

41  
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

MANUAL DE PRACTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE ANALISIS  
BIOQUIMICO CLINICOS 1.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
GUSTAVO ANTONIO MEDINA CLORIO  
ASESOR: Q.F.B. IDALIA AVILA MIYAZAWA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. OCTUBRE 1999

TESIS CON  
ALLA DE ORIGEN

270103



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



LIBERTAD NACIONAL  
AVANZA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U N A M  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Manual de prácticas para el Laboratorio de Análisis Bioquímico Clínicos I.

que presenta el pasante: Gustavo Antonio Medina Clorio  
con número de cuenta: 8754177-1 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E,  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 9 de Julio de 199 8

PRESIDENTE Q.F.B. Ramón Cendejas Ramírez

VOCAL Q.F.B. Idalia Ávila Miyazawa

SECRETARIO Q.F.B. Martha Patricia Campos Peón

PRIMER SUPLENTE M.C. Víctor Zendejas Buitrón

SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. Angel G. Martínez Sosa

A Dios por su amor infinito.

A mis Padres por su eterno amor  
y paciencia les dedico este  
eslabón más en mi cadena de logros,  
que por tanto tiempo esperaban.

A mi hermana con cariño le dedico esta obra.

A mi sobrino Azared mi gran luz con todo mi amor.

A mi sobrina Dione mi otro amor.

A mis Abuelitos: Aurelio y Pureza con quienes compartí  
un segundo hogar cuando estudie la carrera.

A todos mis tíos: Jenny, José Luis, Rebeca, Ruth, Lilia, David, Sóstenes, Roberto.

A mis primos: Liz, Pepe, Irais,  
Bere, Rebeca, Ricardo, David y Lilian.

A la familia Galván Ruíz por tenderme  
siempre una mano amiga.

A mi directora de Tesis: Q.F.B. Idalia Avila M.  
por su paciencia, su gran amistad y por creer  
en mí al confiarme este trabajo.

Al Prof. Ramón Cendejas por su amistad y  
comprensión.

A mis amigos de la FES-C: M.A. Chong, Gerardo Arroyo, Gerardo Vergara,  
Jorge Rojas, Gustavo Betán, Rocío Chávez,  
Ma. Elena Martínez, Juan José Gómez, Miguel  
Angel Cruz.

Una Amistad muy especial: Alma Nuñez del Arco.

A Todos quienes transitaron por la FES-C  
generaciones anteriores y las que vendrán.

A mí Gran Amor Lulú con quien comparto y compartire toda mi vida  
le doy gracias por su apoyo en todo momento que la necesite  
y darme la fuerza para poder culminar este trabajo tan importante.

GRACIAS A TODOS.

## **OBJETIVOS GENERALES:**

En este trabajo se da a conocer la información básica para que el alumno pueda efectuar sus prácticas básicas de laboratorio; teniendo a su alcance la guía de procedimientos; una relación bibliográfica (libros de consulta, revistas especializadas), y datos importantes de las técnicas más utilizadas en el laboratorio de Análisis Bioquímico Clínicos, así como el material que le sea necesario cuando pretenda desarrollar su trabajo.

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

**Al finalizar el curso el alumno deberá:**

- Conocer las diferentes pruebas de laboratorio, así como su fundamento y aplicación para establecer las más adecuadas conforme a los recursos académicos del laboratorio donde se desempeñe.
- Interpretar los resultados de las pruebas realizadas de la forma más veraz que le permita detectar posibles anomalías dentro de los estudios de laboratorio practicados.
- Conocer y familiarizarse con la preparación de los reactivos más utilizados para los estudios químicos de las diferentes pruebas de laboratorio clínico, así como del manejo y fundamento de los aparatos empleados en los estudios químicos.
- Adquirir la habilidad técnica para realizar estos estudios, así como de la toma de decisiones para realizar y corregir posibles errores.

## PROLOGO

El estudiante de química clínica tiene la creciente necesidad de poder tener información condensada y actualizada enfocada al área de los análisis clínicos, debido a esto se realizó este manual con el objetivo principal de que el estudiante o profesional involucrado en las áreas del laboratorio clínico tengan una forma de acceso a las técnicas más utilizadas, permitiendo que en la práctica le sea más fácil desarrollarlas.

Este manual abarca temas como son: **Toma de muestra sanguínea**, donde se abordan los temas de los diferentes equipos o materiales que se emplean para realizar la toma de muestra sanguínea venosa, estos equipos se refieren a la forma de utilización tanto de jeringa como del sistema vacutainer; los tipos de agujas y sus calibres más adecuados, las presentaciones de los tubos para el sistema vacutainer; así como la obtención de suero y plasma, la utilización de cada uno de ellos para las diferentes pruebas a realizar.

El tema de **banco de sangre** se aborda de manera sencilla abarcando desde la estructura de los receptores para el sistema ABO, su determinación, factor Rho, así como el examen de compatibilidad a través de la técnica de las pruebas cruzadas para determinar una posible transfusión sanguínea.

Uno de los paquetes de prueba de gran utilidad para evaluar el estado de todos los elementos formes de la sangre es la **biometría hemática (citometría)** con ella podemos determinar los grados de anemia que presente un paciente.

Con las **pruebas de tendencia hemorrágica** podemos conocer anomalías en cualquiera de los mecanismos hemostáticos principales (intravasculares, vasculares, extravasculares).

El laboratorio clínico emplea una serie de determinaciones que se denominan **química sanguínea**, en ella se consideran los métodos empleados rutinariamente para cuantificar los componentes metabólicos procesados por la célula; las perturbaciones en el recambio de las materias que integran el organismo creando desequilibrios en la composición del mismo dando lugar a diversas enfermedades.

Una de las pruebas que nos permite evaluar una de las enfermedades más características como es la diabetes es la determinación de glucosa plasmática a diferentes dosis para ello se emplea la **prueba oral de tolerancia a la glucosa**.

Otra de las determinaciones bioquímicas que empleamos y que reflejan el estado de una enfermedad hepática se conocen como **pruebas de funcionamiento hepático** con ellas evaluamos el estado y funcionalidad del hígado, ya que este interviene en la mayoría de los procesos metabólicos del organismo.

El tracto urinario representa la vía de eliminación de los derivados metabólicos y químicos no esenciales disueltos en agua, uno de los paquetes de pruebas más útiles para evaluar el buen funcionamiento del tracto urinario es el llamado **examen general de orina**.

