglobina. Su tamaño es inferior al normal y se caracteriza por poseer contornos parcialmente arrugados, pero además se observa una distribución irregular de la hemoglobina que aparece desplegada de la parte interna hacia uno de los extremos.

Qnizocito: Son hematíes que presentan un estoma o boca en la región central completamente coloreada y lo demás incoloro. Morfológicamente es todo lo contrario a las características del estomatocito. Se encuentran en algunas anemias como las ferropénicas.

◆ Alteraciones de color

Aquí observamos las diferentes tonalidades de color de los hematíes dependiendo del contenido hemoglobínico. Tenemos:

Hipocromía (Fig. 16): Son hematíes con disminución del contenido de la hemoglobina y dependiendo de la cantidad de este pigmento es que observamos a los hematíes con diferentes caracteres de color. Aquí están incluidos los **anulocitos**, que son hematíes en forma de anillo en que solo la membrana eritrocitaria está coloreada y que se traduce en una hipocromía de grado severo (+++).

Hipercromía (Fig. 17): Son hematíes ávidos de hemoglobina. Pueden encontrarse en caso de enfermedades como la policitemia vera o la policitemia fisiológica y esferocitosis hereditaria.

Policromatofilia (Fig. 18): Presencia de hematíes con tonalidad (azul y rojo) morada. Se le relaciona con inmadurez celular, células nucleadas, presencia de reticulocitos, macrocitos, etc. Esto debido a su elevada cantidad de ARN.

Anisocromía: Diferentes tonalidades de color como hematíes hipocrómicos, hiperocrómicos, normocrómicos y policromatófilos. Se encuentran en ciertas anemias refractarias.

◆ **Inclusiones anormales**

Punteado basófilo (Fig. 19): Son gránulos basófilos presentes en el citoplasma de los hematíes. Puede tratarse de un reticulocito por su elevado contenido de ARN. Se encuentra en una intoxicación por plomo llamada saturnismo.

Cuerpos de Heinz (Fig. 20): Son formaciones redondeadas de hasta 3 μ m de diámetro localizadas habitualmente en la periferia de la célula. Se observan con colorantes para reticulocitos. Estos cuerpos son abundantes en sujetos esplenectomizados.

Anillos de Cabot (Fig. 21): Se cree que sean restos de membrana nuclear eritroblástica o restos después de una mitosis anormal. Se observan en forma de anillo u ocho invertido. Pueden ser precipitados de ARN o proteína carente de importancia diagnóstica.

Cuerpos de Howel-Jolly (Fig. 22): Son restos de cromatina nuclear, resultados de la pérdida del núcleo por parte del normoblasto ortocromático hasta la conversión del hematíe. Se les considera signos de regeneración celular. Se observan en pacientes esplenectomizados.

Siderocitos (Fig. 23): Son hematíes con contenido de hierro libre no hemoglobínico de color verde azulado.

Gránulos de Shuffner: Son gránulos que presentan algunos hematíes en caso de parasitismo por *plasmodium vivax*.

Gránulos de Maurer: Son gránulos de color violeta oscuro que se encuentran en pacientes con parasitismo por *plasmodium falciparum*.

Granulación azurófila: Son pequeñas granulaciones eritrocitarias color violeta púrpura y corresponden a restos de normoblastos ortocromáticos producto de la cariorexis y del paso de un elemento inmaduro a otro maduro. Se observa tanto en síndromes diseritropoyéticos congénitos o adquiridos.

Elementos progenitores de la serie roja

Fig. 1.
1 Pronormoblasto (a)
2 Normoblasto basófilo (b)
2 Normoblasto policromatófilo (c)
6 Normoblasto ortocromáticos (d)

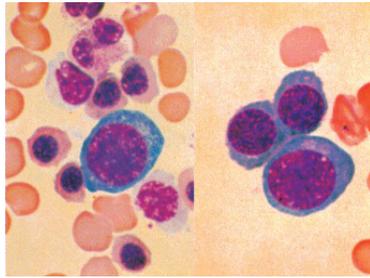


Fig. 2.
Reticulocitos

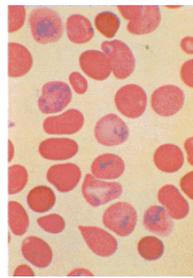
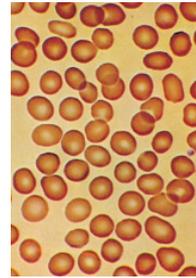


