



# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

---

FACULTAD DE QUIMICA

## *“MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN HEMATOLOGIA”*

TESINA PRÁCTICA  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A:  
VERÓNICA HERNÁNDEZ ALFARO

QUERÉTARO, QRO.



1996

# ÍNDICE.

<b>FROTIS SANGUÍNEO .....</b>	<b>2</b>
<b>TINCIONES ESPECIALES .....</b>	<b>3</b>
TINCION DE LOS CUERPOS DE HEINZ .....	3
TINCION DE LA PEROXIDASA .....	5
TINCION DE LA FOSFATASA ALCALINA .....	8
TINCION CON ACIDO PERYODICO-SCHIFF (PAS) .....	13
<b>EXAMEN DE LA MEDULA ÓSEA .....</b>	<b>16</b>
<b>HIERRO SERICO .....</b>	<b>19</b>
<b>CAPACIDAD TOTAL DE FIJACIÓN DEL HIERRO.....</b>	<b>22</b>
<b>ESTUDIO DE ANEMIAS HEMOLÍTICAS .....</b>	<b>25</b>
ANEMIAS HEMOLITICAS .....	25
PRUEBAS PRESUNTIVAS PARA LA HEMOGLOBINURIA PAROXISTICA NOCTURNA .....	29
PRUEBA DEL SUERO ÁCIDO PARA LA HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA .....	32
FRAGILIDAD OSMÓTICA CUANTITATIVA .....	34
PRUEBA DE LA AUTOHEMOLISIS EN GLUCOSA .....	37
PRUEBA DE CELULAS FALCIFORMES .....	41
<b>COAGULACIÓN .....</b>	<b>42</b>
PRUEBA DEL TORNIQUETE .....	46
TIEMPO DE SANGRADO .....	47
TIEMPO DE COAGULACIÓN .....	49
RETRACCIÓN DEL COÁGULO .....	51
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE FACTORES .....	52
PRUEBAS PRESUNTIVAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS DEFICIENCIAS DE PROTROMBINA Y DE LOS FACTORES V, VII Y X .....	54
CONSUMO DE PROTROMBINA .....	57
TIEMPO DE TROMBINA .....	59
INHIBIDORES DE LA COAGULACION. DOSIFICACION DE ANTITROMBINA III .....	60
FIBRINOGENO .....	63
DETERMINACION DE FIBRINOGENO POR TERMOPRECIPITACION .....	65
TIEMPO DE LISIS DE EUGLOBULINAS .....	67
SULFATO DE PROTAMINA .....	70
GELACION DE ETANOL .....	72
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>74</b>



## ÍNDICE DE TABLAS.

	Pag.
<b>Tabla 1.</b> Criterios de recuento para la fosfatasa alcalina leucocitaria.	10
<b>Tabla 2.</b> Médula ósea normal.	17
<b>Tabla 3.</b> Resumen de diversos tipos de reacción que pueden o observarse en frotis delgados del material aspirado de la médula ósea.	18
<b>Tabla 4.</b> Prueba del suero ácido para la hemoglobinuria paroxística nocturna.	33
<b>Tabla 5.</b> Fragilidad osmótica cuantitativa.	34
<b>Tabla 6.</b> Prueba de autohemólisis en personas sanas (48 horas) y los tres tipos de anemia que se han observado.	39
<b>Tabla 7.</b> Pruebas presuntivas para la determinación de las deficiencias de protrombina y de los factores V, VII y X.	54

# FROTIS SANGUÍNEO

Puede obtenerse más información de un examen apropiado del frotis sanguíneo por un observador competente que por cualquier otro examen de laboratorio. Sin embargo, es necesario, antes de poder obtener esta información, el conocimiento de los límites de la variación normal. Este conocimiento sólo se adquiere mediante la práctica.

Por tanto, es muy importante que los estudiantes de Química encaminados al área clínica examinen personalmente el frotis sanguíneo en cada uno de los casos que estén revisando. Si cada alumno hace habitualmente de ello una parte integral del estudio de cada paciente, los beneficios serán importantes y adquirirá una gran competencia.

La práctica común de dejar el examen del frotis sanguíneo al técnico se traduce en una pérdida de información valiosa, de la que podría disponerse. El técnico efectúa normalmente sólo un recuento diferencial, y debido a la falta de tiempo, experiencia o con visión global del cuadro del paciente, se ve incapaz de examinar con detalle la morfología de los hematíes, plaquetas y leucocitos. Por otra parte, en este caso el químico pierde la oportunidad de aumentar su experiencia y su competencia.

El examen morfológico debe ser efectuado por un Químico, pues su formación académica le permite manejar la CITOLOGÍA, CITOQUIMICA Y FISIOPATOLOGIA, lo cual le da una gran ventaja sobre otras personas ajenas a los laboratorios, sobre todo el Médico, que su función es el diagnóstico clínico, pronóstico y tratamiento; y es responsabilidad del Químico su aporte en el diagnóstico de laboratorio. Frecuentemente existe una disociación entre estos dos profesionistas pero cuando aprendan a respetarse, el único beneficiado será el enfermo.



# TINCIONES ESPECIALES

## TINCION DE LOS CUERPOS DE HEINZ.

### Técnica

1. Colóquese un volumen de sangre y dos volúmenes de una solución salina de cristal violeta en un tubo de ensayo pequeño.
2. Mézclase suavemente y déjese en reposo a la temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. Póngase una gota pequeña de la mezcla sobre un cubreobjetos limpio.
4. Inviértase el cubreobjetos sobre un portaobjetos limpio. Quítese el exceso de tinción con un trozo de papel filtro, sellar con parafina y observar.

### Comentarios

1. Puede hacerse una preparación semipermanente colocando una gota de la mezcla sobre un cubreobjetos. Prepárese los frotis del modo habitual, séquese al aire y móntese luego el bálsamo.
2. El colorante recomendado en este procedimiento es el cristal violeta. Color Index.

### Interpretación

1. Los cuerpos de Heinz aparecen como cuerpos de color púrpura intenso, de forma irregular, cuyos tamaños varían desde puntos apenas perceptibles a esferas de 2  $\mu$  de diámetro. Pueden encontrarse uno o más en un célula. Por lo general están colocados excéntricamente y junto a la membrana celular. Pueden sobresalir del hematíe por un pedúnculo o se presentan libres en el plasma.

2. Los cuerpos de Heinz pueden verse fácilmente en una preparación reciente, húmeda, no teñida, donde aparecen como cuerpos globulares refráctiles. Se tiñen con azul brillante de cresilo, pero menos intensamente que con cristal violeta. No son visibles en las preparaciones de tinción de Wright.

3. Los cuerpos de Heinz consisten en hemoglobina precipitada, desnaturalizada o cadenas peptídicas de globina a las que están unidos los grupos heme. Los cuerpos de Heinz se producen tanto *in vivo* como *in vitro* por la acción de drogas oxidantes y están asociados generalmente a una anemia hemolítica. Se encuentran prominentemente en la sangre de los individuos esplenectomizados. Los hematíes de los pacientes con el tipo de anemia hemolítica \* primaquina-sensible \* son susceptibles a la formación de cuerpos de Heinz tanto *in vitro* como *in vivo*. Se han descrito anemias congénitas de cuerpos de Heinz sin asociación con ingestión de drogas. Pueden observarse cuerpos de Heinz en eritroblastos, reticulocitos y hematíes maduros en pacientes con talasemia mayor, particularmente después de la esplenectomía.

## Reactivo

### *Solución de cristal violeta*

Cristal violeta ( Color Index )	2.0 g.
Solución salina (0.85 % )	100 ml.
Agítese durante 15 minutos y filtre.	
Mézclese el filtrado con igual volumen de solución salina al 0.85%.	

La solución de colorante es estable a la temperatura ambiente durante un período de seis meses.



## TINCION DE LA PEROXIDASA.

### Técnica

1. Prepárese frotis sanguíneos del modo habitual (Técnica del portaobjetos).
2. Fijese los frotis durante 60 segundos a la temperatura ambiente en formaldehído-etanol al 10 %.
3. Lávese durante 15 a 30 segundos en agua corriente que fluya suavemente y sacúdase el exceso de agua.
4. Cúbrase el frotis con la mezcla de incubación durante 30 segundos a la temperatura ambiente.
5. Lávese durante 5 a 10 segundos en agua corriente fluyente y déjese secar al aire.
6. Móntese el cubreobjetos sobre el portaobjetos con una gota pequeña de aceite de inmersión.

### Comentarios

1. La heparina, el oxalato y la EDTA no son inhibidores, pero se recomienda que todos los frotis se hagan con sangre capilar reciente, sin exponer a un anticoagulante, a fin de preservar al máximo los detalles morfológicos.
2. La enzima peroxidasa no es estable a la luz. Por ello, los frotis deben ser de tinción reciente o mantenerse en la oscuridad. La actividad puede preservarse durante varias semanas si los frotis se mantienen en la oscuridad.
3. El método ha sido desarrollado para el uso del diclorhidrato de bencidina y no bencidina base. La bencidina base es carcinogénica y su producción es limitada por los peligros de fabricación. El diclorhidrato de bencidina también es carcinogénico, pero dado que es más granular y menos pulverulento que la base, resulta menos peligroso su manejo. Pueden efectuarse tinciones satisfactorias con el sulfato de bencidina, pero este derivado es menos soluble y menos granular que el diclorhidrato.
4. La safranina O (Color Index ) se añade para teñir los núcleos. Si desea mayor detalle nuclear, la preparación puede reteñirse con acetato de violeta de cresilo acuoso al 1% durante un minuto.

## Interpretación

1. Los gránulos peroxidasa-positivos se encuentran en los promielocitos, mielocitos, metamielocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos. Los mieloblastos, linfoblastos, linfocitos, basófilos y las células plasmáticas son peroxidasa-negativos.

2. Los gránulos en los promielocitos son pequeños y de color azul-verde. Los gránulos en los neutrófilos son abundantes, grandes y azul-negro. Los gránulos en los eosinófilos están teñidos intensamente y son de color pardo-negro o verde-negro. Los monocitos se tiñen menos intensamente que los neutrófilos y los eosinófilos.

3. La tinción peroxidasa puede ser valiosa para diferenciar la leucemia linfoblástica. Los gránulos en los promielocitos precoces (mieloblastos tipo II) se visualizan más fácilmente con la tinción de peroxidasa que con la tinción de Wright.

## Reactivos

### *Fijador*

Formaldehído ( 37 % )	10	ml.
Alcohol etílico absoluto	90	ml.

### *Solución de sulfato de zinc*

Sulfato de zinc ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	3.8	g.
Dilúyase a 100 ml. con agua destilada.		

### *Mezcla de incubación*

Alcohol etílico (30%)	100	ml.
Diclorhidrato de bencidina	0.3	g.
Solución de sulfato de zinc	1	ml.
Acetato sódico ( $NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$ )	1	g.
Agua oxigenada (3%)	0.7	g.
Hidróxido sódico (1.0 N)	1.5	ml.
Safranina O (Color Index)	0.2	g.



Los reactivos deben añadirse según el orden de la lista, mezclando bien tras cada adición. El diclorhidrato de bencidina se disuelve con dificultad. Esta puede solventarse añadiendo 0.3 g. de diclorhidrato de bencidina a 20 ml. de alcohol etílico al 30 % y agitando bajo un grifo de agua caliente hasta obtener la solución. Luego se añaden los restantes 80 ml. de alcohol etílico al 30%. Aun bajo estas condiciones la sal de bencidina puede contener una pequeña cantidad de residuo inerte que no entra en solución. Se forma un precipitado con la adición del sulfato de zinc, que se disuelve al agregar los reactivos restantes. El pH final es  $6.00 \pm 0.5$ . Se filtrará la solución y se conservará en frasco topacio a la temperatura ambiente. La solución es estable durante seis meses y puede usarse repetidas veces.

# TINCION DE LA FOSFATASA ALCALINA.

## Técnica

1. Prepárese un frotis delgado del modo habitual.
2. Fíjese durante 15 segundos a la temperatura ambiente en amortiguador de acetona.
3. Lávese cuidadosamente con agua fluyente durante 30 segundos a 60 segundos y séquese al aire.
4. Cúbrase los frotis con la mezcla de incubación *recién preparada* durante 10 minutos exactamente a la temperatura ambiente. Evítese la exposición del frotis a la luz solar directa.
5. Lávese cuidadosamente en agua fluyente durante 30 a 60 segundos.
6. Retíñase durante 5 a 8 minutos con hematoxilina Mayer filtrada.
7. Lávese con agua fluyente durante 1 a 2 minutos y séquese al aire.
8. Móntese el cubraobjetos sobre el portaobjetos con una gota pequeña de aceite de inmersión.

## Comentarios

1. La enzima leucocitaria fosfatasa alcalina hidroliza el sustrato naftol AS-B1 fosfato a una arilnaftolamida y fosfato. La arilnaftolamida se copula inmediatamente a la sal de diazonio, Red Violeta LB, para formar un colorante azo rojo insoluble.
2. El frotis sanguíneo debe prepararse con sangre capilar que no haya estado expuesta a un anticoagulante. Sin embargo, la heparina puede usarse como anticoagulante. La EDTA inhibe la reacción y debe evitarse.



3. El frotis debe fijarse tan pronto como sea posible, pero no más tarde de 8 a 10 horas después de la toma de sangre. Los frotis deben teñirse inmediatamente después de la fijación o conservarse a  $-18^{\circ}$  C. Alrededor del 90 % de la actividad puede preservarse durante dos a tres semanas si se conservan los frotis a esta temperatura. Sin embargo, es preferible recoger, fijar y teñir el frotis sanguíneo en el mismo día.

4. Los frotis teñidos pueden secarse y conservarse a la temperatura ambiente durante semanas sin pérdida de actividad mientras no se hayan aplicado aceites de inmersión o medios de montaje. Una preservación adecuada de preparaciones teñidas se puede obtener para alrededor de un mes si se usa gelatina glicerizada o Permout como medio de montaje.

5. La acetona tamponada con citrato es preferida a la mezcla formaldehído-metanol fría, propuesta originariamente. La acetona tamponada es menos inhibidora que el metanol-formaldehído y los frotis son menos fáciles de eliminar por lavado. La única desventaja radica en que los eosinófilos son más difíciles de identificar que con el antiguo fijador.