El profesional de la salud en su continuo trabajo se involucra en el manejo de varios aparatos de gran importancia en las ciencias químico-biológicas por lo que su uso correcto y su cuidado son esenciales para lograr su mejor rendimiento, es por esto que en la presente obra se hace mención al tema de manera concreta y de fácil entendimiento.

Entre los equipos más empleados por el laboratorista clínico es el espectrofotómetro este se utiliza para realizar determinaciones repetidas de un mismo constituyente, utilizando las propiedades fisicoquímicas de los productos metabólicos, lo cual permite medir la absorción o emisión de su energía radiante.

## CONTENIDO

<b>CAPITULO 1. Toma de muestra</b>	
Introducción.....	6
Tipos de muestras sanguíneas.....	7
Procedimientos.....	11
Obtención de suero y plasma.....	13
<b>CAPITULO 2. Banco de sangre</b>	
Introducción.....	16
Tipificación sanguínea.....	16
Procedimientos.....	18
Interpretación de resultados.....	18
Cuidados.....	19
Pruebas cruzadas	
Prueba mayor.....	21
Prueba menor.....	21
Interpretación de resultados.....	22
Cuidados.....	22
<b>CAPITULO 3. Biometría hemática</b>	
Introducción.....	23
Determinación de hemoglobina.....	23
Determinación de hematocrito.....	24
Determinación de velocidad de sedimentación globular.....	25
Recuentos celulares	
Eritrocitos.....	27
Leucocitos.....	29
Determinación morfológica de la sangre (conteo diferencial).....	32
Determinación de reticulocitos.....	35
<b>CAPITULO 4. Hemostasia (pruebas de tendencia hemorrágica)</b>	
Introducción.....	38
Tiempo de coagulación de sangre completa.....	41
Tiempo de sangrado.....	42
Conteo plaquetario.....	43
Tiempo de tromboplastina parcial activada.....	44
Tiempo de protrombina.....	45
Recalcificación de plasma.....	46
<b>CAPITULO 5. Química sanguínea</b>	
Introducción.....	47
Determinación de urea.....	47
Determinación de creatinina.....	52
Determinación de ácido úrico.....	55
Determinación de glucosa plasmática.....	53
<b>CAPITULO 6. Prueba Oral de tolerancia a la glucosa (P.O.T.G.)</b>	
Introducción.....	62
Procedimientos.....	63
Interpretación de resultados.....	64
Cuidados.....	65

<b>CAPITULO 7. Pruebas de funcionamiento hepático (perfil hepático)</b>	
Introducción.....	67
Determinación de bilirrubinas.....	69
Determinación de enzimas	
TGO.....	73
TGP.....	74
Determinación de colesterol.....	76
Determinación de triglicéridos.....	79
Determinación de lípidos totales.....	82
Determinación de proteínas y albúmina.....	84
<b>CAPITULO 8. Examen general de orina (E.G.O)</b>	
Introducción.....	88
Recolección de muestra.....	91
Conservación de muestras.....	91
Estudio macroscópico	
Examen físico.....	92
Examen Químico.....	95
Estudio microscópico.....	98
<b>APÉNDICE A: Manejo y cuidado del microscopio óptico.....</b>	<b>101</b>
<b>APÉNDICE B: Manejo y cuidado del espectrofotómetro de luz visible.....</b>	<b>121</b>
Espectrofotometría de absorción (espectro visible y ultravioleta).....	126
<b>APÉNDICE C: Automatización (citometría).....</b>	<b>133</b>
Principio.....	134
Interpretación de gráficos.....	135
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>138</b>

## TOMA DE MUESTRA

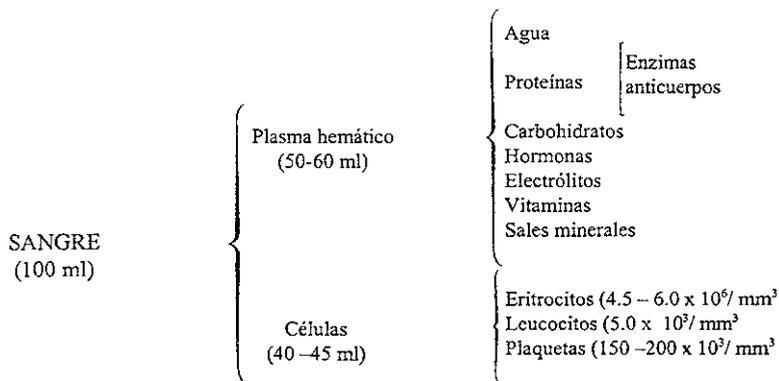
La sangre es un tejido que circula dentro del sistema virtualmente cerrado de los vasos sanguíneos; esta compuesta por elementos figurados (**eritrocitos, leucocitos y plaquetas**) y por el plasma (que es un líquido que mantiene a las células en suspensión).<sup>7,8</sup>

La masa de sangre en adultos sanos constituye alrededor de 6 a 8% del peso corporal; es mayor en hombres que en mujeres y está sujeta a variaciones de índole individual. En la tabla 1-1 se muestran las constantes físicas del plasma y sangre completa:<sup>8,9</sup>

Tabla 1-1 constantes físicas del plasma y sangre completa  
(cifras promedio normales)<sup>7,8,9</sup>

	PLASMA		SANGRE COMPLETA	
	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
Volumen por Kg	35 ml	45 ml	67 ml	78 ml
Densidad específica	1.025 g/ml		1.060 g/ml	
Viscosidad	1.5 - 2.0		4.0 - 5.0	
Punto de congelación	- 0.55°C			
Osmolaridad	275 295 mosm/Kg			
pH	7.4 (límites 7.33 - 7.51)			

La composición de la sangre es compleja, como la de cualquier otro tejido. Los elementos celulares difieren ampliamente de los del plasma en el cual están suspendidas. En el diagrama siguiente se resumen los componentes primordiales de la sangre.<sup>2,9</sup>



Es vital que la sangre se mantenga líquida y circule libremente por el sistema vascular, también es importante que no se pierdan grandes volúmenes de sangre por hemorragia; cuando esto sucede, en la sangre ocurren una serie de reacciones que conducen a la coagulación de esta. El mecanismo de coagulación de la sangre está organizado de tal forma que normalmente no funciona en tanto la sangre se encuentra en el interior de los vasos sanguíneos.<sup>1,2,3</sup>

Cuando la sangre se coagula, el fibrinógeno presente en el plasma se convierte en fibrina, que se separa como filamentos entremezclados con las células y el líquido para formar un coágulo; por reposo el coágulo se retrae al acortarse los filamentos de fibrina, y de él drena un líquido transparente llamado suero.<sup>1,3,7,8</sup>