Fig. 3.
Hemáties normales



Alteraciones eritrocitarias en tamaño (Anisocitosis)

Fig. 4. Macroцитos

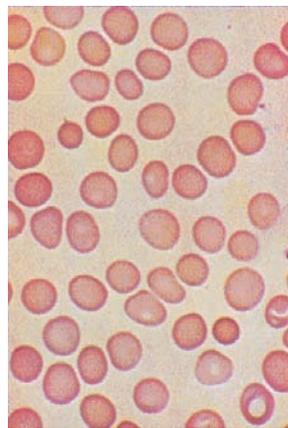
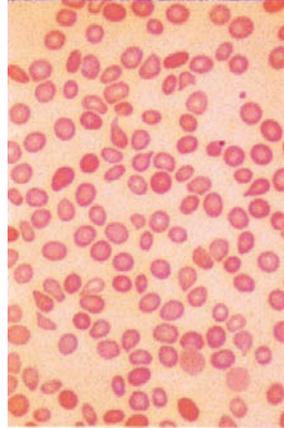


Fig. 5. Microцитos



Alteraciones en la forma (Poiquilocitosis)

Fig. 6. Esferocito.

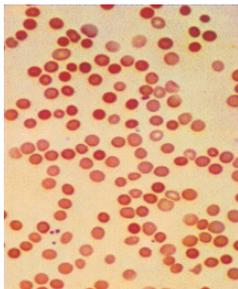


Fig. 7. Dianocitos.

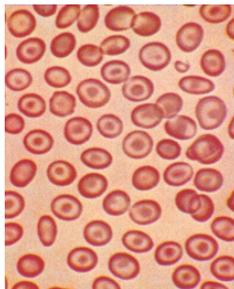


Fig. 8. Drepanocitos.

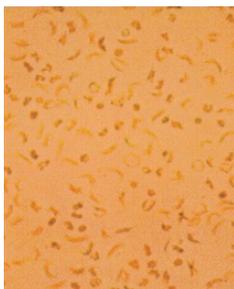


Fig. 9. Eliptocito.

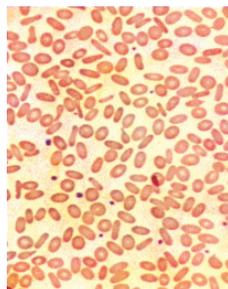


Fig. 10. Crenocitos.

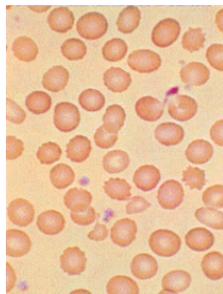


Fig. 11. Equinocitos.

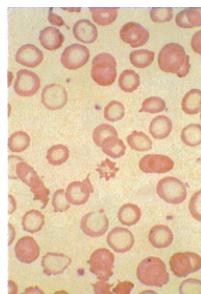


Fig. 12. Dacriocitos

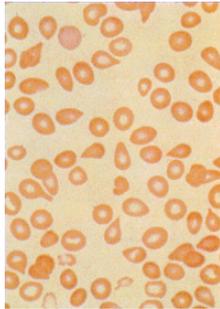


Fig. 13. Esquistocitos

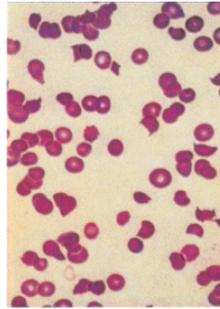


Fig. 14. Estomatocitos

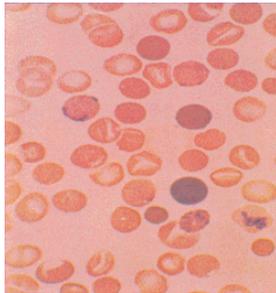
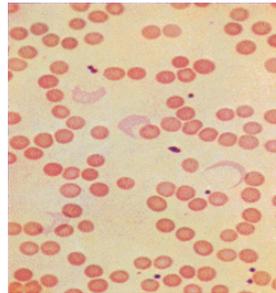