6. La sal de diazonio Fast Red Violet LB es sensible a la luz y al calor, debiéndose conservar en un frasco topacio.

7. Las sales de naftol AS-CL, AS-TR, AS-AN y AS-E fosfato pueden sustituirse por el naftol AS-B1 fosfato. Todos estos compuestos dan colorantes azo rojos cuando se copulan con la sal de diazonio Red Violet LB.

8. Debe efectuarse un control de cada lote de preparaciones. Se hará una cantidad de frotis de una muestra única de sangre de una persona con fosfatasa alcalina leucocitaria normal. Los frotis se fijarán inmediatamente y se conservarán a  $-18^{\circ}$  C. Cada vez que se tiña un frotis desconocido, se teñirá uno de los frotis control. Los valores de control se llevan a una gráfica con el tiempo y, si aparece una desviación significativa (mayor que  $\pm 17\%$ ) de los valores de control previos, se anota en seguida e indica que la tinción no funciona apropiadamente. Se preparará cada tres semanas un lote reciente de frotis de control.

## Interpretación

1. Las células fosfatasa alcalina positivas contienen granulaciones discretamente rosa en los citoplasmas que varían en color desde rosa muy pálido hasta rojo rubí brillante. Las granulaciones varían en tamaño desde puntos diminutos a gránulos grandes o estructuras en forma de varillas. Es llamativo el contraste del citoplasma rojo en los núcleos azul-negro.

2. La actividad fosfatasa alcalina se encuentra sólo en metamielocitos neutrofilicos y en neutrófilos maduros. Todas las demás células de la sangre son negativas. En la médula ósea también se tiñen intensamente las células endoteliales.



3. La cantidad de material fosfatasa alcalina positiva en una célula puede graduarse desde 0 a 4+ de acuerdo con la cantidad de colorante azo precipitado en el citoplasma, el tamaño de los gránulos y la intensidad de la tinción (ver tabla anexa). Se cuentan y se gradúan un centenar de neutrófilos consecutivos (metamielocitos y neutrófilos polimorfonucleares). El número total se obtiene de la siguiente manera: número de 1+ células x 1+ número de 2+ células x 2+ número de células 3+ x 3+ número de células 4+ x 4. Así, los totales pueden variar desde un mínimo de cero a un máximo de 400.

4. La valoración de las células es una cuestión subjetiva y depende de cierto modo de la sensibilidad visual del examinador para el color rojo. Por otra parte, es necesario que los examinadores se pongan de acuerdo en la definición de las células 1+, 2+, 3+ y 4+, si deben compararse los resultados por ellos obtenidos.

5. Debido a la variación en la graduación entre los examinadores resulta conveniente que cada laboratorio determine sus propios valores normales a partir del recuento efectuado por un solo individuo.

6. Los recuentos bajos anormales se observaron en la sangre de pacientes con leucemia mielocítica crónica, hemoglobinuria paroxística nocturna e hipofosfatasa hereditaria. El recuento está aumentado en la sangre de los pacientes con policitemia vera, mielofibrosis y neutrofilia secundaria a infecciones. En los pacientes con neutrofilia no leucémica el recuento de la fosfatasa alcalina leucocitaria aumenta con el aumento del recuento de leucocitos totales. La tinción de la fosfatasa alcalina está disminuida en los neutrófilos de los pacientes con leucemia mielocítica crónica sin relación al recuento total de los leucocitos. Por ello, el test tiene valor para distinguir una reacción mieloide no leucémica de la leucemia mielocítica crónica, especialmente si la cantidad de leucocitos es mayor de 30 000 por  $\text{mm}^3$ , y el recuento menor de 30.

**Tabla 1.** *Criterios de recuento para la fosfatasa alcalina leucocitaria.*

Clasificación de células	Colorante azo precipitado en el citoplasma			Fondo del citoplasma
	Cantidad	Tamaño de gránulos	Intensidad de tinción	
0	0	Ninguno	Ninguna	No teñido
1+	50%	Pequeño	Ligero a moderado	Incoloro a rosa muy pálido
2+	40-80 %	Pequeño a mediano	Moderado a fuerte	Incoloro a rosa pálido
3+	80-100%	Mediano a grande	Fuerte	Incoloro a rosa
4+	100 %	Mediano y grande	Brillante	No visible



## Reactivos

### *Solución de citrato sódico (0.03 M)*

Citrato sódico . 2H<sub>2</sub>O 4.41 g.  
Dilúyase a 500 ml. con agua destilada.

### *Solución de ácido cítrico (0.03 M)*

Ácido cítrico . H<sub>2</sub>O 3.15 g.  
Dilúyase en 500 ml. de agua destilada.

### *Acetona amortiguada fijadora (pH 4.2 a 4.5)*

Solución de citrato sódico (0.03 M) 32 ml.  
Solución de ácido cítrico (0.03 M) 168 ml.  
Acetona absoluta 300 ml.

La acetona debe añadirse lentamente y agitando el tampón de citrato . La solución de acetona tamponada con citrato es estable y puede conservarse a la temperatura ambiente tres a seis semanas.

### *Solución madre de propanodiol (0.2 M)*

2 amino-2 metil-1, 3 propanodiol 21 g.  
Dilúyase a 1000 ml. con agua destilada.  
Consérvese en la nevera.

### *Amortiguador de propanodiol (0.05 M, pH 9.5 a 9.7)*

Solución madre de propanodiol (0.2 M) 250 ml.  
Ácido clorhídrico (0.1 N) 50 ml.

Dilúyase a 1000 ml. con agua destilada.

Consérvese en la nevera, pero póngase a la temperatura ambiente antes de su uso.

### *Mezcla de incubación*

Disuélvase alrededor de 5 mg. de la sal sódica de naftol AS-B1 fosfato en 0.2 a 0.3 ml. de dimetilformamida (grado reactivo) en un frasco Erlenmeyer de 125 ml. , limpio y seco. Añádanse 60 ml. de tampón de propanodiol 0.05 M (pH 9.5 a 9.7). Añádanse 40 mg de Fast Red Violet Salt LB. Agítese bien y filtrese.

Esta solución debe prepararse cada vez y se usará dentro de los 30 minutos. No debe exponerse a la luz solar directa durante su preparación o mientras se incuban los frotis. No es necesario pesar exactamente el naftol y la sal de diazonio y, con experiencia, es suficiente una aproximación a ojo de las cantidades.

#### *Tinción hematoxilina Mayer*

Añádase 1 g. de hematoxilina (Color Index ) a 500 ml. de agua. Calíntese hasta ebullición y añádanse otros 500 ml. de agua. Añádanse 0.2 g. de yodato sódico (grado reactivo) y 50 g. de sulfato aluminico-potásico (  $12 \text{ H}_2\text{O}$  ). Agítese bien y fíltrese. Consérvese en un frasco topacio a la temperatura ambiente.

El 2 amino-2 metil-1, 3 propanodiol puede adquirirse en catalogo de proveedores; la sal sódica de naftol AS-B1 igualmente.



## TINCIÓN CON ACIDO PERYODICO-SCHIFF (PAS)

### Finalidad de la prueba.

La reacción de PAS puede ser útil en el diagnóstico de algunos casos de eritroleucemia y de leucemia aguda linfocítica.

### Principio de la prueba.

El ácido peryódico oxida los glicoles y los compuestos relacionados con los aldehídos. Los aldehídos pueden entonces reaccionar con el reactivo de Schiff (leucofucsina) liberando fucsina y tiñéndose los componentes celulares que contienen compuestos oxidables. Gran variedad de compuestos intracelulares reaccionan con el reactivo de PAS, pero en las células de la sangre y de la médula ósea, el glucógeno parece ser el compuesto principalmente responsable, ya que la tinción puede ser bloqueada por digestión con amilasa.

### Reactivos y Material.

1. *Formalina alcohólica.* Mezclar 10 ml. de formaldehído al 36% con 90 ml. de etanol al 95%.

2. *Amilasa.* La saliva humana estimulada por la masticación de parafina y aclarada por centrifugación es adecuada o una solución de 0.1 a 1 gr. de diastasa máltica comercial en fosfato sódico 0.02 M tamponado a pH 6.

3. *Ácido peryódico.* Se añaden 0.69 gr. de  $KIO_4$  a 100 ml. de agua destilada, seguido por 0.3 ml. de  $NO_3H$  concentrado. Los cristales de  $KIO_4$  son disueltos por calentamiento. La solución se puede guardar a temperatura ambiente.

4. *Reactivo de Schiff.* Poner a ebullición 100 ml. de agua destilada, removiendo durante el calentamiento e inmediatamente añadir 1 g. de fucsina básica. Primero, se añade una pequeña cantidad de colorante y se agita en el agua; después se añade el resto, a fin de evitar el violento burbujeo que se produce al añadir una gran cantidad de partículas finas al agua cerca del punto de ebullición. La mezcla se deja enfriar hasta  $60^\circ$  y se filtra. Luego se añaden al filtrado 2 g. de  $SO_3HNa$  o  $S_2O_5Na_2$  y 20 ml. de ácido clorhídrico 1N. La solución se coloca en una botella tapada y se deja a temperatura ambiente de 18 a 26 horas. Entonces se añaden 300 mg. de carbón animal activado y la mezcla se agita durante 1 minuto. Después se filtra y el filtrado se deja a  $4^\circ$  en un cuarto oscuro. La solución puede ser empleada hasta que se haga ligeramente rosada.

5. *Metabisulfito sódico.* La solución se prepara disolviendo 0.5 g. de metabisulfito sódico en 100 ml. de agua. Se prepara en fresco diariamente.

6. *Hematoxilina de contraste.* La hematoxilina de Harris obtenida comercialmente es satisfactoria.



Si se emplean cubreobjetos, pueden ser colocados en un recipiente de porcelana y los reactivos en cubetas de tinción (Chen). Si se emplean portaobjetos pueden ser colocados en recipientes de Coplin.

### **Técnica.**

1. Las extensiones de sangre periférica o médula ósea se secan al aire y se fijan en formalina alcohólica durante 5 minutos.

2. Las extensiones fijadas se lavan con agua corriente durante 15 minutos.

3. Si las extensiones van a ser digeridas, se cubren con una solución de saliva o diastasa durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se lavan con agua corriente durante 10 minutos.

4. Las extensiones se tratan con ácido peryódico a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se lavan con agua corriente durante 5 minutos. Las extensiones previamente teñidas con tinción de Wright o de Giemsa pueden ser teñidas con PAS, empezando con este paso.

5. Las extensiones se sumergen en el reactivo de Schiff durante 10 minutos. Después se pasan rápidamente a través de tres baños sucesivos de metabisulfito sódico y a continuación se lavan durante 5 minutos con agua corriente.

6. Los núcleos se tiñen por inmersión de las extensiones en hematoxilina de Harris durante 10 minutos.

7. Se lavan las extensiones con agua corriente durante 5 minutos.

8. Las extensiones son secadas al aire y examinadas microscópicamente.

### **Interpretación.**

En la sangre periférica, el citoplasma de los leucocitos polimorfonucleares se tiñe intensamente de color rosa o rojo, con un aspecto granular en algunas células. El citoplasma de los monocitos se tiñe débilmente de color rosa y puede contener gránulos finos o gruesos.



Un pequeño número de linfocitos contienen algunos pequeños gránulos rojos o rosados. Los eritrocitos no se tiñen. Las plaquetas se tiñen intensamente. En la médula ósea normal, los precursores granulocitarios más primitivos no se tiñen. Las tinciones citoplásmicas difusas o granulares aumentan con el aumento de madurez de las células mieloides. Los megacariocitos se tiñen difusamente e intensamente de color rosa o rojo. Los precursores eritrocitarios no se tiñen. Los núcleos de todas las células se tiñen de azul. La digestión con amilasa se ha observado que elimina el material teñido del citoplasma de todos los tipos de células sanguíneas.

En la eritroleucemia y en algunos casos de anemia refractaria los precursores eritrocitarios de la médula se tiñen difusamente de color rosa o rojo o pueden contener gránulos rojos. Los precursores eritrocitarios son también PAS-positivos en la anemia ferropénica, talasemia y anemia hemolítica adquirida grave. La reacción es muy acentuada en las células de la eritroleucemia, pero puede ser notable en otras enfermedades y por otra parte la reacción de PAS sola no es suficiente para el diagnóstico de eritroleucemia. Las células PAS-positivas de la eritroleucemia o de la anemia refractaria son a menudo megaloblastoides, pero los megaloblastos son PAS-negativos en el déficit de vitamina B12, o de ácido fólico.

En la leucemia linfática aguda, los linfoblastos en algunos casos contienen múltiples gránulos PAS-positivos de tamaño variable, algunos grandes y formando acumulaciones de forma irregular. En la leucemia aguda granulocítica, los mieloblastos son PAS-negativos.

Los linfocitos de la sangre periférica de los pacientes con linfoma, incluyendo la enfermedad de Hodgkin, leucemia linfática crónica y micosis fungoide (síndrome de Sézary) contienen un importante número de gránulos PAS-positivos. Esto también se observa en enfermedades benignas tales como la mononucleosis infecciosa y no es de importancia diagnóstica. De particular interés son los linfocitos anormales en el síndrome de Sézary, que se ha sabido contienen gránulos PAS-positivos, los cuales no son de glucógeno; así se deduce de la imposibilidad de que estos gránulos sean eliminados por digestión con amilasa de las extensiones fijadas con metanol. La naturaleza de los gránulos en las células de Sézary parece ser incierta.



## EXAMEN DE LA MEDULA ÓSEA

En los frotis delgados teñidos de Wright pueden identificarse las células individuales y observarse interesantes detalles morfológicos. En las secciones gruesas no es posible la identificación de tipos celulares individuales. Por otra parte, el patrón histológico y la celularidad de la médula pueden observarse en las secciones gruesas, pero no en los frotis delgados. Puede ser engañoso el juicio de la celularidad de la médula a través de frotis delgados.

La única contraindicación de la aspiración medular es la de la hemofilia y trastornos afines.

**Preparación de frotis delgados.** Con las gotas de médula se preparan frotis y se tiñen con la tinción de Wright, teniendo en cuenta que el tiempo de fijación y el de tinción se incrementan unas dos veces en relación con el requerido para la sangre. Los frotis de médula ósea pueden teñirse también por otros métodos.