Si se impide la coagulación por adición de un agente (llamado anticoagulante) se obtiene por fraccionamiento el plasma y paquete celular (sangre completa),

## TIPOS DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

La sangre venosa vuelve al corazón por las venas y lleva una gran concentración de bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) proveniente de las células hasta los pulmones para la función de hematosis. Esta sangre representa el estado en que se encuentra el organismo y es relativamente fácil de obtener, razón por la cual se usa en casi todos los análisis de laboratorio clínico. La sangre arterial que pasa por la fase de oxigenación de los pulmones sale del corazón por las arterias para distribuir los nutrientes en toda la red capilar; la punción de una arteria incrementa los riesgos de hematoma y espasmo del vaso, pero a veces se necesitan muestras de sangre arterial para medir pH, presión parcial de oxígeno ( $\text{PaO}_2$ ) y presión parcial de bióxido de carbono ( $\text{PaCO}_2$ ) y estudios de saturación con oxígeno.<sup>1,4</sup>

La sangre capilar (periférica) desempeña las funciones más finas del aparato circulatorio, como son el intercambio de líquidos, nutrientes y sustancias de desecho entre el líquido hemático y los tejidos; las muestras de sangre capilar son de enorme utilidad en pruebas como las mediciones de hemoglobina y valor de hematócrito, frotis sanguíneo, microtécnicas de química clínica, así como en recuento de plaquetas, eritrocitos y leucocitos; que son técnicas que requieren solo cantidades pequeñas de sangre.<sup>4</sup>

Para las técnicas hematológicas es fundamental obtener muestras de sangre adecuadas, ateniéndose a una técnica muy precisa.<sup>3</sup>

La naturaleza del estudio, el estado físico y edad del individuo son los factores que rigen la obtención de una muestra adecuada de sangre, así como el sitio de muestreo (punción) y la técnica; las técnicas de extracción de sangre no se aprenden en un día, es un arte que debe desarrollarse mediante estudio, observación y práctica, hasta que el laboratorista clínico posea la suficiente destreza y confianza en sí mismo; habilidad, paciencia y comprensión, son las cualidades primordiales de un buen laboratorista clínico en extracciones de sangre.<sup>4,5</sup>

Casi todas las muestras de sangre se obtienen por punción venosa, es el método más "fácil" y adecuado para obtener un volumen suficiente para llevar a cabo la determinación deseada.<sup>3</sup>

## MATERIAL

**Cristalería:** Tubos de ensaye de 13 x 100 mm  
Frasco de boca ancha con tapa (toruñero)  
Pipetas Pasteur

**Otros:** Liga de látex de 3 mm de diámetro y 15 cm de largo (ligadura)  
Gotero, algodón

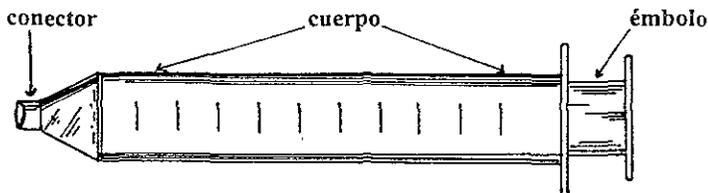
**Aparatos:** Lancetas estériles

**Sistema microtainer de vacutainer<sup>10</sup>**

Lanceta automática amarilla: con profundidad controlada de 2.4 mm en la incisión, para punción capilar en talón de bebé.

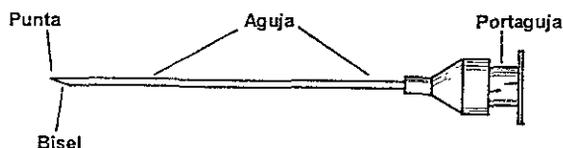
Lanceta automática azul: con profundidad controlada de 1.9 mm en la incisión, para punción capilar en yema de dedo adulto.

**Jeringa<sup>5</sup>**  
Sistema que sirve para aspirar e impeler ciertos líquidos y se compone de las siguientes partes:



**Agujas hipodérmicas:** Se emplean diferentes calibres para las jeringas (el calibre se refiere al diámetro de la aguja; cuanto mayor es el número, menor es el diámetro). En la tabla 1-2 se presentan los diferentes calibres de agujas empleados en jeringas desechables; la aguja se compone así:

20 x 32 mm <sup>3</sup>
21 x 25 mm <sup>3</sup>
21 x 32 mm <sup>3</sup>
22 x 32 mm <sup>3</sup>



### Sistema Vacutainer<sup>2,10</sup>

El sistema vacutainer comprende tres partes: aguja desechable de toma múltiple (doble filo: con una se punciona la vena y con la otra se perfora el tapón del tubo al vacío), soporte de plástico para sostener la aguja y el tubo al vacío, la otra parte es el tubo al vacío el cual va a variar de acuerdo al estudio que se vaya a realizar se identificara por el color de su tapón. En la tabla 1-3 se presentan los diferentes tipos de tubos al vacío que se emplean en el sistema vacutainer; en la tabla 1-4 se presentan los colores de agujas que identifican sus calibres en el sistema vacutainer.

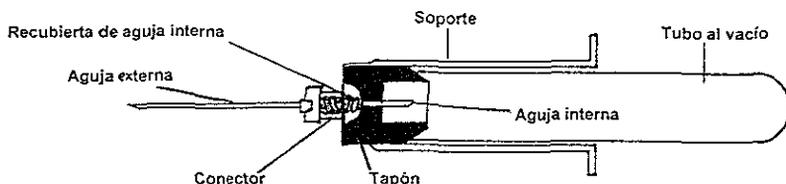
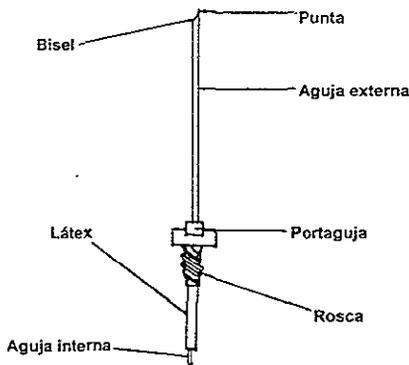