Fig. 15. Selenocitos



Alteraciones de color

Fig. 16. Hipocromía

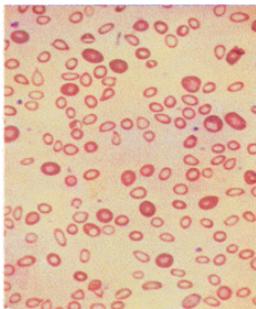


Fig. 17. Hiperchromía

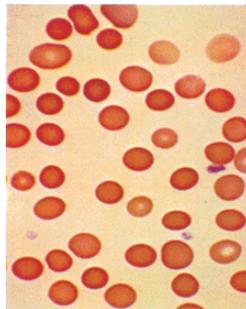
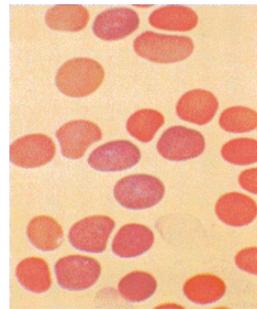


Fig. 18. Policromatofilia



Inclusiones anormales

Fig. 19. Punteado basófilo

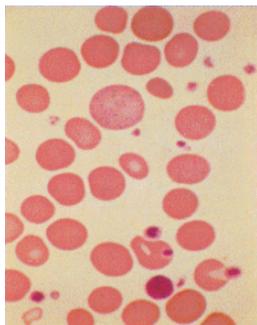


Fig. 20. Cuerpos de Heinz

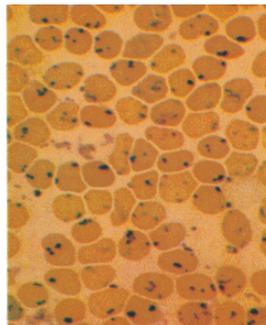


Fig. 21. Anillos de Cabot

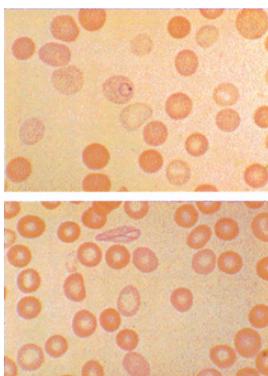
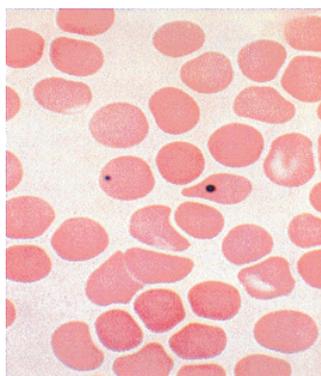


Fig. 22. Cuerpos de Howell-Jolly



BIBLIOGRAFÍA

1. **Ministerio de Salud del Perú- Instituto Nacional de Salud.** Manual de normas de bioseguridad. Lima: MINSA - INS; 1996. Serie de Normas Técnicas N° 18.
2. **Bauer J.** Análisis clínicos. Métodos clínicos e interpretación. 1ª ed. Barcelona: Editorial Reverté S.A., 1986.
3. **Hayhoe F, Flemans R.** Atlas color de citología hematológica. 2ª ed. México: Editorial Médica Panamericana, 1999.
4. **Muñoz M.** Guías de Práctica de hematología y trombosis. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina. Escuela Académico Profesional de Tecnología Médica, 1995.
5. **Ministerio de Salud del Perú - Instituto Nacional de Salud.** Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras. Lima: MINSA - INS, 1995. Serie de Normas Técnicas N° 15.
6. **Pagana K, Pagana T.** Guía de pruebas diagnósticas y de laboratorio. 2ª ed. Barcelona: Mosby/Doyma Libros, 1996.
7. **Organización Panamericana de la Salud.** Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud. Washington: OPS, 1983. Publicación Científica N° 439.
8. **Hillman R, Finch C.** Red cell manual. 7ª ed. Philadelphia: F.A. Davis, 1996.
9. **Lewis S.** Garantía de calidad en hematología. Organización Panamericana de la Salud. 2ª ed. Lima . Editorial Geneva, 1995.
10. **Rapaport S.** Introducción a la hematología. 2ª ed. México: Salvat Editores; 1989.
11. **Velásquez J.** Hematofisiología. 1ª ed. Lima: Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Editorial Avicenum, 1993.
12. **Salgado A, Vilardell M.** Manual clínico de pruebas de laboratorio. Barcelona: Mosby/Doyma Libros, 1996.
13. **Vives J, Aguilar J.** Manual de técnicas de laboratorio en hematología. Barcelona: Salvat editores, 1990.
14. **Ministerio de Salud del Perú - Instituto Nacional de Salud.** Manual de normas de bioseguridad. Lima: MINSA - INS. Serie de Normas Técnicas N° 18, 2ª ed. 1997.