**Examen de los frotis delgados.** Todas las preparaciones deben examinarse primero bajo poco poder. Ciertas células como los megacariocitos, células de Gaucher y células carcinomatosas pueden ser pocas en número y no igualmente repartidas por todo el frotis. Gracias a su tamaño pueden señalarse fácilmente bajo poco poder. Si el examen se restringe a la inmersión en aceite, es posible que no se vean en absoluto.

Después de examinar toda el área del cubreobjetos con el objetivo de poco poder, se selecciona una buena área para el examen detallado bajo el objetivo de inmersión en aceite. Las células en esta área deben estar casi, pero no completamente, tocando unas a otras.

En ciertas circunstancias puede ser deseable hacer un recuento celular diferencial. Se efectúa sobre un total de 300 a 500 células y se anota el resultado para cada tipo de célula como porcentaje del total de células contadas. El cálculo de la relación Eritroide: Granulocítica puede ser muy útil. Esta se obtiene dividiendo el número total de células mieloides (mieloblastos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos y polimorfonucleares) por el número total de células eritroides (eritroblastos).



**TABLA 2. - Médula ósea normal**

---

---

<b>Tipo celular</b>	<b>Media</b>	<b>Intervalo (%)</b>
Mieloblastos	2.0	0.3 - 5.0
Promielocitos	5.0	1.0 - 8.0
Mielocitos, neutrófilos	12.0	5.0 - 19.0
eosinófilos	1.5	0.5 - 3.0
basófilos	0.3	0.0 - 0.5
Metamielocitos	22.0	13.0 - 32.0
Polimorfonucleares, neutrófilos	20.0	7.0 - 30.0
eosinófilos	2.0	0.5 - 4.0
basófilos	0.2	0.0 - 0.7
Linfocitos	10.0	3.0 - 17.0
Células plasmáticas	0.4	0.0 - 2.0
Monocitos	2.0	0.5 - 5.0
Células reticulares	0.2	0.1 - 2.0
Células mitóticas	0.0	0.0 - 2.0
Megacariocitos	0.4	0.0 - 3.0
Eritroblastos	22.0	7.0 - 32.0
Megaloblastos	0.0	0.0 - 0.0

---

  

Cociente mieloide:eritroide	3:1	2:1 - 5:1
-----------------------------	-----	-----------

---

---

### **Interpretación de los frotis delgados**

El cociente normal mieloide-eritroide para adultos es de 2 a 5:1. Las proporciones en los lactantes y niños es algo diferente y varía de acuerdo con la edad. El cociente mieloide-eritroide es bajo en el nacimiento (1.8:1), aumenta rápidamente durante las dos primeras semanas hasta valores tales como 11:1, y decrece gradualmente a 3:1 durante el primer año.

**TABLA 3.** - *Resumen de diversos tipos de reacción que pueden observarse en frotis delgados del material aspirado de la médula ósea.*

**I. Presencia de células que no se encuentran normalmente en la médula.**

- A. Células de mieloma.
- B. Células de carcinoma.
- C. Células de Gaucher.
- D. Células de Niemann-Pick.

**II. Presencia de parásitos**

- A. Leishmania.
- B. Histoplasma.
- C. Paludismo.

**III. Cociente E:M normal (5:1-2) o variable**

- A. Médula normal.
- B. Anemia aplásica.
- C. Mielosclerosis.
- D. Anemia mieloitística.

**IV. Cociente E:M disminuido (2:1-0.5)**

- A. Debido al aumento de células eritroides.
  - 1. Hiperplasia.
    - a) Anemia posthemorrágica.
    - b) Anemia deficitaria de hierro.
    - c) Anemia hemolítica.
    - d) Cirrosis hepática.
    - e) Policitemia vera.
    - f) Plumbismo.
  - 2. Hiperplasia megaloblástica
- B. Debido a la disminución de células mieloides.
  - 1. Agranulocitosis.

**V. Cociente E:M aumentado (1: 5+)**

- A. Debido al aumento de células mieloides.
  - 1. Leucemia mieloblástica.
  - 2. Leucemia mielocítica crónica.
  - 3. Infecciones.
  - 4. Reacciones leucemoides.
- B. Debido a la disminución de células eritroides (rara).
  - 1. Anemia hipoplásica de la infancia.
  - 2. Anemia hipoplásica eritroide en adultos.

**IV. Aumento de células no mieloides**

- A. Leucemia linfoblástica.
- B. Leucemia linfocítica crónica.
- C. Anemia aplásica.
- D. Mononucleosis infecciosa.



## HIERRO SERICO.

El hierro es un elemento que se combina con protoporfirina para formar el grupo hem y con diversas proteínas para originar enzimas importantes como catalasa, citocromo y peroxidasa. La absorción del hierro es máxima en el duodeno y disminuye progresivamente en las partes distales del intestino; debido a que la capacidad del cuerpo para excretar hierro es muy limitada, su absorción en el intestino debe ser controlada para que no se acumule en los tejidos y no alcance niveles tóxicos. La determinación de hierro sérico junto con la capacidad total de combinación y saturación de la transferrina permiten evaluar los niveles de este elemento en el organismo.

El  $\text{Fe}^{3+}$  unido a la transferrina es separado de ella por la adición de una solución amortiguadora (pH 1.9) y reducido simultáneamente al estado ferroso por la presencia del ácido ascórbico en la misma solución amortiguadora. El  $\text{Fe}^{2+}$  liberado reacciona con la batofenantrolina sulfonada, obteniéndose la formación de un complejo colorido cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de Fe.

### Técnica.

Preparar 3 tubos de ensayo de 13\*100 mm de acuerdo a la siguiente tabla (es recomendable realizar el problema y el estándar por duplicado):

	BLANCO	ESTÁNDAR	PROBLEMA
Amortiguador	2.0	2.0	2.0
Suero o plasma	---	---	0.5
Solución salina	0.5	---	---
Solución estándar 150 $\mu\text{g}/\text{dl}$	---	0.5	---
Mezclar vigorosamente y dejar en reposo mínimo de 20 minutos. Leer la absorbancia $A_1$ contra el blanco a una longitud de onda de 530 nm.			
Solución de batofenantrolina sulfonada	0.05	0.05	0.05
Mezclar inmediatamente, dejar reposar de 30 a 90 minutos. Leer la absorbancia $A_2$ contra el blanco a una longitud de onda de 530 nm.			

## Cálculo.

Calcular la concentración de hierro presente en el suero del paciente empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Fe } (\mu\text{g/dl}) = \frac{A_2 - A_1 \text{ del problema}}{A_2 - A_1 \text{ del estándar}} \times \text{Concentración del estándar en } \mu\text{g/dl}$$

## Comentarios.

1. El material de vidrio debe estar libre de Fe por lo que es necesario colocarlo toda la noche en ácido nítrico o clorhídrico diluido con un volumen igual de agua; al día siguiente se enjuaga con agua libre de hierro y se deja secar.
2. El material biológico puede ser suero o plasma libre de hemólisis.
3. Para pipetear el material biológico y los reactivos de esta técnica es necesario emplear propipeta.
4. Los valores de referencia son de 65 a 175  $\mu\text{g/dl}$ .



## Reactivos.

### *Solución de batofenantrolina al 0.64%*

Batofenantrolina sulfonatada	0.64 g
Agua destilada c.b.p.	100 ml

### *Solución amortiguadora de glicina-HCl pH 1.9*

Glicina	0.75 g
Agua destilada c.b.p. (libre de Fe)	30 ml
Ajustar el pH a 1.9 +/- 0.02 con HCl 1 N	
Agua destilada c.b.p.	50 ml

### *Solución de ácido ascórbico al 0.5%*

Ácido ascórbico	50 mg
Agua destilada (libre de Fe)	10 ml

*Solución de trabajo: Ácido ascórbico al 0.5% en amortiguador de glicina-HCl pH 1.9.*

- 1 Volumen de amortiguador de glicina - HCl
- 2 Volúmenes de solución de ácido ascórbico al 0.5%

### *Solución de cloruro de sodio al 0.85%*

### *Solución estándar de hierro 150µg/dl*

Hierro G.R.	150 mg
Disolver en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N	
Agua destilada c.b.p.	100 ml

Agua desionizada

# CAPACIDAD TOTAL DE FIJACIÓN DEL HIERRO.

## Técnica

1. Pipetear 2 ml de suero recogido para la determinación del hierro sérico en un tubo de ensayo.
2. Pipetear 2 ml de agua en un segundo tubo para reactivo en blanco.
3. Añadir 5 ml de solución de cloruro férrico a cada tubo.
4. Mezclar durante unos segundos y dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 4 minutos.
5. Añádase aproximadamente 1.3 g. de carbonato magnésico a cada tubo, cerrar los tubos con Parafilm y colóquense en un agitador mecánico durante 45 minutos.
6. Centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 5 minutos.
7. Decantar las soluciones sobrenadantes a tubos de ensayo limpios y centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 15 minutos.
8. Pipetear 2 ml de las soluciones sobrenadantes en tubos de ensayo limpios.
9. Determinar el hierro sérico como ya hemos explicado, excepto que el valor K para la curva estándar se multiplica por 3.5, pues los 2 ml. del suero se diluyen a 7 ml. El valor obtenido representa la capacidad total de fijación del hierro (C.T.F.H.) expresada en  $\mu\text{g}$  de hierro/100 ml. de suero.

## Comentarios

1. El hierro se añade al suero para completar la saturación de la proteína ligadora del hierro. El exceso de hierro añadido es adsorbido por el carbonato magnésico, mientras que la proteína ligadora del hierro no es adsorbida. El hierro sérico medido entonces representa la capacidad total fijadora de hierro del suero.



2. El método es preciso y reproducible en sueros lipémicos, ictéricos y ligeramente hemolizados.

3. Los sueros pueden ser conservados en la nevera durante un período no superior a los siete días sin influir en los resultados. Los sueros pueden congelarse y conservarse indefinidamente.

4. El método no es preciso cuando se trabaja con sangre anticoagulada con EDTA u oxalato.

### Interpretación

El porcentaje de saturación de la proteína fijadora de hierro puede ser calculado por el hierro sérico (H.S.) en  $\mu\text{g} \%$ , y la capacidad total de fijación del hierro (C.T.F.H.) en  $\mu\text{g}$  de hierro /100 ml de suero, según:

$$\frac{\text{H.S.}}{\text{C.T.F.H.}} \times 100 = \% \text{ de saturación.}$$

La cantidad de capacidad de fijación del hierro no ligado (C.F.H.N.) en el suero puede ser calculada como sigue:

$$\text{C.T.F.H.} - \text{H.S.} = \text{C.F.H.N.}$$

La capacidad total de fijación del hierro está aumentada en el déficit de hierro y en el embarazo, y disminuido en la anemia asociada con afecciones crónicas, déficit proteico y estados de sobrecarga férrica. La hemosiderina de la médula ósea disminuye y desaparece antes de declinar otras medidas y mucho antes de aparecer la anemia. A continuación el hierro de los sideroblastos de la médula ósea y el hierro sérico disminuyen, la C.T.F.H. aumenta y finalmente se observa el cuadro completo de la anemia deficitaria de hierro. Los hematíes se hacen primero microcíticos y luego microcíticos e hipocrómicos

## Reactivos

### *Solución de cloruro férrico*

Cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ..... 25 mg

Ácido clorhídrico concentrado ..... 0.4 ml

Diluir a 1000 ml. con agua desionizada. Esta solución contiene aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  de hierro férrico/ml. en HCl 0.005 N.

### *Carbonato magnésico*

El carbonato magnésico en polvo ligero.



# ESTUDIO DE ANEMIAS HEMOLÍTICAS

## ANEMIAS HEMOLITICAS

Hereditarias	Adquiridas	Mixtas			
Membranopatías	Hemoglobinopatías	Enzimopatías	Inmunológica	No inmunológica	HPN
Esferocitosis	Hemoglobinopatías	Def. de PK	EHRN*	Tripanosoma	
Eliptocitosis	Talasemias	Def. de G-6PD.	AHAI*	Plasmodium	
Piropoiquilocitosis			T. incompatible	AHMA*	
Acantocitosis.			H./hapteno.	Traumática	

- \* EHRN: Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido.
- \* AHIA: Enfermedad Hemolítica Isoinmune Adquirida.
- \* AHMA: Anemia Hemolítica MicroAngiopática.

### DATOS GENERALES.

Tres investigaciones básicas de laboratorio permiten al diagnóstico de anemia y cierto conocimiento de su causa posible. Ellas son: 1) recuento de glóbulos rojos, hematocrito e índices sanguíneos; 2) Examen del frotis sanguíneo; 3) recuento de reticulocitos.

### Anemias hemolíticas.

Tres grupos de pruebas pueden emplearse para establecer la índole hemolítica de una anemia:

- \* Las pruebas del grupo I
- \* Las pruebas del grupo II
- \* Las pruebas del grupo III.

**Grupo I: Pruebas que evalúan la supervivencia de los eritrocitos.**

\*Tiempo de supervivencia de glóbulos rojos.

Pocas veces resulta necesario emplear los largos y caros métodos de marcación de eritrocitos para determinar el tiempo de supervivencia de éstos. El tiempo medio de desaparición del cromo 51 es siempre reducido en las anemias hemolíticas, generalmente hasta la mitad del valor normal.

\* Estudios de transfusión cruzada con células marcadas con cromo 51:

Para determinar si una anemia hemolítica se debe principalmente a un efecto intrínseco de las células del paciente o a un factor extrínseco, los glóbulos rojos del paciente pueden transfundirse a un recipiente compatible, haciendo lo mismo con las células de este último que pasan al enfermo. En la enfermedad intrínseca hay un acortamiento del tiempo de supervivencia de las células del paciente en un recipiente normal y en el paciente, pero las células normales sobreviven normalmente en la circulación de este último. En la extrínseca, las células normales muestran destrucción acelerada en la circulación del paciente, pero las células de este último sobreviven normalmente en un recipiente normal.

**Grupo II: Pruebas que evalúan los cambios en sangre periférica y médula ósea en respuesta a la hemólisis:**

\* Recuento de glóbulos rojos:

El recuento de glóbulos rojos muestra anemia, aunque a veces no la hay. El grado de anemia depende de la velocidad de hemólisis y de la capacidad de la médula ósea para compensar la pérdida de glóbulos rojos. La anemia puede variar de leve a severa y es generalmente normocrómica y normocítica, pero puede ser microcítica o megaloblástica según la deficiencia asociada de hierro, vitamina B12 o folato.