Tabla 1-3. Presentación de tubos al vacío del sistema vacutainer

Color de tapón	Contenido	Vol. de Sangre drenado (ml)
Lila	EDTA (0.05 ml) (0.07 ml)	3.0 7.0
Azul	Citrato de sodio (0.3 ml) (0.5 ml)	2.7 4.5
Rojo	Siliconizado Ninguno	5.0, 7.0 y 10.0 7.0 y 10.0
Lila	EDTA Na (10.5 mg)	7.0
Lila	EDTA K (0.048 ml)	5.0
Gris	Oxalato de potasio (20 mg)	7.0
Verde	Heparina sódica	5.0 y 10.0
Gris/rojo	Gel separador de suero	6.0 9.5

Tabla 1-4. Presentación de agujas de toma múltiple para sistema vacutainer

Color	Medida
Negro	22 x 38 mm <sup>3</sup>
Verde	21 x 38 mm <sup>3</sup>



Aguja de toma múltiple

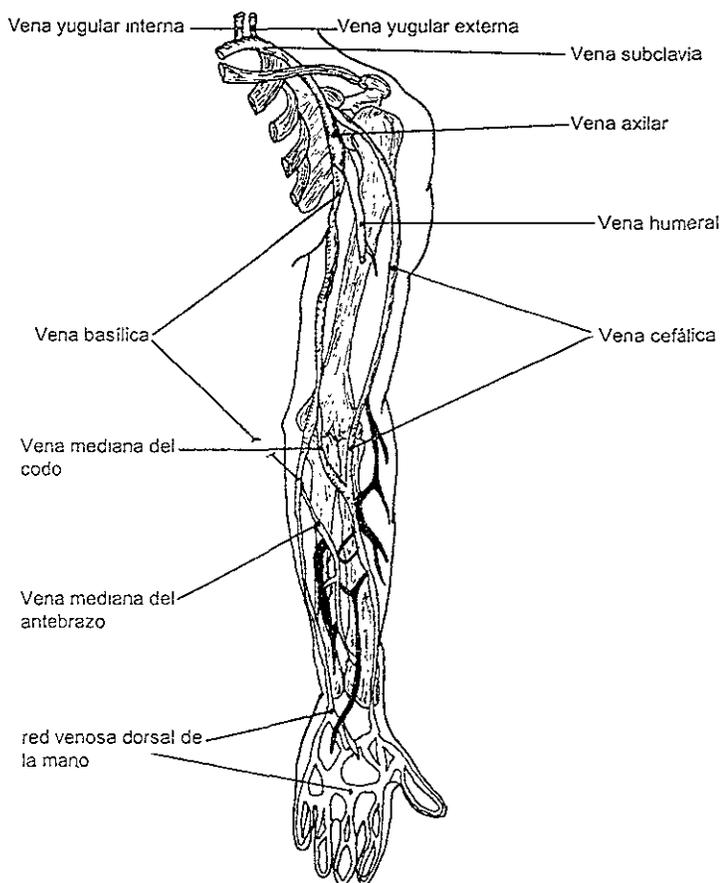


Fig. 1-1 Localización de las venas del brazo para posibles sitios de punción en la toma de muestra sanguínea

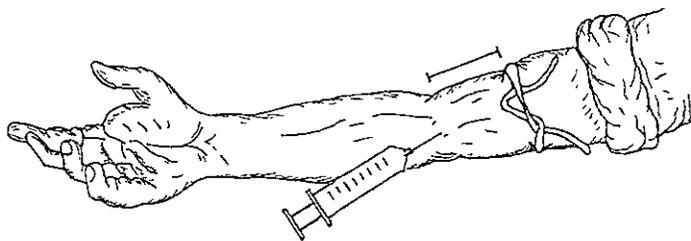
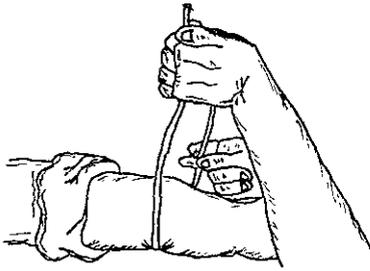
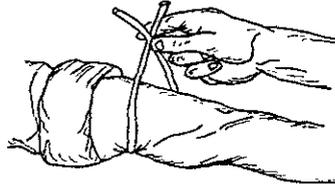


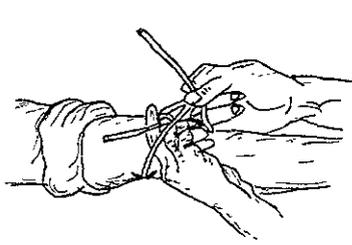
Fig. 1-3 Posición de la aguja para toma de muestra de sangre venosa.



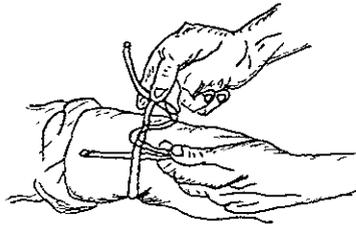
Paso 1



Paso 2



Paso 3



Paso 4

Fig. 1-2 Método para colocar el torniquete

Paso 1: Apretar la ligadura para obtener una presión conveniente.

Paso 2: Tomar los dos extremos de la ligadura con la mano derecha sin aflojar la presión.

Paso 3: Con la mano izquierda, pase el extremo izquierdo de la ligadura por debajo del otro extremo.

Paso 4: Con la mano izquierda, tirar del torniquete hacia abajo, como se indica, retirar las manos con cuidado.

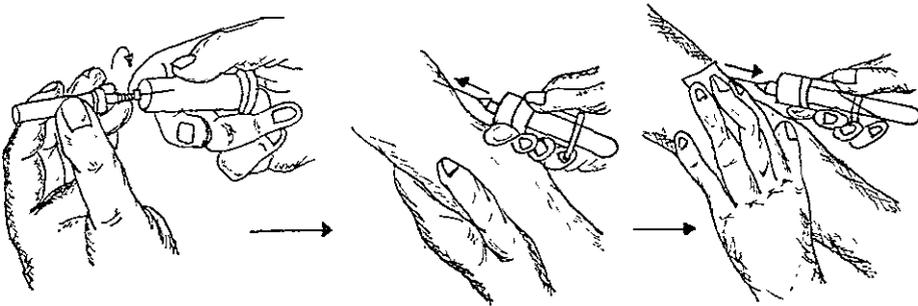


Fig. 1-4 Armado del sistema vacutainer, ensamble de la aguja de toma múltiple con el soporte plástico.