15. **Balcels A.** La clínica y el laboratorio. Interpretación de análisis y pruebas funcionales. 18ª ed. Barcelona: Editorial Masson, 2001.
16. **Ministerio de Salud del Perú - Instituto Nacional de Salud.** Manual de procedimientos para el diagnóstico de anemia por hemoglobímetro. Lima: MINSA - INS, Serie de Normas Técnicas N° 25, 1997
17. **Lovesio C, Miroli A.** Hemorragias y trombosis en clínica y cirugía. 2ª edición. Argentina. Editorial Librería "El Ateneo", 1990.

ANEXO A

PREPARACIÓN DE COLORANTES Y SOLUCIONES MÁS USADOS EN HEMATOLOGÍA

A.1 SOLUCIÓN DE GOWER

A.1.1 Reactivos

| | |
|-----------------------|---------|
| Sulfato de sodio | 12,5 g |
| Ácido acético glacial | 33,3 mL |
| Agua destilada c.s.p | 200 mL |

A.1.2 Procedimiento

A.1.2.1 Disolver el sulfato de sodio y el ácido acético glacial en el agua destilada. Guardar en lugar fresco.

A.2 SOLUCIÓN DE HAYEM

A.2.1 Reactivos

| | |
|-----------------------|--------|
| Bicloruro de mercurio | 0,5 g |
| Sulfato de sodio | 5,0 g |
| Cloruro de sodio | 1,0 g |
| Agua destilada | 200 mL |

A.2.2 Procedimiento

A.2.2.1 Se mezclan todos los reactivos y se guarda en frasco de vidrio en lugar fresco.

A.3 SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA AL 0,9%

A.3.1 Reactivos

| | |
|-----------------------|--------|
| Cloruro de sodio | 0,9 g |
| Agua destilada c.s.p. | 100 mL |

A.6.2 Procedimiento

Mezclar todos los reactivos y guardar en frasco de vidrio en lugar fresco.

A.7 COLORANTE DE GIEMSA

A.7.1 Reactivos

| | |
|------------------------------|---------|
| Colorante Giemsa en polvo | 1,0 |
| Metanol (CH ₃ OH) | 66,0 mL |
| Glycerol | 66,0 mL |

A.7.2 Procedimiento

A.7.2.1 Disolver el colorante con el glicerol.

A.7.2.2 Adicionar el metanol, mezclar bien y dejar a temperatura ambiente de 7 a 14 días (maduración).

A.7.2.3 Filtrar antes de su empleo. Guardar en frasco color caramelo.

A.8 COLORANTE DE LEISHMAN

A.8.1 Reactivos

| | |
|------------------------------|---------|
| Colorante de Leishman | 1,5 g |
| Metanol (CH ₃ OH) | 100 mL. |

A.8.2 Procedimiento

A.8.2.1 Disolver el colorante en metanol y trasvasarlo a un frasco oscuro o color caramelo, agitar, luego filtrar.

A.9 COLORANTE DE WRIGHT

A.9.1 Reactivos

| | |
|------------------------------|---------|
| Colorante de Wright | 0,3 g |
| Metanol (CH ₃ OH) | 97,0 mL |
| Glycerol | 3,0 mL |

A.9.2 Procedimiento

A.9.2.1 Disolver en un mortero el colorante con el glicerol. Una vez disuelto se adiciona el metanol trasvasándolo a un frasco oscuro (color caramelo), luego agite. Filtrar antes de usar.

A.10 COLORANTE DE MAY-GRUNWALD

A.10.1 Reactivos

| | |
|---------------------------------|--------|
| Colorante May-Grunwald en polvo | 0,3 g |
| Alcohol metílico absoluto | 100 mL |

A.10.2 Procedimiento

A.10.2.1 Calentar la mezcla a 56°C hasta la disolución completa del colorante. Dejar enfriar en nevera a 4°C durante 24 horas, agitando de vez en cuando. Filtrar antes de su empleo.