\* Película sanguínea:

Muestran generalmente anisocitosis pronunciada, que en anemias severas se asocia a poiquilocitosis y punteado basófilo. Un aumento de macrocitos policromáticos indica un aumento de reticulocitos, impresión que puede confirmarse por tinción supravital. La reticulocitosis es un indicador útil de hiperplasia medular eritroide.

\* Pruebas de fragilidad osmótica:

Aumenta en las anemias hemolíticas debido a defectos de la membrana, es normal en las enzimopatías y disminuye en las hemoglobinopatías y talasemias.

\* Glóbulos blancos:

Hay generalmente leucocitosis moderada con viraje a la izquierda. Puede verse leucopenia en anemias hemolíticas adquiridas.



\* Plaquetas:

El número de plaquetas aumenta a menudo pero puede ser normal; en la hemoglobinuria nocturna paroxística y en algunas anemias hemolíticas adquiridas el número disminuye.

\* Hallazgos en la médula ósea:

La respuesta fisiológica de la médula ósea a la hemólisis es la hiperplasia eritroide, que puede evaluarse por examen de la médula ósea aspirada y por el número de reticulocitos en la sangre periférica.

La eritropoyesis se ha clasificado de acuerdo con su efectividad en: 1) efectiva o eficiente y 2) ineficaz o ineficiente. La eritropoyesis efectiva puede medirse por: 1) El recuento de reticulocitos, que debe corregirse por el recuento de glóbulos rojos y por los reticulocitos desplazados o virados, y 2) la utilización de hierro por los glóbulos rojos, analizada después de la inyección de compuestos de hierro radiactivo. La eritropoyesis ineficaz puede estimarse midiendo la fracción de bilirrubina tempranamente marcada después de la inyección de N-glicina.

La elevación de bilirrubina no conjugada en pacientes anémicos puede deberse a: 1) hemólisis de glóbulos rojos periféricos, 2) eritropoyesis medular ineficaz, y 3) una combinación de ambas, suponiendo que no hay ningún defecto hepático enzimático congénito.

En todas las anemias hemolíticas hay períodos de exacerbación aguda, llamados crisis. Son de dos tipos:

1) Crisis hemolíticas.- Hay un aumento del proceso hemolítico, asociado a una mayor reducción de la vida de los glóbulos rojos. Se precipita frecuentemente por una infección.

2) Crisis aplásica (o no regenerativa). La médula ósea, temporalmente, deja de producir elementos eritroides maduros. La causa de ésta es desconocida.

**Grupo III: Pruebas que miden productos de destrucción inapropiada de glóbulos rojos intravascular o extravascular.**

\*Hemólisis Intravascular:

1)Haptoglobinas y hemopexinas.- La destrucción de glóbulos rojos dentro de la circulación se acompaña de la liberación de hemoglobina directamente en la circulación. La Hb libre se liga a alfa-globulinas y beta-globulinas especiales llamadas haptoglobinas y hemopexinas para formar grandes complejos proteicos que no filtran a través de los glomérulos renales normales y son catabolizados por el sistema reticuloendotelial.

2) Hemoglobina libre.- Se acumula en el plasma dando hemoglobinemia libre que es una molécula pequeña que escapa al filtrado glomerular y una vez excedida la capacidad de reabsorción tubular de los tubulos contorneados proximales puede demostrarse en la orina. Si la hemólisis es crónica, el hierro de la hemoglobina absorbida y catabolizada se almacena en forma de hemosiderina en las células tubulares, que cuando descaman en la orina pueden demostrarse en el sedimento urinario como células con pigmento granular pardo positivo para azul de Prusia. La hemoglobinemia pronunciada trae cierta ruptura de la hemoglobina en el plasma y formación de hematina, que se liga a la albúmina para formar metahemalbúmina, cuya presencia indica siempre hemólisis anterior.

\* Hemólisis extravascular:

1) Formación de bilirrubina.- Las células reticuloendoteliales fagocitan glóbulos rojos normales senescentes moribundos, glóbulos rojos patológicos de cualquier edad y los ya mencionados complejos de haptoglobina y hemopexina-hemoglobina. La hemoglobina se cataboliza a globina y hem, y este último se convierte en biliverdina. La biliverdina reductasa es responsable de la conversión de biliverdina en bilirrubina. Esta última se libera en el plasma en su forma ligada a albúmina e insoluble en agua, y se conjuga en el hígado con ayuda de glucuronil transferasa. La forma conjugada se excreta en la bilis y se descarga en el intestino delgado. El sistema descrito es capaz de manejar cantidades marcadamente aumentadas de bilirrubina no conjugada resultante de excesiva hemólisis, debido al fenómeno de inducción enzimática. En el intestino, por acción bacteriana, la bilirrubina conjugada hidrosoluble se convierte en urobilinógeno, que se reabsorbe parcialmente en el plasma y se excreta en la orina. La excesiva hemólisis aumenta la producción de bilirrubina no conjugada y finalmente de urobilinógeno, un pigmento incoloro que en reposo se oxida para formar un pigmento marrón, la urobilina.



## PRUEBAS PRESUNTIVAS PARA LA HEMOGLOBINURIA PAROXISTICA NOCTURNA.

Es un tipo diferente de anticuerpo frío en los enfermos afectos de una enfermedad poco frecuente, la *hemoglobinuria paroxística*; en esta enfermedad el autoanticuerpo frío, denominado *anticuerpo de Donath-Landsteiner*, es una hemolisina "completa". El rasgo diferencial y más característico de este anticuerpo es que solamente se une al hematíe en frío, y la hemólisis tiene lugar en presencia del complemento después de calentarlo. El pH óptimo de este anticuerpo está entre 7.0 y 8.0. También produce aglutinación, así como fuerte sensibilización, al suero antiglobulina.

### PRUEBA DE SELECCIÓN DE AGUA AZUCARADA

Esta prueba sólo es válida como procedimiento de selección si la solución de sacarosa se prepara fresca, si se usan anticoagulantes específicos y si el hematocrito no es demasiado bajo. La hemólisis debe leerse espectrofotométricamente porque valores de hemólisis menores de 5% no son diagnósticos.

Los glóbulos rojos HPN se lisan cuando se exponen a soluciones séricas de baja fuerza iónica que contienen complemento debido a su particular sensibilidad a esta proteína. En circunstancias similares no hay lisis de glóbulos rojos normales.

#### Técnica.

1. Agregar 1 volumen de sangre citratada u oxalatada (no usar ninguna otra forma de anticoagulante) a 9 volúmenes de agua azucarada.
2. Mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos.
3. Centrifugar y examinar el sobrenadante a simple vista y con espectrofotómetro por hemólisis.

#### Reactivo

*Agua azucarada* (preparar fresca)

Sacarosa	92.4 g
Agua destilada	1,000 ml
Mezclar bien	

### Interpretación.

Si la hemólisis excede del 5% debe hacerse la prueba específica de hemolisina ácida o la prueba de hemólisis de sacarosa. Una prueba negativa hace poco probable el diagnóstico e HPN.

### PRUEBA DE HEMOLISIS DE SACAROSA.

#### Técnica.

1. Preparar 2 tubos de ensayo pequeños y marcar uno "prueba" y el otro "control" siguiendo las indicaciones del cuadro siguiente.

Reactivos	Tubo 1	Tubo 2
Suero fresco	0.05 ml	0.05 ml
Solución de sacarosa	0.85 ml	---
Solución salina	---	0.85 ml
Suspensión de glóbulos rojos 50% del paciente	0.1 ml	0.1 ml

2. Mezclar e incubar a 37°C durante 30 minutos.

3. Centrifugar los tubos y examinar a simple vista por lisis, si está indicado, examinar espectrofotométricamente como sigue:

a. Blanco cero. Agregar 0.05 ml de suero ABO compatible a 0.85 ml de solución fisiológica.

b. Hemólisis 100%. Agregar 0.1 ml de suspensión de glóbulos rojos a 0.9 ml. de solución de Drabkin.

c. Hemólisis del paciente. Agregar 0.5 ml de sobrenadante del tubo 1 a 5 ml de solución de Drabkin.

4. Leer la absorbancia (A) en espectrofotómetro a 540 nm usando microcubetas.



### **Cálculo.**

$$\frac{\text{A hemólisis del paciente}}{\text{A hemólisis 100\%}} \times 100 = \% \text{ hemólisis de sacarosa.}$$

### **Interpretación.**

Menos de 10% de lisis debe considerarse negativo, pues los glóbulos rojos de algunos pacientes con leucemia o mieloesclerosis pueden dar pequeñas cantidades de lisis. La lisis HPN varía de 10 a 80%. Los glóbulos rojos de anemia diseritropoyética congénita HEM-PAS ( Multinuclearidad eritroblástica hereditaria con positividad de la hemólisis en medio ácido ) dan una prueba negativa de lisis de sacarosa.

# PRUEBA DEL SUERO ÁCIDO PARA LA HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA. PRUEBA DE HAM

## Técnica

1. Desfibrinar 10 ml. de la sangre del enfermo en un tubo que contenga 10 perlas de vidrio ( 3 a 4 mm. de diámetro ) haciéndolo girar suavemente, hasta que no se oiga el tintineo de las cuentas contra el tubo. Decantar la sangre y separar las células y el suero por centrifugación ( 2000 r.p.m. durante 5 minutos ) . Lavar las células tres veces, cada vez con un volumen al menos igual , de solución salina. Preparar una suspensión al 50 % de los hematíes del enfermo, lavados en un solución salina.

2. Tratar 10 ml. de sangre normal compatible de la manera indicada en 1.

3. Poner 7 tubos de ensayo pequeños en baño maría a 37° C y numerarlos.

4. Tal como se indica en la tabla poner 0.5 ml. del suero del enfermo en los tubos 1, 2, 6 y 7 , y 0.5 ml. de suero normal en tubos 3, 4 y 5.

5. Poner el tubo 3 en baño maría o incubador a 56° C durante 30 minutos y luego devolverlo a 37° C al baño maría.

6. Añadir 0.05 ml. de ácido clorhídrico 0.2 N a los tubos 2, 3, 5 y 7.

7. Añadir 0.05 ml. ( una gota grande ) de la suspensión de las células del enfermo a los 5 primeros tubos , y un volumen igual de la suspensión de células normales a los tubos 6 y 7.

8. Incubar todos los tubos a 37° C durante una hora.

9. Centrifugar los tubos a 3500 r.p.m. durante 30 segundos.

10 . Observar la presencia de hemólisis en los líquidos sobrenadantes.



**Tabla 4.- Prueba del suero ácido para la hemoglobinuria paroxística nocturna.**

Tubo	0.05 ml. de células	0.5 ml. de suero	0.05 ml. ácido	Hemólisis
1	E	E	0	0
2	E	E	+	+
3	E	N(calentado)	+	0
4	E	N	0	0
5	E	N	+	+
6	N	E	0	0
7	N	E	+	0

E= enfermo, N= normal.

### Interpretación

1. La reacción hemolítica indicada en la tabla establece el diagnóstico de la hemoglobinuria nocturna paroxística.

2. La hemólisis en los tubos 2 y 7 (ó 1, 2, 6 y 7) y la falta de ésta en el tubo 5 indican la presencia de una hemolisina caliente.

3. Los hematíes notablemente esferocíticos pueden sufrir lisis en el suero acidificado (tubos 2, 3 y 5). Sin embargo, las células de la H.N.P. no sufren lisis en un suero calentado, mientras que el calentamiento del suero no afecta la lisis de los esferocitos.

4. La adición del ácido (tubos 2, 3, 5 y 7) debe fijar el pH sanguíneo entre 6, 2 y 7, 0, y preferentemente alrededor de 6.5. Si es posible debe comprobarse el pH de la mezcla con un potenciómetro.

# FRAGILIDAD OSMÓTICA CUANTITATIVA

## Introducción.

La prueba de fragilidad osmótica es un método simple para valorar la relación que existe entre el área/volumen del glóbulo rojo y detectar por lo tanto la presencia de algún defecto en la membrana del eritrocito. En algunas anemias hemolíticas se presentan alteraciones en la fragilidad de los glóbulos rojos como sería el caso de la esferocitosis hereditaria y las talasemias.

Los eritrocitos están rodeados por una membrana semipermeable al agua y a electrolitos. Si un eritrocito es colocado en una solución hipotónica, el equilibrio osmótico puede ser estabilizado por la acción del agua que penetra al glóbulo rojo y provoca que este se hinche hasta alcanzar una forma esférica. En este punto se produce un desplazamiento de los electrolitos y un cambio en la molécula de la hemoglobina; posteriormente la membrana del eritrocito se rompe liberando toda la hemoglobina contenida en él.

La cantidad de hemoglobina liberada es medida en diferentes concentraciones de NaCl y comparada con la obtenida en una muestra totalmente hemolizada. Los eritrocitos presentan resistencia globular cuando están en contacto con soluciones hipotónicas de concentración decreciente de NaCl. El punto donde se inicia hemólisis se le denomina resistencia mínima y cuando la hemólisis es completa se llama resistencia máxima.

## Técnica.

1. Utilizar sangre heparinizada o sangre recientemente extraída en E.D.T.A. al 10%, y lavada varias veces con solución salina isotónica.
2. Preparar 13 tubos de ensaye de 13x100 mm. de acuerdo a la siguiente tabla 5 :



**Tabla 5. -Fragilidad Osmótica Cuantitativa.**

TUBO	NaCl al 1% ml.	Agua dest. ml.	Conc. de NaCl (%).	Absorbancia.	Hemólisis (%).
1	4.5	0.50	0.90		0
2	4.25	0.75	0.85		
3	3.75	1.25	0.75		
4	3.25	1.75	0.65		
5	3.00	2.00	0.60		
6	2.75	2.25	0.55		
7	2.50	2.50	0.50		
8	2.25	2.75	0.45		
9	2.00	3.00	0.40		
10	1.75	3.25	0.35		
11	1.50	3.50	0.30		
12	1.00	4.00	0.20		
13	0.50	4.50	0.10		100

3. Homogeneizar perfectamente la sangre y adicionar 0.05 ml a cada uno de los tubos mezclando por inversión varias veces.

4. Dejar reposar los tubos durante 60 minutos a temperatura ambiente.

5. Resuspender y centrifugar todos los tubos a 1500 r.p.m. durante 5 minutos.

6. Separar el sobrenadante de cada tubo y utilizando el del tubo no. 1 como blanco, leer la absorbancia de los demás a 540 nm.