**Reactivos:**Alcohol etílico al 70 %<sub>1</sub>:

alcohol etílico al 100% =	70 ml
agua destilada	= $\frac{30 \text{ ml}}{100 \text{ ml}}$

**Anticoagulantes:**

**E.D.T.A.:** Es la sal disódica o dipotásica del ácido etilendiaminotetracético. Es el anticoagulante más utilizado en las técnicas hematológicas a concentraciones de 1 - 2 mg/ml de sangre, o 0.1 - 0.2 ml de una solución al 10% para 10 ml de sangre total. La coagulación se evita por eliminación de calcio de la sangre. El EDTA evita la formación de artefactos, y la sangre tratada es apta para preparar extensiones hasta 2 hrs. después de su extracción. Si la concentración de EDTA es superior a 2 mg/ml de sangre total, el valor del hematocrito tiende a disminuir, pero ello no afecta a la tasa de hemoglobina. La sangre puede ser almacenada a 4°C durante 24 hrs, sin efecto aparente alguno sobre la hemoglobina, el hematocrito, número de leucocitos y de hematíes. Si se almacena la sangre durante 24 hrs a temperatura ambiente, aparece un valor de hematocrito elevado, pero el resto de los parámetros no varían.

**Citrato de sodio:** Es el anticoagulante de elección para los estudios de coagulación. Se utiliza a la concentración de una parte de Citrato sódico 0.11M (3.8 %) por nueve partes de sangre total. Evita la coagulación al unirse el calcio de la sangre en un complejo soluble y además protege a algunos de los procoagulantes.

**Heparina:** se utiliza a una concentración de 0.2 ml de Heparina saturada por 1.0 ml de sangre total. La coagulación se evita por neutralización de la trombina. La Heparina es el anticoagulante de elección para la prueba de fragilidad osmótica (si se utiliza sangre sin coagular). Sin embargo, la sangre heparinizada no es aconsejable para la preparación de extensiones que deban teñirse por la técnica de Wright, debido a la formación de un fondo azul sobre la preparación teñida.

**Oxalato de amonio y potasio:** (Oxalato doble) se compone de 6 partes de Oxalato de amonio y cuatro partes de Oxalato de potasio. Se utiliza a una concentración de 2 mg por ml de sangre total. La coagulación se evita por la eliminación del calcio en la sangre. El inconveniente que presenta esta preparación es que la sangre tratada con ella no se puede utilizar para efectuar extensiones, ya que en pocos minutos se produce un dentado en el borde de los hematíes, aparecen vacuolas en los granulocitos y formas extrañas en linfocitos y monocitos.

**OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE****1.-OBTENCION DE SANGRE VENOSA**

**Principio:** La punción venosa suele hacerse en el pliegue del codo que es donde las venas superficiales son más accesibles a la punción, la más recomendable es la vena cefálica, que está en el pliegue del codo sobre la cabeza del radio; es fija y no se escapa tanto a la aguja como la basilica, que esta en el lado interno del codo; otros posibles sitios de punción son: la muñeca (arteria radial) y el dorso de la mano (red venosa dorsal y vena radial) o el pie (red venosa dorsal del empeine), vena femoral y yugular.<sup>2,6</sup>

**Procedimiento:**<sup>2,6,40</sup>**Utilizando jeringa seguir estos pasos:**

1. Identificar sitio de punción (vena cefálica) ver figura 1-1
2. Limpiar la zona con movimiento circular con una torunda impregnada de alcohol al 70%.

3. Verificar que el émbolo de la jeringa no se trabe (esto sin romper el empaque que la contiene), asegurar la aguja para que no se separe.
4. Colocar la ligadura a unos 15 cm por arriba del sitio de punción, ver figura 1-2
5. Quitar el tapón de la aguja y con el bisel hacia arriba introducir la aguja en la vena en un ángulo de 15° ver figura 3; cuando aparezca una gota de sangre en el interior del portaguja, jalar el émbolo hasta completar la cantidad de sangre deseada, ver fig 1-3
6. Retirar la ligadura cuidando de no lastimar al paciente.
7. Una vez obtenida la cantidad de sangre deseada, extraer la aguja y con una “torunda” seca y limpia, aplicar presión en el sitio de punción, al cabo de 2 o 3 minutos retirar la “torunda”.

#### Utilizando sistema vacutainer:<sup>4,6,40</sup>

1. Identificar sitio de punción (vena cefálica) ver fig.1-1.
2. Limpiar la zona con movimiento circular con una torunda impregnada de alcohol al 70%.
3. Armar sistema vacutainer como se muestra en fig.1-4; se conecta la aguja de toma múltiple al soporte de plástico del sistema vacutainer.
4. Colocar la ligadura a unos 15 cm por arriba del sitio de punción ver figura 1-2.
5. Quitar el tapón de la aguja y con el bisel hacia arriba introducir la aguja en la vena en un ángulo de 15° ver figura 1-3. Sosteniendo con firmeza el soporte de plástico, presionar el tubo contra el extremo posterior de la aguja hasta conseguir que ésta perfora el tapón de goma del tubo al vacío vacutainer; el tubo se va llenando de sangre debido a la succión producida por el vacío que existe en el tubo de extracción.
6. Retirar el tubo cuando éste se haya llenado casi por completo con sangre., siguiendo el procedimiento indicado, llenar un segundo tubo de sangre, si es necesario.
7. Retirar la ligadura cuidando de no lastimar al paciente.
8. Extraer la aguja y con una “torunda” seca aplicar presión al sitio de punción, al cabo de 2 o 3 minutos retirar la “torunda”.
9. Tapar la aguja de extracción para que no este expuesta y pueda causar un accidente, retirarla del soporte plástico y proceder a desecharla; limpiar el soporte plástico y guardarlo.

#### 2.-OBTENCION DE SANGRE CAPILAR,<sup>1,2,4,6</sup>

**Principio:** La obtención de sangre capilar obliga a puncionar con una lanceta realizando una herida con profundidad estandarizada la piel de la yema del dedo, la piel en el lóbulo de la oreja en los adultos o del dedo grueso de la mano, el talón de los neonatos, para obtener pequeñas cantidades de sangre.

#### **Procedimiento:**

1. Estimular la zona con frotación, para estimular la irrigación sanguínea.
2. Limpiar la zona en forma circular con una “torunda” impregnada con alcohol al 70%.
3. Con una lanceta realizar la punción con un pinchazo rápido y fuerte, dejar que fluya la sangre libremente por la herida realizada.
4. Si es necesario con un capilar recolectar la sangre y procesarla de acuerdo a la necesidad de estudio.
5. Una vez que se ha terminado, limpiar la zona con una “torunda” impregnada con alcohol al 70% limpia.