A.11 COLORANTE DE MAY-GRUNWALD-GIEMSA

A.11.1 Es el resultado de combinar el colorante de Giemsa con la de May-Grunwald y se le conoce con el nombre de tinción panóptica. En esta coloración resalta especialmente las granulaciones de los neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

A.12 SOLUCIÓN DE PROCAÍNA

A.12.1 Reactivos

| | |
|-----------------------|---------|
| Procaína (polvo) | 3 g |
| Cloruro de sodio | 200 mg |
| Agua destilada c.s.p. | 1000 mL |

A.12.2 Procedimiento

A.12.2.1 Mezclar los reactivos en agua destilada y completar hasta llegar a un litro. Guardar en refrigeración a 4°C.

ANEXO B

PREPARACIÓN DE ANTICOAGULANTES

B.1 ANTICOAGULANTE DE WINTROBE

B.1.1 Reactivos

| | |
|--|------------------|
| Oxalato de Amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) | 1,2 g (3 partes) |
| Oxalato de Potasio ($\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) | 0,8 g (2 partes) |
| Agua destilada c.s.p. | 100 mL |

B.1.2 Procedimiento

B.1.2.1 Mezclar y disolver todos los reactivos en el agua destilada y colocar en frasquitos 0,1 mL de la solución por cada mL de sangre; usualmente 0,3 a 0,4 mL y poner a secar en estufa hasta que se observe un polvo blanco por aproximadamente 20 minutos.

B.2 ANTICOAGULANTE CITRATO DE SODIO al 3,8%

B.2.1 Reactivos

| | |
|-----------------------|--------|
| Citrato de Sodio | 3,8 g |
| Agua destilada c.s.p. | 100 mL |

B.2.2 Procedimiento

B.2.2.1 Se mezcla el citrato de sodio en el agua destilada.

B.2.2.2 Para pruebas de hemostasia se emplea a razón de 1/9 (1 volumen de anticoagulante para 9 volúmenes de sangre) y para la VSG la proporción de 1/4 (un volumen de anticoagulante para 4 volúmenes de sangre).

B.3 SOLUCIÓN DE ACD (ÁCIDO CÍTRICO-DEXTROSA)

B.3.1 Reactivos

| | |
|-------------------------------|------|
| Acido cítrico monohidratado | 8 g |
| Citrato trisódico dihidratado | 22 g |

| | |
|-----------------------|---------|
| Dextrosa | 25 g |
| Agua destilada c.s.p. | 1000 mL |

Se emplea en proporción de $\frac{1}{4}$ (1 vol. de ACD + 4 vol. de sangre).

B.3.2 Procedimiento

B.3.2.1 Se mezcla todos los reactivos con el agua destilada.

B.3.2.2 Se emplea en proporción de 1:4 (1 volumen de ACD + 4 volúmenes de sangre).

FORMATO PARA EXPEDICIÓN DE RESULTADOS

Nombre del paciente :
Nombre del médico :
Muestra :
Examen :

RESULTADOS

Recuento de hematíes : (/mm³)
Recuento de leucocitos : (/mm³)
Determin. de hemoglobina : (g/dL)
Vol. globular (hematocrito) : (%)

FÓRMULA LEUCOCITARIA

| | |
|----------------------|------------------------|
| Neutrófilos :% | Blastos :% |
| Eosinófilos:% | Promielocitos :% |
| Basófilos :% | Mielocitos :% |
| Monocitos :% | Metamielocitos:% |
| Linfocitos :% | Abastoados :% |
| | Segmentados :% |

OBSERVACIONES:

- Observar el número aproximado de plaquetas (normales, disminuídas, elevadas). Asimismo las alteraciones cualitativas y cuantitativas.
- Ver la morfología, tamaño, inclusiones y contenido hemoglobínico en los hematíes.
- Observar la morfología, tamaño, inclusiones granulocitarias y agranulocitarias.
- Otras observaciones (presencia de normoblastos, hemoparásitos, etc).

CEPREDIM



SE TERMINÓ DE IMPRIMIR
EN EL MES DE MARZO DE 2005
EN LOS TALLERES GRÁFICOS DEL
CENTRO DE PRODUCCIÓN EDITORIAL E IMPRENTA DE
LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
JR. PARURO 119. LIMA 1. TELEFAX: 428-5210
CORREO ELECTRÓNICO: CEPEDIT@UNMSM.EDU.PE
TIRAJE: 1000 EJEMPLARES