### Cálculos.

1. Obtener el % de hemólisis de cada uno de los tubos, relacionando la absorbancia de cada tubo con la obtenida en el tubo no. 13, ésta equivale al 100% de hemólisis.

2. Graficar % de hemólisis contra la concentración final de NaCl.

3. Obtener el valor de la concentración de NaCl a la cual obtiene el 50% de hemólisis.

### Valores de referencia.

0.47-0.57 % de NaCl

50 % de hemólisis.

## **Comentarios.**

1. El material biológico es sangre heparinizada o defibrinada o bien sangre recientemente extraída en EDTA al 10% y lavada varias veces con solución salina isotónica.
2. Es necesario utilizar muestra heparinizada o defibrinada ya que si se emplea sangre oxalatada o citratada, u otros anticoagulantes variarán las condiciones de la determinación.



## PRUEBA DE LA AUTOHEMOLISIS EN GLUCOSA.

### Técnica

1. Se extraen 20 ml. de sangre en condiciones estériles, y la sangre se desfibrina poniéndola en un Erlenmeyer de 125 ml. que contiene 20 cuentas de cristal. Hacer girar el Erlenmeyer , continuar la rotación 1 o 2 minutos más . Decantar la sangre estéril desfibrinada en otro matraz estéril.

2. Preparar 6 viales estériles de 5 ml. , con tapones de rosca. Añadir 0.1 ml. de solución de glucosa a los viales 3 y 4 . Añadir 0.1 ml. de la solución de ATP a los viales 5 y 6 . Se hacen duplicados, para el caso de que uno de los viales no estuviese en condiciones estériles.

3. Añadir a cada vial 2 ml. de la sangre desfibrinada estéril.

4. Obtener el suero de una muestra adicional de sangre desfibrinada y guardarlo en la nevera.

5. Poner los 6 viales en un incubador a 37° C y déjese en reposo durante 24 horas.

6. Al cabo de 24 horas, hacer girar lentamente unas 5 ó 10 veces los viales y luego déjese reposar durante 24 horas más en el incubador.

7. Después de un período total de 48 horas de incubación , observar si hay contaminación , y si no la hubiera, reunir el contenido de los viales duplicados. Separar una muestra para la determinación del volumen de hematocrito y para la medida de la densidad óptica de la sangre total ( véase a continuación ). Centrifugar el resto para obtener el suero.

8. La cuantía de hemólisis espontánea se determina midiendo la cantidad de hemoglobina que tiene el suero. Para hacerlo se diluye el suero al 1:25 o al 1:50, según el grado de hemólisis. Puesto que en estas condiciones la formación de metahemoglobina puede ser importante, debe medirse la hemoglobina por el método de la cianometahemoglobina o por el método del pigmento hemo total. Como patrón se hará una dilución al 1:100 o al 1:200 de la sangre total, y como blanco una dilución adecuada del suero sin incubar. El tanto por ciento de hemólisis, teniendo en cuenta la variación del volumen de los hematíes sedimentados producida por la incubación, se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ hemólisis} = (D_2 - D_3) \times \text{dil. suero} \times \frac{100 \times \text{V.H.}}{D_1 \times \text{dil. de la sangre}}$$

$D_1$  = densidad óptica de la sangre diluida

$D_2$  = densidad óptica del suero diluido después de la incubación.

$D_3$  = densidad óptica del suero diluido sin incubar.

V.H. = Volumen de hematocrito en ml./100 ml.

9. Siempre que sea posible es aconsejable efectuar una serie control de pruebas con sangre normal.

## Interpretación

1. La sangre normal sufre muy poca hemólisis espontánea al incubarla durante 48 horas en condiciones estériles ver tabla. La adición de glucosa o adenosín trifosfato (ATP) reduce el grado de hemólisis. La cifra de autohemólisis hallada en la sangre normal varía según la exactitud de las condiciones en que se efectúa la prueba.

2. La autohemólisis se presenta en muchas clases de anemias hemolíticas, y pueden observarse tres tipos diferentes. En el tipo I de Dacie, la autohemólisis disminuye tanto en presencia de glucosa como de ATP. En el tipo II de Dacie, la autohemólisis está muy aumentada y no se evita con la glucosa, pero sí mediante adición de ATP. El tercer tipo se observa en los enfermos afectados de esferocitosis hereditaria. La autohemólisis está muy aumentada, y se evita tanto mediante la glucosa como el ATP. Estos tres tipos se muestran en la Tabla.

3. La autohemólisis del tipo I se ha observado en el déficit de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, en el déficit de hexocinasa y en la anemia hemolítica adquirida no esferocítica.



4. La autohemólisis del tipo II se ha observado en enfermos afectados de un déficit de piruvato cinasa y en enfermos afectados de anemia hemolítica esferocítica adquirida.

5. El tercer tipo se ha observado en enfermos afectados de esferocitosis hereditaria y en enfermos que presentan déficit de triosafosfato isomerasa.

6. En algunos enfermos se han hallado excepciones de estas normas generales

**Tabla 6.- Prueba de autohemólisis en personas sanas ( 48 horas ) y los tres tipos de anemia hemolítica que se han observado.**

estado	Aditivo		
	Ninguno	Glucosa	ATP
Normal	2 (0.2 - 4 )	0.3 (0.1 - 0.6 )	0.2 (0.1 - 0.8 )
Tipo I	3 (1 - 6 )	1.3 (0.5 - 4 )	1 (0.4 - 2 )
Tipo II	13 (8 - 44 )	15 (4 - 48 )	1 (0.2 - 2 )
Tipo III Esferocitosis Hereditaria	16 (6 - 30 )	3 (0.2 - 1.4 )	3 (1 - 6 )

## Reactivos

### *Solución de glucosa (al 10 %)*

Glucosa, 10 g.

Solución salina al 0.85 % hasta 100 ml.

Esterilizar con filtro de Seitz en el autoclave.

(Nota: De preferencia utilizar solución glucosada al 10°. Inyectable).

### *Solución de adenosín trifosfato (ATP)*

Adenosín trifosfato, 2.5 g.

Solución salina al 0.85 % hasta 10 ml.

Esterilizar con filtro de Seitz.



## PRUEBA DE CELULAS FALCIFORMES.

### Técnica

1. Poner una gota de la sangre que debe examinarse sobre un portaobjetos.
2. Poner una o dos gotas de la solución de metabisulfito sódico sobre el portaobjetos y mezclar bien con la gota de sangre .
3. Examinar la preparación en el microscopio con el objetivo seco de mayor aumento.
4. Si la sangre procede de un enfermo afecto de drepanocitosis, inmediatamente aparecerán dichas células, que serán muy abundantes al cabo de 15 minutos. Si no se observan al cabo de 15 minutos, es que no hay drepanocitosis.

### Comentario

Esta prueba puede efectuarse sin añadir el agente reductor si se sella la gota de sangre debajo del cubreobjetos con parafina o con vaselina. Pero esta simplificación tiene un inconveniente: si se trata de rasgo de las células falciformes y no de la anemia drepanocítica, el fenómeno puede no formarse hasta pasadas de 6 a 24 horas.

### Reactivo

*Solución de metasulfito sódico (  $S_2O_5Na_2$  )*

Metasulfito sódico, 2 g.

Agua destilada hasta 100 ml.

Esta solución debe ser reciente, existen comprimidos con un contenido de 0.2 g. de metabisulfito sódico. Se disuelve un comprimido en unos 10 ml. de agua en el momento que se necesite.

El metabisulfito sódico puede sustituirse por ditionito sódico (hidrosulfito sódico,  $S_2O_4Na_2$ ). Sin embargo, el ditionato sódico ( $S_2O_6Na_2$ ) es inactivo como agente productor del fenómeno.

# COAGULACIÓN

## Fisiología de la hemostasia

En la interrupción de la pérdida de sangre de los vasos dañados (hemostasis) intervienen: factores vasculares, la formación de un tapón de plaquetas y la coagulación sanguínea con la formación de un coágulo de fibrina.

En la fase vascular de la coagulación para reducir la pérdida de sangre actúan diversos factores. El vaso lesionado se contrae, y si hay un vaso pequeño cortado, éste presenta intensa retracción. La extensión de la sangría también está limitada por la presión que la sangre extravasada ejerce sobre el exterior del vaso. Al mismo tiempo, las plaquetas se concentran rápidamente en el lugar de la herida y forman un tapón mecánico que, por oclusión, elimina el fallo (fase plaquetaria). El adenosindifosfato (ADP), y al menos otro factor más, intervienen en la formación de este tapón. Entonces se pone en marcha el mecanismo de la coagulación sanguínea y se forma un coágulo de fibrina.

Al menos trece factores, además de las plaquetas, intervienen en la coagulación sanguínea.

En la primera etapa de la coagulación (etapa I) se forma la tromboplastina sanguínea. Actualmente se sabe que existen al menos ocho factores que intervienen en la generación de la tromboplastina sanguínea. Son (1) las plaquetas, (2) el calcio, (3) el factor V, (4) el factor VIII, (5) el factor IX, (6) el factor X, (7) el factor XI y (8) el factor XII.

En la segunda etapa de la coagulación (etapa II), la protrombina se convierte en la trombina. La generación de trombina pueden efectuarla la tromboplastina sanguínea (etapa Y) o la tromboplastina hística.

En la etapa III, última etapa de la coagulación, la trombina transforma el fibrinógeno en fibrina y se forma un coágulo. El factor XIII, factor estabilizador de la fibrina, participa en esta etapa formando por acción enzimática fuertes enlaces entre monómeros de fibrina.

Actualmente se considera que el proceso de formación del coágulo consiste en una sucesión de reacciones, en la cual todas las proteínas coagulantes (proenzimas), con excepción del fibrinógeno, se transforman en una forma activa provista de actividad enzimática. La activación de cada factor coadyuvante tiene lugar en una sucesión de fases, en las cuales la enzima recién formada reacciona con su sustrato específico, el que a su vez se transforma en una nueva enzima activa.



En el tubo de ensayo esta serie de reacciones se inicia por contacto con una superficie tal como el cristal. Esta reacción implica la transformación del factor XII en su forma activada o enzimática y la cascada procede a la formación de trombina, la última enzima de la serie. La trombina transforma entonces el fibrinógeno en monómeros de fibrina por proteólisis parcial, que libera dos péptidos específicos del extremo N-terminal del fibrinógeno. En presencia del calcio y factor XIII activado se forma un denso polímero insoluble de fibrina que se contrae y ocluye el orificio de la pared vascular.

### **Enfoque inicial por el laboratorio ante un posible problema hemorrágico**

Hay cuatro pruebas de laboratorio, sencillas y económicas, admirablemente adecuadas como pruebas de selección primarias. Estas cuatro pruebas son : (1) el tiempo de sangrado, (2) el recuento de plaquetas, (3) el tiempo de protrombina, (4) el tiempo de tromboplastina parcial.

El tiempo de sangrado tiene valor para poner de manifiesto anomalías cualitativas de las plaquetas. El recuento de plaquetas es el mejor método para su determinación cuantitativa. Efectuando simultáneamente el tiempo de protrombina y el tiempo parcial de tromboplastina pueden descubrirse las deficiencias de cualquier factor coagulante, con la excepción del factor XIII.

Estas cuatro pruebas definen la categoría principal dentro de la cual probablemente, deberá clasificarse el trastorno; descubren los trastornos hemorrágicos más frecuentes, el tiempo parcial de tromboplastina descubre incluso pequeñas deficiencias. Estas cuatro pruebas deberían ser las primeras que se le practicasen a un paciente con un trastorno hemorrágico.

Aunque el tiempo de coagulación y el consumo de la protrombina sean pruebas de sencilla realización, tienen escaso valor como pruebas de selección porque sólo están alteradas en pacientes con trastornos graves.

## **Trastornos vasculares**

Hay muchos trastornos vasculares que pueden estar relacionados con las hemorragias. en general, se sabe muy poco de la patogénesis de estos trastornos y se les clasifica de manera muy poco satisfactoria.

El diagnóstico de los trastornos vasculares se hace mediante la observación clínica y el estudio histológico, pero no con pruebas específicas de laboratorio, la prueba del torniquete es positiva algunas veces, pero las demás pruebas hemostáticas y de coagulación, incluyendo las cuatro que se recomiendan como pruebas de selección, generalmente dan resultados normales.

## **Trastornos plaquetarios**

Hay numerosas causas que dan lugar a trombocitopenia, la mejor manera de descubrir una trombocitopenia, es realizar un buen recuento de plaquetas. Sin embargo, aunque durante los últimos tiempos el método haya adquirido una gran precisión, a veces pueden obtenerse resultados incorrectos. Por esta razón, el recuento debe comprobarse siempre examinando un frotis de sangre. La prueba del torniquete, el tiempo de sangría y la retracción del coágulo pueden usarse como pruebas confirmatorias adicionales, pero son pruebas menos seguras, menos específicas y menos sensibles que un recuento de plaquetas bien hecho.

Hay casos en que las plaquetas, sin estar cuantitativamente alteradas, pueden presentar deficiencias cualitativas y no desempeñar adecuadamente su función. Los trastornos de este tipo van acompañados generalmente de una prolongación del tiempo de sangría. La palabra trombocitopatía es un término genérico para designar un gran número de trastornos adquiridos o hereditarios todos mal conocidos. Las plaquetas de los pacientes afectados de una trombocitopatía tienen una función tromboplástica deficiente y la prueba de consumo de la protrombina resulta alterada. Un recuento de plaquetas aumentado es el único resultado anormal consistente que se encuentra en los pacientes afectados de trombocitemia hemorrágica.



## Trastornos de la coagulación

Los trastornos de la coagulación pueden ser hereditarios o adquiridos. Los trastornos hereditarios se manifiestan generalmente como fallo de un único factor, mientras que en los trastornos de coagulación adquiridos el defecto hemostático generalmente es complejo; comprende faltas de varios factores y, con cierta frecuencia, también trastornos vasculares y plaquetarios.