## OBTENCIÓN DE SUERO Y PLASMA

### 1.-OBTENCIÓN DE SUERO<sup>2,9</sup>

**Principio:** Cuando la sangre se coagula, el fibrinógeno presente en el plasma se convierte en fibrina, la cual se separa como filamentos que se entremezclan con las células y el líquido para formar un coágulo. Por reposo a 37°C durante 4 hrs la retracción del coágulo es máxima se extrae un líquido llamado "suero", ver figura 1-5.

#### Procedimiento

Si utiliza jeringa realizar los siguientes pasos:

1. Identificar sitio de punción (vena cefálica) ver figura 1-1
2. Limpiar la zona con movimiento circular con una torunda impregnada de alcohol al 70%.
3. Verificar que el émbolo de la jeringa no se trabe (esto sin romper el empaque que la contiene), asegurar la aguja para que no se separe.
4. Colocar la ligadura a unos 15 cm por arriba del sitio de punción, ver figura 1-2.
5. Quitar el tapón de la aguja y con el bisel hacia arriba introducir la aguja en la vena en un ángulo de 15° (ver figura 1-3); cuando aparezca una gota de sangre en el interior del portaagujas, jalar el émbolo hasta completar la cantidad de sangre deseada.
6. Retirar la ligadura cuidando de no lastimar al paciente.
7. Una vez obtenida la cantidad de sangre deseada, extraer la aguja y con una "torunda seca y limpia, aplicar presión al sitio de punción, al cabo de 2 o 3 minutos retirar la "torunda".
8. Retirar la aguja de la jeringa, verter la sangre a un tubo seco y limpio, dejar resbalar la sangre por las paredes del tubo, evitando que se forme espuma.
9. Dejar el tubo con sangre en reposo en baño de agua a 37°C ( a esta temperatura la coagulación se hace con mayor rapidez y la retracción del coágulo es máxima).
10. Cuando la coagulación sea completa, con un aplicador de madera limpio y seco, desprender el coágulo por las paredes del tubo, cuidando de no romperlo.
11. Centrifugar el tubo durante 5 minutos a 2500 r.p.m., después de este proceso se obtiene un líquido limpio, transparente y libre de hemólisis.
12. Separar el suero con una pipeta Pasteur y colocarlo en otro tubo limpio y seco (procesar el suero de acuerdo al estudio a realizar).

Si utiliza sistema vacutainer realizar los siguientes pasos:

1. Identificar sitio de punción (vena cefálica), ver figura 1-1.
2. Limpiar la zona con movimiento circular con una torunda impregnada de alcohol al 70%.
3. Armar sistema vacutainer como se muestra en fig.1-4; se conecta la aguja de toma múltiple al soporte de plástico del sistema vacutainer.
4. Colocar la ligadura a unos 15 cm por arriba del sitio de punción, ver figura 1-2.
5. Quitar el tapón de la aguja y con el bisel hacia arriba introducir la aguja en la vena en un ángulo de 15° ver figura 1-3. Sosteniendo con firmeza el soporte de plástico, utilizar tubo vacutainer con tapón rojo de 5 ml de volumen el cual no contiene ningún tipo de anticoagulante; presionar el tubo contra el extremo posterior de la aguja hasta conseguir que ésta perfora el tapón de goma del tubo al vacío vacutainer; el tubo se va llenando de sangre debido a la succión producida por el vacío que existe en el tubo de extracción.
6. Retirar el tubo cuando éste se haya llenado casi por completo con sangre.
7. Retirar la ligadura cuidando de no lastimar al paciente.
8. Extraer la aguja y con una "torunda" seca aplicar presión al sitio de punción, al cabo de 2 o 3 minutos retirar la "torunda".
9. Tapar la aguja de extracción para que no este expuesta y pueda causar un accidente, retirarla del soporte plástico y proceder a desecharla; limpiar el soporte plástico y guardarlo.

10. Al tubo se le retira el tapón, dejar el tubo con sangre en reposo en baño de agua a 37°C (a esta temperatura la coagulación se hace con mayor rapidez y la retracción del coágulo es máxima).
11. Cuando la coagulación sea completa, con un aplicador de madera limpio y seco, desprender el coágulo por las paredes del tubo, cuidando de no romperlo.
12. Centrifugar el tubo durante 5 minutos a 2500 r.p.m., después de este proceso se obtiene un líquido limpio, transparente y libre de hemólisis.
13. Separar el suero con una pipeta Pasteur y colocarlo en otro tubo limpio y seco (procesar el suero de acuerdo al estudio a realizar).

## 2.-OBTENCION DE PLASMA<sub>3,4</sub>

**Principio:** El plasma es la fracción líquida de la sangre que contiene todas las proteínas del líquido hemático; para casi todo el trabajo hematológico y análisis bioquímicos se requiere de sangre sin coagular; existen numerosos anticoagulantes. la mayor parte de ellos impiden que el calcio intervenga en la coagulación, ya sea precipitándolo como sales (oxalatos) o fijándolo en forma no ionizada (citratos y EDTA). La heparina actúa como antitrombínico, neutralizando a la trombina. Ver figura 1-6.

### Procedimiento:

#### Obtención de plasma mediante el anticoagulante EDTA<sub>1,2,3,4</sub>

Si va a utilizar jeringa proceder de la siguiente manera:

1. Proceder a hacer la extracción como se indica en el apartado de punción venosa con jeringa, una vez que se ha extraído la sangre, verterla en un tubo con anticoagulante EDTA al 5%, no olvidar retirar la aguja de la jeringa antes de vaciar la sangre al tubo con anticoagulante.
2. Con suavidad se harán varias veces movimientos de inversión del tubo con el fin de mezclar uniformemente la sangre con el anticoagulante, cuidando de no agitar para que no se presente hemólisis de la sangre.
3. Para separar la capa globular se centrifuga de 2000 a 2500 r.p.m., se separa el sobrenadante (plasma) con una pipeta Pasteur y se coloca en otro tubo limpio, procesarla de acuerdo al estudio a realizar.
4. Es conveniente guardar un poco antes de separar para correr extensiones de sangre en laminillas.

Si va a utilizar sistema vacutainer utilizar los siguientes pasos:

1. proceder a la extracción de sangre venosa como se indica en el apartado de punción venosa con sistema vacutainer, para ello se empleara un tubo al vacío de tapón color (EDTA 0.07 ml), una vez extraída la sangre retirar el tubo.
2. Con suavidad se harán varias veces movimientos de inversión del tubo con el fin de mezclar uniformemente la sangre con el anticoagulante, cuidando de no agitar para que no se presente hemólisis de la sangre.
3. Para separar la capa globular se centrifuga de 2000 a 2500 r.p.m., se separa el sobrenadante (plasma) con una pipeta Pasteur y se coloca en otro tubo limpio, procesarla de acuerdo al estudio a realizar.
4. Es conveniente guardar un poco de sangre antes de separarla para correr extensiones sanguíneas.