Los trastornos de la coagulación adquiridos más frecuentes están relacionados con los factores que dependen de la vitamina K; es decir los factores II (protrombina), VII, IX y X. Se observan deficiencias de estos cuatro factores en la enfermedad hemorrágica del recién nacido, en pacientes afectados de obstrucción biliar, del síndrome de mala absorción, de enfermedades hepáticas y en los pacientes después de ingestión de drogas cumarínicas. La destrucción anormal de los factores coagulantes se encuentra en pacientes que presentan un síndrome de desfibrinización. El trastorno más peligroso se caracteriza por un fallo hemostático complejo que puede presentar fibrinólisis anormal, presencia de varios inhibidores, trombocitopenia, hipofibrinogenemia y bajos niveles de los factores V y VII, todo ello en múltiples combinaciones. En ciertos casos los trastornos de la coagulación se originan más por exceso de inhibidores que por deficiencia de los diversos factores. Se observan trastornos de la coagulación en otras muchas enfermedades; entre las más frecuentes citaremos: uremia, disproteinemias de diversos tipos, leucemia aguda y carcinomatosis.

# PRUEBA DEL TORNIQUETE

## Técnica

1. Colocar en el brazo, en la forma acostumbrada, el manómetro para la determinación de la presión arterial.
2. Inflar el manómetro hasta una presión de 80 mm de mercurio y mantenerla durante 5 minutos.
3. Retirar el manómetro y el cabo de un minuto observar la formación de petequias en el antebrazo en un área de 5 cm.
4. Los resultados de la prueba se gradúan de manera aproximada desde normal a 4+, tal como se indica a continuación:

< 10 petequias	Normal
10-20 petequias	Repetir
> 20 petequias	Positivo

## Interpretación

1. Esta prueba es una medida imperfecta de la fragilidad capilar. El número y tamaño de las petequias es más o menos proporcional a la propensión a sangrar. Existe un grado de correlación más regular entre el número y tamaño de las petequias y el grado de trombocitopenia. Sin embargo, la prueba depende también de la fragilidad capilar y puede ser muy positiva con un recuento de plaquetas normal. También influyen en el resultado de la prueba el tamaño de los vasos lesionados y el espesor, textura y temperatura de la piel.
2. La prueba no debe repetirse en el mismo brazo hasta pasada una semana.
3. Para hacer más cuantitativa la prueba del torniquete, puede trazarse con tinta un círculo de 5 cm. de diámetro en el antebrazo, de manera que el borde superior quede a 4 cm. de la parte interior del codo. Se anotan las petequias que hay en el círculo y se realiza la prueba como se ha indicado anteriormente. Se anota el número de petequias nuevas que aparecen en el área. Normalmente no debe haber más de 10, o como máximo 20. Esta prueba tiene, no obstante, un inconveniente: pueden aparecer muy pocas petequias en el interior del círculo aunque la prueba sea muy positiva.
4. En casos normales, las petequias aparecen con frecuencia justo debajo del borde inferior del manómetro. Las que aparecen donde estaba éste no se tienen en cuenta.



# TIEMPO DE SANGRADO.

## Finalidad de la prueba

El tiempo de sangrado se utiliza como comprobante de las alteraciones de la función plaquetaria, tanto congénitas como adquiridas y para la enfermedad de Von Willebrand.

## Fundamento de la prueba

El tiempo de sangrado es el necesario para que deje de sangrar una herida estandarizada en la piel. Es una medida de la función plaquetaria e independiente del mecanismo de la coagulación, aunque en caso de alteración grave de la coagulación el tiempo de sangría puede estar alterado.

## Técnica.

1. Verificar que se encuentre limpia el área seleccionada para la prueba.
2. Se hace una punción en el lóbulo de la oreja de una profundidad de unos 4 mm x 2 mm con una lanceta adecuada.
3. El lóbulo de la oreja debe estar caliente pero no se debe limpiar con alcohol ni amasado vigorosamente.
4. Tan pronto como se realiza la punción se pone en marcha un cronómetro.
5. La sangre debe salir libremente y el lóbulo no se debe comprimir.
6. Cada 15 segundos las gotas de sangre que hayan surgido de la oreja se absorben con un trozo de papel de filtro con cuidado de no tocar la superficie de la oreja.

## Interpretación

1. Desde hace tiempo se sabe que la aspirina puede causar un tiempo de sangría alargado, lo que podría ser la explicación de los altos límites normales citados en la literatura. Por ello se debe interrogar al paciente sobre si ha tomado aspirina o cualquier preparado que la contenga en la semana precedente. Si llega a ocurrir así se debe posponer el test para la semana siguiente.

2. Los valores normales con el método Duke oscilan entre 1 y 3 ½ minutos siendo anormales los tiempos de 4 o más minutos.

3. El límite superior de la normalidad con el método de Ivy es de 5 minutos, pero algunos investigadores aceptan como normal un tiempo hasta de 7 minutos.



# TIEMPO DE COAGULACIÓN

## Finalidad de la prueba

El tiempo de coagulación sanguínea es una prueba muy poco sensible y nunca se debe de utilizar como prueba selectiva. Se utiliza muchas veces para controlar la terapéutica con heparina, pero los resultados obtenidos a veces no son fiables por lo que se deben preferir otras pruebas como el tiempo de la tromboplastina parcial activada. A pesar de ello el tiempo de coagulación sanguínea se lleva a cabo en los laboratorios a causa de que se pueden obtener muchos datos de la inspección periódica del coágulo.

## Fundamento de la prueba

El tiempo necesario para que la sangre se coagule en un tubo de cristal es la medida de la actividad total del sistema intrínseco de la coagulación. La inspección periódica del coágulo permite la evaluación de sus propiedades físicas (tamaño, aspecto y consistencia mecánica), y la velocidad e importancia de su retracción.

## Técnica

1. Se extraen 5 ml. de sangre venosa.
2. Se toman dos tubos de ensayo pyrex, limpios y secos, y se ponen 2 ml. de sangre en cada uno de ellos. Se desecha el ml. de sangre sobrenadante.
3. Se colocan los tubos en baño maría a 37°C.
4. Al cabo de 5 minutos se inclina lentamente (unos 45°) el primer tubo. La operación se repite cada minuto hasta que, al invertir el tubo, la sangre ya no se deslice.
5. Se inclina suavemente el segundo tubo a intervalos de un minuto hasta que, al inclinarlo, no se observe movimiento.
6. Se anota como tiempo de coagulación el intervalo de tiempo transcurrido desde que la sangre entra en contacto con el cristal hasta que, al invertir completamente el segundo tubo, la sangre ya no fluye.

## Interpretación

1. El valor normal por este método es entre 6 y 8 minutos.
2. Es una prueba poco sensible y fácilmente puede resultar errónea sino se efectúa escrupulosamente; debido a ello es poco utilizada en la práctica.
3. Un acortamiento del tiempo de coagulación rara vez tiene traducción clínica, pero cuando es excesiva, debe sospecharse de una contaminación por tromboplastina hística debido, principalmente, a una extracción poco cuidadosa.
4. El alargamiento del tiempo de coagulación puede ser un signo de trastorno a nivel de la vía intrínseca o de la vía común de la coagulación. Así, se observa alargamiento del tiempo de coagulación en tubo, en la hemofilia y en la afibrinogenemia.



## RETRACCIÓN DEL COÁGULO

### Técnica.

1. Uno de los tubos de pyrex usados para la determinación del tiempo de coagulación se deja en baño maría a 37° C hasta que se cumpla una hora desde que se extrajo la sangre.

2. Si para entonces el coágulo no se ha retraído de la pared del tubo, soltarlo cuidadosamente con una varilla de madera y observar la magnitud de la retracción, es decir, la contracción del coágulo con salida del suero. Deben observarse el grado (ligero, moderado, intenso) y la tasa de retracción del coágulo.

### Comentarios.

1. Debe evitarse que el tubo sufra sacudidas o agitaciones suaves, ya que la sangre que tarda en hacer la retracción, o no la hace, puede hacerla si se la somete a agitación.

2. Normalmente, la retracción del coágulo de las paredes del tubo empieza a los 30 minutos, se aprecia al cabo de una hora y a las 4 horas es casi completa. En condiciones de anormalidad la retracción puede no haber empezado a las 4 horas, o puede haber diversos grados de retracción.

3. La retractilidad del coágulo depende principalmente del número de plaquetas. Si existen menos de 10,000 plaquetas por  $\text{mm}^3$ , generalmente la retractilidad es defectuosa. Recíprocamente, cuando las plaquetas están en cifra superior a 100,000 por  $\text{mm}^3$  habrá generalmente buena retracción. Más aún, existe un paralelismo aproximado, pero perceptible, entre el número de plaquetas y la calidad del coágulo. Así, un método sirve para la comprobación del otro.

4. Hay que hacer observar también que la sedimentación de hematíes influye tanto en la tasa como en el grado de retracción del coágulo. Cuando hay una gran masa de hematíes, el volumen de plasma, y en consecuencia la cantidad total de fibrinógeno, es relativamente pequeño, y la masa de hematíes limita el grado de retracción por el volumen que ocupan dentro del coágulo. En casos de anemia prevalece lo contrario. Se han ideado métodos para la determinación semicuantitativa de la retracción del coágulo. En estos métodos, mediante la aplicación de una fórmula se comparan los resultados con un volumen estándar de hematíes. Estas filigranas son innecesarias en la hematología clínica corriente.

## DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE FACTORES

### Principio.

El porcentaje de actividad de los factores de la coagulación en plasmas puede ser determinado por el grado de prolongación que se obtiene cuando al plasma problema diluido se le adiciona un sustrato deficiente del factor que se desea cuantificar. El grado de prolongación se determina por el tiempo en segundos de protrombina., para los factores de la vía extrínseca de la coagulación; y por el tiempo en segundos al realizar una tromboplastina parcial activada, para los factores de la primera fase de la coagulación. El resultado se interpola en una curva de calibración, hecha a partir de un plasma normal.

### Técnica.

1. Para la curva patrón se hacen diluciones 1:5, 1:20 y 1:80 de un pool con amortiguador de Owren.
2. En un tubo de ensayo depositar 0.1 ml de la primera dilución y agregar 0.1 ml del plasma deficiente del factor que se desea cuantificar.
3. Continuar con la técnica necesaria, para TP o TTPa.
4. Seguir con el mismo mecanismo para las demás diluciones tanto del pool como para la de los plasmas problemas, previamente se diluyen 1:5 con el buffer de Owren.
5. Graficar la curva patrón en papel logarítmico colocando los segundos obtenidos en las ordenadas y los porcentajes de la actividad en las abscisas.
6. Interpolar los valores de los plasmas problemas en la curva informando el resultado en porcentaje de actividad.

### Interpretación.

Cuando existe antecedente de la presencia de inhibidor contra alguno de los factores de la coagulación se pueden evidenciar de una forma gruesa diluyendo el plasma problema



1:5, 1:20 y 1:80 con el buffer de Owren, en cada una de ellas se determina el porcentaje de actividad interpolando en la curva de calibración y tomando en cuenta la dilución empleada.

Cuando existe la presencia de un inhibidor el porcentaje de actividad obtenido para las tres diluciones se incrementara a medida que aumenten las diluciones. Si no hay inhibidor el porcentaje de actividad obtenido será semejante en cada una de las diluciones.

### **Valores de referencia.**

50 -150 % de actividad.

# PRUEBAS PRESUNTIVAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS DEFICIENCIAS DE PROTROMBINA Y DE LOS FACTORES V, VII Y X.

## Técnica.

1. Se colocan ocho tubos de pyrex, limpios de 12X75 mm. en baño maría a 37° C.
2. Se añaden 0.1 ml. de una mezcla a partes iguales de plasma normal adsorbido y suero normal a los tubos 1, 2 y 3.
3. Se adicionan 0.1 ml. de plasma normal "envejecido" a los tubos 4, 5 y 6.
4. Se añaden 0.1 ml. de plasma del paciente a los tubos 7 y 8.
5. Se colocan 0.1 ml. de plasma normal (dilución al 1:10 en solución salina al 0.85%) a los tubos 1 y 4.
6. Se añaden 0.1 ml. de plasma del paciente (dilución al 1:10 en solución salina al 0.85%) a los tubos 2 y 5.
7. Se adicionan 0.1 ml. de solución salina al 0.85% a los tubos 3, 6 y 8.
8. Se añaden 0.1 ml. de suero normal (diluido al 1:10 en solución salina al 0.85%) al tubo 7.
9. Se determina el "tiempo de protrombina" de las mezclas de cada tubo, añadiendo rápidamente a cada uno de ellos 0.2 ml. de la mezcla tromboplastina-calcio, y se pone tal como se ha descrito en la etapa 5 de la técnica de tiempo de protrombina.

## Interpretación.

1. La mezcla de plasma normal adsorbido y suero normal (tubos 1, 2 y 3) contiene los factores V, VII y X y es deficiente en protrombina. Los tubos 1 y 3 sirven de control. Si el tiempo de coagulación no disminuye al añadir el plasma del paciente (tubo 2), este plasma es deficiente en protrombina. Si el tiempo de coagulación en el tubo 2 es tan corto como en el tubo 1, el plasma del paciente contiene tanta protrombina como el plasma normal.



2. El plasma normal " envejecido" de los tubos 4, 5 y 6 contiene protrombina, factor VII y factor X, pero es deficiente en factor V (Ver tabla 7 ). Los tubos 4 y 6 sirven de control. Si el plasma del paciente (tubo 5) no consigue disminuir el tiempo de coagulación, este plasma del paciente es deficiente en factor V, Si el tiempo de coagulación es tan corto en el tubo 5 como en el tubo 4, el plasma problema contiene tanto factor V como el plasma normal.

3. El suero normal (tubo 7) contiene los factores VII y X, pero es deficiente en protrombina y en factor V (ver tabla 7 ). Si el tiempo de coagulación en el tubo 7, comparándolo con el tubo 8, se acorta, indica que el plasma del paciente es deficiente en factor VII o en factor X, o en ambos. Cualquiera que sea la modificación del tiempo de coagulación en el tubo 7, si esta modificación tiene lugar, indica una deficiencia de factor VII o de factor X, pero por este método no puede diferenciarse de cuál de los dos se trata. Sin embargo, la deficiencia del factor VII puede distinguirse fácilmente de la del factor X por el tiempo de coagulación de la sangre total, por la prueba de consumo de protrombina y por el tiempo de tromboplastina parcial. El tiempo de coagulación de la sangre total y el tiempo de tromboplastina parcial generalmente son normales en la deficiencia del factor VII y prolongados en la deficiencia de factor X. La prueba de consumo de protrombina generalmente es normal en la deficiencia de factor VII e insignificante en la deficiencia de factor X.