#### Cuidados en la determinación:<sub>2,4,5,6,7,9</sub>

1. Al verter la sangre al tubo se realizará suavemente, dejando que se deslice por las paredes del tubo para que no se forme espuma. No apretar con violencia el émbolo de la jeringa para que salga la sangre, ya que se produce fácilmente la hemólisis.
2. En caso de que la vena no haya podido ser puncionada al primer intento, utilice el índice libre para localizarla de nuevo, puede ser que el pinchazo no haya sido lo suficientemente profundo, o que la aguja se haya desviado ligeramente de la vena.
3. Es muy importante presionar el lugar de punción sin frotar para evitar la formación de hematomas (derrame de sangre en los tejidos).

- . Cuando se emplea jeringa para extraer la muestra, se debe evitar la inyección de aire en la vena, comprobar que el émbolo se encuentre completamente hasta el fondo del cuerpo de la jeringa antes de la punción.
- . Una vez puncionada la vena, se retira suavemente el émbolo de la jeringa, nunca aspire fuerte o bruscamente ya que esto puede hemolizar la sangre (la sangre sale espontáneamente por la presión venosa positiva)
- . Cuidar el retroceso del émbolo, la fuerza de retroceso puede hacer que la pared venosa se pegue sobre el bisel de la aguja y detenerse el flujo de sangre o bien la aguja puede deslizarse inadvertidamente fuera de la vena.

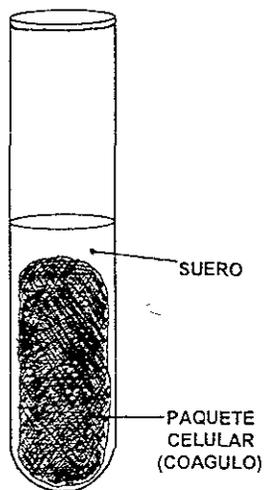


Fig.1-5 Obtención de suero

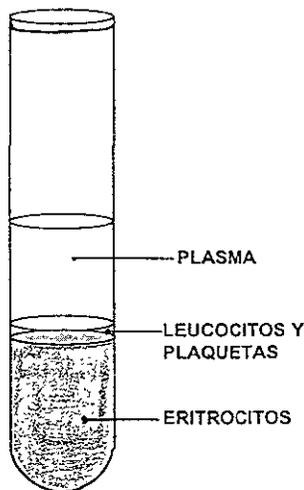


Fig. 1-6 Obtención de plasma

## BANCO DE SANGRE

En 1901 Landsteiner describió experimentos que demostraban que los eritrocitos de algunas personas eran aglutinados al ser mezclados con el suero de otros individuos; con estos se iniciaba la ciencia de la serología de grupos sanguíneos en general y la investigación de lo que en la actualidad se conoce como el sistema ABO en particular.

En 1924 Bernstein sugirió que los genes, que determinan los grupos ABO son heredados por las leyes Mendelianas; los genes A y B se expresan en forma dominante con O, el cual es amorfo pero son codominantes en forma recíproca.<sup>15</sup>

Los antígenos de los grupos sanguíneos son sustancias que pueden poner en marcha una respuesta inmunológica y reacciona con anticuerpos específico, por ello los antígenos son conocidos como inmunógenos, en cuya composición química se encuentran proteínas, glucoproteínas o lipoproteínas, que permiten diferenciarlos y clasificarlos en un gran número de grupos sanguíneos.

La importancia del tipo, cantidad y situación de los antígenos en los eritrocitos esta ilustrada por los antígenos ABO y Rho, la cantidad de receptores ABO puede acercarse a un millón por célula y se considera que son extramembranosos; así los eritrocitos son fácilmente aglutinados, mientras que los antígenos Rho poseen sólo de 10000 a 30000 receptores por célula y se considera intramembranoso.<sup>1</sup>

### Desarrollo de los antígenos:

Todos los individuos poseen una sustancia precursora sobre la cual actúan los genes ABH para formar los antígenos hallados en los eritrocitos. Esta sustancia precursora es una cadena polipeptídica que termina en algunos azúcares o residuos de polisacáridos.

**El gen H añade un residuo de L-fucosa a la cadena**

**El gen A añade un residuo de N-acetilgalactosamina a la cadena**

**El gen B añade un residuo de D-galactosa a la cadena**

Si solamente se halla presente el gen O entonces la cadena H que termina con fucosa no es modificada.<sup>15</sup> En la figura 2.1 se ilustra la estructura química de los grupos sanguíneos.

Por otro lado los anticuerpos son proteínas plasmáticas sintetizadas en la respuesta inmunitaria que son capaces de combinarse con antígenos.<sup>16</sup>

### Anticuerpos ABO

La presencia de anticuerpos en el plasma de individuos normales en todos los casos, exceptuando AB, constituye quizá la característica más importante de este sistema de grupos sanguíneos. En la tabla 2.1 se muestran los anticuerpos en el plasma de individuos normales.<sup>15,16</sup>

**Tabla 2.1 Presencia de anticuerpos en plasma de individuos normales**

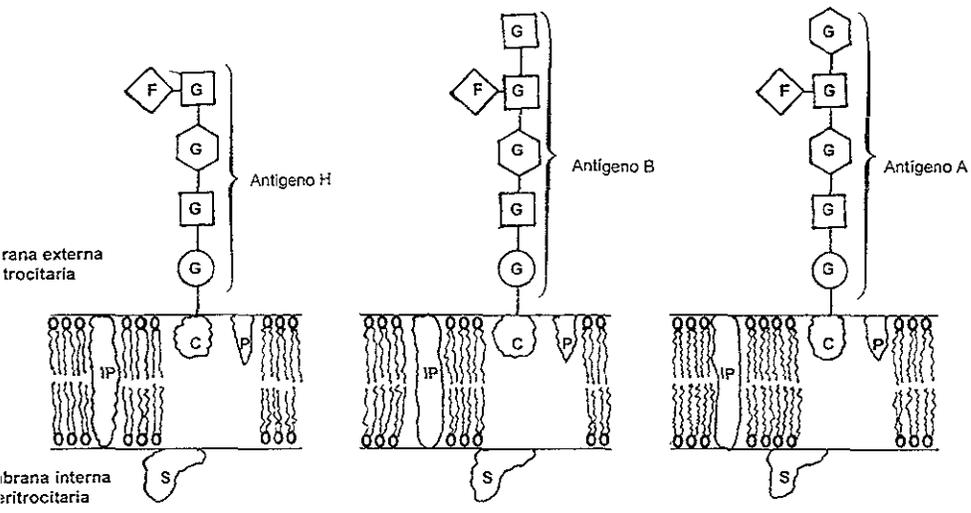
Antígenos	Anticuerpo en plasma
A	Anti-B
B	Anti-A
AB	No hay
O	Anti-A + Anti-B