## Reactivos.

### *Plasma problema:*

El plasma problema y el plasma normal se extraen y preparan tal como se ha indicado para el tiempo de protrombina. Puesto que el factor V es lábil, el plasma debe guardarse inmediatamente en la nevera y realizar la prueba no más tarde de una hora después de la extracción. Se usa plasma sin diluir y plasma diluido al 1:10 (0.1 ml. de plasma y 0.9 ml. de solución salina).

### *Plasma normal adsorbido:*

Se extrae sangre de una persona sana tal como se ha indicado para el tiempo de protrombina. Se añaden 0.4 ml. de gel de hidróxido de aluminio a 2 ml. de plasma normal. Durante los 5 minutos siguientes el tubo se invierte varias veces. Después se centrifuga durante 20 minutos, se decanta el plasma adsorbido y se guarda inmediatamente en la nevera. El tiempo de protrombina de este plasma debe ser superior a 60 segundos. El plasma adsorbido, a causa de la labilidad del factor V, debe usarse dentro de la hora que sigue a la extracción. Sin embargo, puede guardarse congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  en porciones pequeñas durante varias semanas.

Para las necesidades de esta prueba el plasma adsorbido se mezcla a partes iguales con suero normal.

*Plasma normal "envejecido":*

Se extrae sangre de una persona sana tal como se ha indicado para el tiempo de protrombina, pero en vez de citrato sódico, como coagulante se usa oxalato sódico 0.1 M. Después el plasma se incuba a 37°C de 24 a 36 horas. El plasma "envejecido" puede guardarse entonces en pequeñas porciones a -20°C hasta el momento en que vaya a ser usado. El tiempo de protrombina de este plasma debe ser superior a 60 segundos.

*Suero normal:*

La sangre normal se deja coagular en un tubo de cristal a 37°C. Al cabo de 4 horas se separa el coágulo y se centrifuga el suero para separar los hematíes. El suero se incuba a temperatura ambiente durante 24 horas.

Se usa suero sin diluir y suero diluido al 1:10 con solución salina.

*Oxalato sódico 0.1 M.:*

Oxalato sódico anhydro                      1.34 gr.  
Agua destilada hasta                              100 ml.

**Tabla 7.- Pruebas presutivas para la determinación de las deficiencias de Protrombina y de los factores V, VII, y X.**

FACTOR	Plasma normal reciente	Plasma normal "envejecido"	Suero normal	Plasma normal adsorvido	Suero normal adsorvido
Fibrinogeno	+	+	0	+	0
Protrombina	+	+	0	0	0
V	+	0	0	+	0
VII	+	+	+	0	0
VIII(AHG)	+	0	0	+	0
IX(PTC)	+	+	+	0	0
X(Stuart)	+	+	+	0	0
XI (PTA)	+	+	+	+	+
XII (HF)	+	+	+	+	+

+, presente ; 0, deficiente.



## CONSUMO DE PROTROMBINA

### Técnica.

1. Se incuban 2 ml. de sangre a 37° C durante 2 horas. Si el coagulo retrae bien, pueden tomarse directamente del tubo 0.1 ml. de suero. Si es necesario se centrifuga el tubo durante 3 minutos para obtener más suero. La prueba debe efectuarse dentro de los 5 minutos que siguen a la separación del suero.

2. Se coloca un tubo de ensayo de pyrex, pequeño de 12X 75 mm, en baño maría a 37°C.

3. Se añaden 0.2 ml. de una mezcla de tromboplastina y cloruro cálcico y se deja incubar durante 30 segundos.

4. Se adicionan 0.1 ml de suero problema.

5. Se añaden rápidamente 0.1 ml. de plasma normal adsorbido y se pone en marcha el cronómetro.

6. Se determina el tiempo de protrombina tal como se ha descrito anteriormente.

### Comentarios.

1. Hay muchas variantes en la prueba de consumo de protrombina. Hemos elegido este método por su sencillez. Es tan bueno como cualquier otro.

2. Todas las precauciones que se toman en la extracción de sangre para el tiempo de coagulación rigen también para la prueba de consumo de protrombina, y así mismo, las que se toman en la realización del tiempo de protrombina rigen también para este método. Deben usarse siempre utensilios de cristal nuevos.

3. Deben seguirse rigurosamente los intervalos de tiempo dados si quieren obtenerse resultados reproducibles.

4. El plasma adsorbido no debe contener protrombina. El tiempo de protrombina del plasma adsorbido debe ser superior a 60 segundos.

5. Es siempre aconsejable efectuar la prueba por duplicado o por triplicado.

6. Para la detección de una deficiencia en la formación de protrombinasa, esta prueba es mucho más sensible que el tiempo de coagulación de sangre total en cristal o silicona

## **Interpretación.**

1. A medida que se genera la Protrombinasa, convierte la protrombina en trombina. Así, pues, se utiliza la protrombina. Si se retrasa la generación de tromboplastina sanguínea por deficiencia de algún factor necesario en la primera etapa de la coagulación (plaquetas, factores V, VIII, IX, X, XI y XII), queda un gran residuo de protrombina en el suero. Esta prueba mide indirectamente la generación de tromboplastina sanguínea.

2. Por desgracia, este método no es específico para medir la actividad de la protrombina residual. El tiempo de protrombina del suero no depende únicamente de la protrombina sin transformar; depende también de: a) de la trombina formada durante y después de la coagulación y que no ha sido adsorbida por la fibrina ni neutralizada por las antitrombinas naturales; b) del efecto "acelerador" del suero; c) de la concentración de factor V no activado durante la coagulación; d) de la obtención del fibrinógeno necesario y, e) de la actividad de los factores VII y X en el suero.

Si se deja incubar la sangre durante 2 horas, cuando ya se ha coagulado, las antitrombinas neutralizan casi toda la trombina. Aunque a esta prueba se le pueden hacer muchas objeciones, válidas en teoría, es muy útil para el diagnóstico.

3. En los enfermos afectos de trombocitopenia, trombocitopatía o alguna deficiencia de los factores V, VIII, IX, X, XI o XII, se encuentra una actividad de protrombina anormalmente alta, que se debe a la generación defectuosa de la tromboplastina sanguínea.

4. Con este método, un tiempo de protrombina sérica de 28 segundos o más es normal si se emplea una solución de tromboplastina que de un tiempo de protrombina plasmática normal entre 11 y 15 segundos. Los valores inferiores a 25 segundos pueden considerarse alterados.



## TIEMPO DE TROMBINA

### Principio.

Este método mide el tiempo durante el cual el fibrinógeno presente en el plasma se transforma a fibrina por la acción de una cantidad estandarizada de trombina comercial. A dicha concentración de trombina la prueba es sensible a la presencia de inidores tanto naturales, adquiridos como exógenos de la tercera fase de la coagulación; así como también a algunas anormalidades presentes en la molécula de fibrinógeno.

### Técnica.

1. Preparar solución stock de trombina ajustando el tiempo de coagulación con un pool entre 26 a 28 segundos.
2. Colocar 0.2 ml de plasma problema ( o normal ) e incubar durante 60 segundos a 37°C.
3. Adicionar 0.2 ml de la solución de trombina estandarizada y cronometrar.

Valor normal 3 segundos sobre el testigo.

### Reactivos y Material.

1. Tubos de ensaye de 12 x 15 mm.
2. Pipetas serologicas de 0.1 y 0.2 ml.
3. Baño María a 37°C.
4. Cronómetro.
5. Baño de hielo/ agua.
6. Plasma testigo normal (Mezcla de plasmas normales citratados pobres en plaquetas "pool").
7. Trombina humana 50 U/ml.
8. Solución salina 0.85 %.
9. Plasma problema citratado pobre en plaquetas.

# INHIBIDORES DE LA COAGULACION. DOSIFICACION DE ANTITROMBINA III.

## Principio.

Al plasma problema se la añade heparina en exceso, con lo que se forma el complejo ATIII-Heparina; a continuación se le añade una cantidad conocida de trombina, formándose el complejo ATIII-Heparina-Trombina y quedando cierta cantidad de trombina residual libre, que actuará sobre el sustrato cromogénico a nivel del enlace arginina-p-nitroanilina, liberando esta última.

Heparina en exceso + plasma = ATIII-Heparina

ATIII-Heparina + Trombina en exceso = (ATIII-Heparina-Trombina) + Trombina residual

Sustrato cromogénico      Trombina residual = Gly-Pro-Arg-OH + pNa (Gly-Pro-Arg-pNa) + H<sub>2</sub>O

La cantidad de p-nitroanilina (p-Na) liberada depende de la trombina residual, y esta (en proporción inversa), de la cantidad de ATIII que haya en el plasma. Debe tenerse en cuenta que la pNa es un compuesto tóxico por lo que debe evitarse su inhalación, ingestión o contacto con la piel.

## Técnica

Para cada serie se prepara un blanco de trombina (BT).

1. En dos tubos de plástico se pipetea:

	BT	Problema
Solución de NaCl	0.1 ml	--
Plasma diluido	--	0.1 ml
Trombina diluida	2 ml	2 ml

2. Se mezclan y se incuban 5 minutos a la temperatura elegida ( 25 ó 37° C ).

3. Añadir a ambos tubos 0.2ml de sustrato cromogénico, al mismo tiempo que se dispara el cronómetro.



4. A los dos minutos exactamente de tener la reacción mediante 1 ml. de ácido acético y leer la extinción (E) del BT y problema a 405 nm. Esta lectura debe hacerse dentro de la hora de haberse terminado la reacción.

### Cálculo.

$$E(\text{BT}) - E(\text{Problema}) = E(\text{ATIII})$$

$$\text{UI/ml de ATIII a } 25^{\circ} \text{ C} = 87 E(\text{ATIII})$$

$$\text{UI/ml de ATIII a } 37^{\circ} \text{ C} = 171.5 E(\text{ATIII})$$

UI = Unidades de inhibición.

### Reactivos y Material.

1. Plasma citratado.
2. Trombina (tabletas de 0.27 U cada una ).
3. Solución tampón (Tris- HC), Heparina, Aprotinina, NaCl.
4. Sustrato cromogénico (Gly-Pro-Arg-pNa-AcOH ).
5. Acido acético al 20 %.
6. Solución de NaCl 0.15 mol / litro.

Se diluyen una o dos tabletas de trombina en un frasco de la solución tampón según se desee trabajar a  $37^{\circ} \text{ C}$  o a  $25^{\circ} \text{ C}$ - $30^{\circ} \text{ C}$  , obteniéndose respectivamente las concentraciones finales de 0.012 U/ ml y de 0.024 U/ml.

Se deja reposar la mezcla durante 30 minutos de 15 a  $20^{\circ} \text{ C}$  y se reconstituye el sustrato cromogénico con 4 ml. de agua destilada.

Para la determinación a  $25^{\circ} \text{ C}$  debe diluirse el plasma a 1/51, añadiendo a un volumen del mismo 50 volúmenes de la solución de NaCl. En general 20 L de plasma a 1 ml. de NaCl (1/51) si se trabaja a  $37^{\circ} \text{ C}$ , la dilución es de 1/ 101.

## **Interpretación.**

Si se trabaja a 37° C , es importante que todas las soluciones que se emplean en la reacción se hallen precisamente a dicha temperatura. Debido a que la trombina es adsorbida por el vidrio debe utilizarse siempre material de plástico. Los factores de error en esta determinación son fundamentalmente son el plasma lipémico, la hemólisis y la hiperbilirrubinemia superior a 20 mg/100 ml.

La determinación de ATIII es prácticamente obligada en pacientes que hayan sufrido enfermedad tromboembólica y en mujeres sometidas a tratamiento con anticonceptivos hormonales. Asimismo es aconsejable en los pacientes con heparinoterapia.



## FIBRINOGENO.

**Método enzimático de Claus:** La trombina transforma al fibrinógeno soluble en un polímero insoluble (fibrina), la velocidad de la reacción esta determinada por la concentración del fibrinógeno. Este método mide el fibrinógeno funcional.

### Técnica.

#### - PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

Con el amortiguador de veronal se efectúan una serie de diluciones de un estándar de fibrinógeno (1:5, 1:10, 1:40).

Efectuar en el fibrometro determinación por duplicado a cada dilución.

- a) Incubar 0.2 ml. de la dilución de fibrinógeno durante 2 minutos a 37°C.
- b) Adicionar 0.1 ml. del reactivo de trombina (a temperatura ambiente) y accionar el cronómetro del fibrómetro, el cual se para automáticamente al formarse el coágulo.
- c) Anotar el tiempo de coagulación para cada uno de los puntos y trazar una gráfica de concentración en mg/dl contra tiempo en segundos.

#### - DETERMINACIÓN DEL FIBRINOGENO PROBLEMA.

- a) Hacer una dilución de la muestra 1:10 en el amortiguador) todas las determinaciones se hacen por duplicado, se procesan de igual manera que los puntos de la curva.
- b) Anotar el tiempo de coagulación y obtener en la curva de calibración la concentración de fibrinógeno del problema.
- c) El resultado se reporta en mg/dl.

## FIBRINOGENO.

**Método enzimático de Claus:** La trombina transforma al fibrinógeno soluble en un polímero insoluble (fibrina), la velocidad de la reacción esta determinada por la concentración del fibrinógeno. Este método mide el fibrinógeno funcional.

### Técnica.

#### - PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

Con el amortiguador de veronal se efectúan una serie de diluciones de un estándar de fibrinógeno (1:5, 1:10, 1:40).

Efectuar en el fibrometro determinación por duplicado a cada dilución.

- a) Incubar 0.2 ml. de la dilución de fibrinógeno durante 2 minutos a 37°C.
- b) Adicionar 0.1 ml. del reactivo de trombina (a temperatura ambiente) y accionar el cronómetro del fibrómetro, el cual se para automáticamente al formarse el coágulo.
- c) Anotar el tiempo de coagulación para cada uno de los puntos y trazar una gráfica de concentración en mg/dl contra tiempo en segundos.

#### - DETERMINACIÓN DEL FIBRINOGENO PROBLEMA.

- a) Hacer una dilución de la muestra 1:10 en el amortiguador) todas las determinaciones se hacen por duplicado, se procesan de igual manera que los puntos de la curva.
- b) Anotar el tiempo de coagulación y obtener en la curva de calibración la concentración de fibrinógeno del problema.
- c) El resultado se reporta en mg/dl.



## Reactivos.

### *Citrato de sodio 3.8%*

Citrato de sodio	3.8 g
Agua destilada c.b.p.	100 ml

### *Trombina humana (aprox. 50 unidades NHI/ml)\**

\*NHI= Unidades referidas a un patrón internacional de trombina humana.

### *Reactivo comercial para la determinación de Fibrinógeno.*

### *Amortiguador de veronal $2.84 \times 10^{-2} M$ en cloruro de sodio $1.25 \times 10^{-1} pH 7.35$*

Dietil barbiturato de sodio	11.75 g
Cloruro de sodio	14.67 g
Agua destilada	500 ml
Ácido clorhídrico 0.1 N	400 ml
Ajustar el pH a 7.35	
Agua destilada c.b.p.	2000 ml

## Cálculos.

Si el tiempo obtenido es muy corto (mas de 800 mg/dl) se diluye el plasma 1:20 y el resultado obtenido se multiplica por 2.

Si el tiempo es muy prolongado (menos de 50 mg/dl) se efectúa una dilución 1:5 y el resultado se divide entre 2.

Si con una dilución 1:2 el plasma no coagula, la concentración de fibrinógeno es menor de 15 mg/dl.

## DETERMINACION DE FIBRINOGENO POR TERMOPRECIPITACION.

### Principio.

El fibrinógeno humano precipita a 56°C . La medida de la altura del precipitado después de su centrifugación es proporcional a su concentración en el plasma.

### Técnica.

1. Se marcan tubos capilares no heparinizados a una longitud de 4.5 cm.
2. Se aforan con plasma a este nivel , se cierra el extremo opuesto por medio de calor , se centrifuga con microcentrifuga por unos momentos para llevar el plasma hacia el extremo sellado, cerrando también el otro extremo con calor.
- 3.El capilar ya preparado se introduce en el baño maría a 56°C durante 15 minutos, procurando que el nivel del agua sobrepase al del plasma que estaba en el capilar para asegurar un calentamiento uniforme, se centrifuga 10 minutos a 300 r.p.m.
4. El tubo capilar se lee en microescala, midiendo la altura del precipitado de fibrinógeno (HF) y sin mover el tubo capilar para que el fondo siguiera coincidiendo con el cero de la escala , se mide la altura del plasma (HP). Se resta HF de HP obteniéndose solo la medida del plasma que por analogía con el hematocrito se le llama plasmacrito y al fibrinógeno precipitado fibrinocrito. Se aplica la siguiente fórmula para obtener la concentración en mg/dL:

$$\text{HF/HP} \times 100 \times \text{factor} = \text{FIBRINOCRITO}$$
$$\text{FACTOR} = 62.12 \text{ (constante de calibración)}$$

Este factor lo debe establecer cada laboratorio comparando está técnica con otras más sensibles , y se divide la cifra obtenida por la técnica conocida entre la del fibrinocrito para cada muestra, sumándose y promediando los factores obtenidos, para obtener la constante de calibración.

### Interpretación.

Es un método poco preciso, pero rápido y orientativo. Debe tenerse en cuenta, no obstante que los productos de degradación de la fibrina ( coagulación intravascular diseminada) precipitan también a 56°C y pueden falsear los resultados.



## **Reactivos y Material.**

1. Plasma
2. Baño maría a 56° C .
3. Microcapilares no heparinizados.
4. Centrifuga de microhematocrito.
5. Ocular de microscopio con escala graduada.

## TIEMPO DE LISIS DE EUGLOBULINAS.

### Introducción.

En la fracción euglobulinica del plasma, se encuentra el fibrinógeno, el plasminógeno y las fibrinolisin. Esta técnica suprime los inhibidores del plasminógeno. Las fibrinolisin del glóbulo rojo destruidas aceleran la lisis pero se encuentran en cantidades muy constantes, en cambio existe variación en la fibrinólisis plasmática.

Si el paciente cursa con un cuadro de fibrinólisis aumentada, los activadores presentes en dicha reacción transformarán al plasminógeno en plasmina y esta última actuará sobre la fibrina formada de manera acelerada.

### Reactivos.

#### *Ácido clorhídrico 0.1 N*

Acido Clorhídrico	0.85 ml.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.
Estandarizar la solución	

#### *Amortiguador de imidazol pH 7.3*

Imidazol	3.4 g
Cloruro de Sodio	5.84 g
Mezclar y añadir:	
Solución de Acido Clorhídrico 1M	18.6 ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

#### *Trombina diluida (solución de trabajo 1:10)*

#### *Ácido acético 1%*

Acido acético	1ml
Agua destilada c.b.p.	100 ml



*Cloruro de calcio 0.025 M*

Cloruro de cálcico anhidro	1.38 g
Agua destilada c.b.p.	500 ml

**Técnica A.**

1. En un tubo de ensaye colocar:
  - 4.2 ml de agua destilada
  - 0.15 ml de ácido clorhídrico 0.1 N
  - 0.3 ml de plasma problema
2. Tapar el tubo con papel parafilm y agitarlo por inversión suavemente.
3. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 5 minutos.
4. Desechar el sobrenadante.
5. Agregar 0.3 ml de amortiguador de imidazol.
6. El precipitado se resuspende con un aplicador previamente mojado en amortiguador de imidazol.
7. Agregar 0.1 ml de trombina diluida.
8. Agitar el tubo suavemente, taparlo con papel parafilm y colocarlo en baño de incubación a 37°C.
9. Observar la formación del coágulo cada 10 minutos.

**Técnica B.**

1. En un matraz erlenmeyer de 50 ml agregar 19 ml de agua destilada.
2. Adicionar 1.0 ml de plasma y 0.35 ml de ácido acético al 1% (gota a gota y agitando).
3. Reposar a 4°C durante 10 minutos.
4. Agitar y repartir en 4 tubos volúmenes iguales.

5. Centrifugar a 3500 r.p.m. durante 5 minutos.
6. Decantar el sobrenadante y secar la pared interna de los tubos con papel filtro.
7. Redissolver con 1 ml de amortiguador de imidazol.
8. Colocar en baño de incubación a 37°C.
9. Coagular con 2 gotas de cloruro de calcio 0.025 M o 0.1 ml de trombina (debe coagular entre 1 minuto 45 segundos a 2 minutos).
10. Observar la lisis del coágulo en las 2 primeras horas.

### **Comentarios.**

- a. La fracción euglobulinica del plasma preparada por dilución y acidificación, está relativamente libre del sistema enzimático fibrinolítico. La desaparición del coágulo va a significar la lisis de euglobulinas y por lo tanto es un indicio de la presencia de plasmina y/o de los activadores del plasminógeno. Esta valora el componente fibrinolítico.
- b. El material biológico utilizado es plasma citratado pobre en plaquetas.

### **Valores de Referencia.**

El coágulo debe permanecer formado más de 90 minutos.



# SULFATO DE PROTAMINA.

## Introducción.

El sulfato de protamina tiene la propiedad de inducir la polimerización no enzimática de complejos solubles de monómeros de fibrina, que se forman en el plasma cuando se encuentran trazas de trombina circulante. Tal fenómeno se denomina paracoagulación y consiste en la formación de filamentos de fibrina o de un verdadero coágulo después de añadir sulfato de protamina.

## Reactivos.

*Solución de sulfato de protamina 1% en amortiguador TRIS pH 6.5 0.05 M*

*Amortiguador TRIS pH 6.5 0.05M.*

## Técnica.

1. Efectuar una dilución 1:5 de la solución de sulfato de protamina con el amortiguador TRIS.
2. Colocar 0.2 ml de esta dilución en un tubo de 10 X 75 mm.
3. El plasma pobre en plaquetas (ppp) del problema se obtiene al centrifugar el plasma rico en plaquetas durante 10 minutos a 3500 r.p.m. El ppp se coloca en un tubo limpio y se incuba a 37°C durante 5 minutos.
4. Adicionar 0.2 ml del ppp al tubo que contiene 0.2 ml del sulfato de protamina (dilución 1:5).
5. Tapar el tubo y colocarlo a 37°C durante 30 minutos. Agitar suavemente y observar la apariencia de la mezcla de reacción. Reportar considerando los criterios indicados en la parte de resultados.

## Resultados.

g	*	gelación
rf	*	red de fibrina
+	*	precipitado grueso
+/-	*	precipitado fino
-	*	solución clara

Si el resultado es positivo es necesario realizar diluciones del sulfato de protamina con el amortiguador TRIS en las siguientes proporciones: 1:10; 1:20 y 1:40. Para cada una de estas diluciones continuar con la técnica desde el inciso (b).

## Comentarios.

a. Los complejos solubles de monómeros de fibrina con fibrinógeno y productos de la degradación de fibrina y fibrinógeno o ambos, precipitan cuando se añade protamina al plasma. El objetivo de ésta técnica es el detectar los monómeros solubles de fibrina y/o los productos de degradación de fibrinógeno y fibrina.

b. El material biológico utilizado es plasma citratado pobre en plaquetas.

## Valores de Referencia.

Negativo -----> Solución clara

La presencia de un precipitado granular fino significa la existencia de bajos niveles de monómeros de fibrina o productos de degradación de fibrinógeno y de fibrina.

Se considera positiva si los tubos presentan coágulo de fibrina o precipitado fino.



## GELACION DE ETANOL.

### Introducción.

En algunas patologías de los sistemas de la coagulación como en Coagulación Intravascular Diseminada (CID) o en procesos fibrinolíticos, se producen productos de degradación de la fibrina o del fibrinógeno, así como monómeros de fibrina; los cuales son capaces de paracoagular en presencia de etanol.

### Reactivos.

*Citrato de sodio al 3.8%*

Citrato de sodio

3.80 g

Agua destilada c.b.p.

100.00 ml

*Etanol al 50% en agua destilada*

### Técnica.

En un tubo de 10 x 75 mm colocar 0.5 ml de plasma pobre en plaquetas. Colocarlo en un baño de incubación durante 3 minutos; adicionar 0.15 ml de etanol al 50%, agitar suavemente el tubo y mantener en reposo durante 10 minutos a 22°C (TA), después de este tiempo observar con inclinación cuidadosa del tubo, la gelificación de la muestra.

### Resultados.

Gelación: Positiva

No gelación: Negativa

**INTERPRETACIÓN:** Dado que esta prueba es positiva para monómeros de fibrina como para productos de degradación del fibrinógeno, es necesario que el resultado se analice en forma integral con el resto de las pruebas de laboratorio.

## **Comentarios.**

1. En esta prueba se aprovecha la propiedad de provocar la paracoagulación que tiene el etanol sobre los complejos solubles: monómeros de fibrina o fragmentos x<sup>o</sup> ligados a productos de degradación de fibrinógeno o de la fibrina.
2. El material biológico es plasma citratado pobre en plaquetas.
3. En condiciones normales no se observa gelación.



## BIBLIOGRAFIA

Prácticas basadas en las técnicas utilizadas en el laboratorio de especialidades de hematología del Hospital Médico Nacional Siglo XXI.

Bernard Henry J., Todd, Sanford-Davidsohn; Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods; Salvat Editores S.A., Barcelona España (1992), Reimpresión, 8a. ed.

Beth, T.; Astrup, C.; The Biological Significance of Fibrinolysis; Lancet Magazine; Vol. 35; 1993.

Biggs, R. and Macfarlane, R.G.; Human blood coagulation and its disorders; 3 th de. Philadelphia, F.A.Davis Co.

Bronson, R.; Beale, J.D.; Improved Rapid Methods for the Determination of Iron Content and Binding Capacity of Serum; Jclin-Pathol; 1992.

Brown, J.S.; Charms, J. F.; Diagnosis by Laboratory Methods. 5th ed.; Ed. Maxwell-Houshing. Germany; 1990.

Carrasco R. Guadalupe L.; Nieto C. Raúl; Salazar V. Ana Ma.; Manual de Prácticas de Hematología; División de Bioquímica y Farmacia, Departamento de Biología; 1991.

Cartwright, E.G.; Diagnostic Laboratory Haematology Grune and Stratton; Nueva York y Londres ; 4th ed. ; pp 377.

Costres, B.; Monge, K.; Lorian, J.; Técnicas de Dosificaciones Séricas de Hierro y Capacidad de Fijación de Hierro. Rev. Med. Clin.; 1995.

Dacie, J.V. & Lewis, S.M.; Practical Haematology. Seventh edition; Churchill Livingstone; New York. 1990.

Darling, J. V.; Practical Haematology; fifth edition; Ed. Broadcast-drom; U.S.A. 1993.

Gradwhol, R.; Clinical Laboratory Methods, Diagnosis and management. 7th edition; Vol. 3; Ed. Mosey Co.; U.S.A. 1991.

Hardisty R.M. and Ingram, G.I.C. ; Bleeding disorders Investigations and Management, Blacwell Scientific Publication, Oxford.

International Committee for Standarization in Hematology; Standard Techniques for the Measurements of red cells of Haematology; 1993.

Joan Lluís V., Josep Lluís A.; Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología; Ediciones Científicas y Técnicas MASSON-SALVAT MEDICINA; Reimpresión 1992.

Jones, R.F. Practical Hematology; 5th edition; Ed. Walingstone; London; 1994.

Kaplan, M.; Alex, S.; Clinical Chemistry, Interpretation and Techniques, Laverne L. Szabe; Lea & Febiger; Philadelphia; 1989

Marquina D. Moyado y Col.; Procedimientos Básicos para la Selección de Donadores de Sangre en la ciudad de México; Rev. Med. Nal. Vol I; 1995.

Owren C., Bollman; The diagnosis of Bleeding disorders; Proc. Biol. Med. 67. pp :231.

Quintanar, E.; y Col.; Manual de Técnicas y Procedimientos del Banco Central de Sangre; Instituto Mexicano del Seguro Social.

Ruiz G. y Jimenez T.; Técnica rápida de microprecipitación en tubo capilar para determinación de fibrinógeno; Rev. Mex. Lab. Clin. 17: 2204-208.

Seaman, B.S.; The Plasma Protamine Paracoagulation Test. Arch. Intern. Medical; 1993.

Teliz Sandoval E.; Estudio Comparativo de 5 Métodos para Determinar el Fibrinógeno en Plasma; Tesis de Licenciatura; UNAM; 1992.