## TIPIFICACION SANGUÍNEA

### Sistema ABO y Factor Rho

#### 1.- Tipificación clásica,<sup>1,4,16,40</sup>

a) Principio: La identificación de los grupos sanguíneos se da mediante la reacción entre antígenos y anticuerpos; que al formar el complejo inmune dan lugar a la hemaglutinación, siendo esta una reacción sencilla donde existen cuatro factores que pueden influir en el resultado de la reacción:



- = Fructosa
- = Galactosa
- = N-acetilgalactosamina
- = Glucosa
- = Espectrina
- = Proteína integral
- = Proteína
- = Ceramida
- = Bicapa lipídica

fig.2-1 Estructura química de los grupos sanguíneos A, B y H

- › Los eritrocitos
- › Suero hemotipificador
- › El medio
- › Condiciones físicas bajo las cuales tiene lugar la reacción

**b) Material:**

Cristalería: Pipeta dispensadora  
Placa de vidrio

Otros: Aplicadores de madera; papel secante

**Material biológico**  
Suero o sangre completa

**c) Reactivos o soluciones**

Sueros hemoclasificadores: anti-A; anti-B, anti-AB

**d) Procedimiento:**<sup>1,15</sup>

1. En una placa de vidrio se coloca en cada extremo de ella 0.05 ml de suero anti-A y anti-B; a cada uno de ellos agregarles 0.05 ml de sangre completa.
2. Con un aplicador de madera mezclarlos bien, posteriormente hacer rotar la placa por espacio de 2 minutos.
3. Leer inmediatamente al término de los 2 minutos

**e) Valores normales**

Grupo Sanguíneo	TIPIFICACION CLASICA	
	Suero hemotipificador	
	Anti-A	Anti-B
A	POSITIVO	NEGATIVO
B	NEGATIVO	POSITIVO
O	NEGATIVO	NEGATIVO
AB	POSITIVO	POSITIVO

**f) Interpretación de resultados**

Si presenta aglutinación se indica como prueba positiva  
Si no presenta aglutinación se indica como prueba negativa

**g) Cuidados en la determinación:**<sup>1,15,16,40</sup>

- ⇒ Las pruebas que no muestren aglutinación no deben observarse por más de 2 minutos
- ⇒ No interpretar como aglutinación el desecado de la periferia
- ⇒ Las muestras sanguíneas no deberán presentar hemólisis
- ⇒ Las placas deben estar perfectamente limpias
- ⇒ Utilizar las soluciones a las concentraciones indicadas, los reactivos deben estar a temperatura ambiente

**2.-Tipificación inversa**

**Principio:** Se basa en la identificación de los anticuerpos anti-A y anti-B presentes en el suero problema y que son capaces de reaccionar con eritrocitos conocidos del grupo sanguíneo A, B y O.

**b) Material**

Cristalería: Tubos de ensaye 13 x 100 mm  
Aparatos: Pipeta dispensadora  
Centrífuga

**Material biológico**  
Sangre completa  
Suero

**c) Reactivos y soluciones**

Anticoagulante EDTA al 5%  
Eritrocitos tipo A  
Eritrocitos tipo B

### 1) Procedimiento

En dos tubos pipetear los siguientes reactivos y rotularlos de la manera siguiente:

REACTIVO	TUBOS	
	1	2
Suero problema	0.05 ml	0.05 ml
Eritrocitos A	0.05 ml	
Eritrocitos B		0.05 ml

Incubar los tubos a temperatura ambiente durante 15 min.; centrifugar a 2000 r.p.m./ 1 minuto. y leer

### e) Valores normales

	TIPIFICACION INVERSA	
	TUBOS	
	1	2
SUERO PROBLEMA	Eritrocitos conocidos A	Eritrocitos conocidos B
A	NEGATIVO	POSITIVO
B	POSITIVO	NEGATIVO
O	POSITIVO	POSITIVO
AB	NEGATIVO	NEGATIVO

### d) Interpretación de resultados

Si hay aglutinación la prueba es positiva

Si no hay aglutinación la prueba es negativa

### g) Cuidados en la determinación:

- ⇒ Las muestras sanguíneas no deberán presentar hemólisis
- ⇒ Los tubos deben estar perfectamente limpios
- ⇒ Utilizar las soluciones a las concentraciones indicadas
- ⇒ Los reactivos deben estar a temperatura ambiente
- ⇒ Tener cuidado en la toma de muestra sanguínea, seguir el procedimiento expuesto con anterioridad

### 3.- Detección del factor Rho (antígeno Du)<sup>8,16,40</sup>

a) Principio: Esta prueba sirve para detectar antígenos D presentes o no en la superficie de los eritrocitos; este es un inmunógeno poderoso y por lo tanto responsable de más del 90% de las inmunizaciones que provocan la enfermedad hemolítica del recién nacido. Los anticuerpos contra los antígenos del sistema Rho, producidos en respuesta a la exposición previa a eritocitos dotados de antígenos no presentes en el individuo, pertenecen al grupo de las inmunoglobulinas G y se consideran como anticuerpos incompletos, tienen la capacidad de atravesar la barrera placentaria. iniciando por tanto la enfermedad.

### b) Material

Cristalería: Tubos de ensayo 13 x 100 mm

Placa de vidrio

Aparatos: Pipeta dispensadora

Centrifuga

Otros: Aplicadores de madera

Papel secante

**Material biológico**

Sangre completa

### c) Reactivos y soluciones

Solución salina fisiológica: NaCl 0.85 gr.  
H<sub>2</sub>O destilada 100.00 ml

Suero hemoclasificador: anti-D

Suero de Coombs

Albúmina sérica bovina al 22%

suspensión de eritrocitos al 5%

Se obtiene 3 ml de sangre por punción venosa con anticoagulante (EDTA 5%), mezclar bien.

Centrifugar a 2500 r.p.m. durante 5 minutos, separar el plasma y depositarlo en otro tubo de ensaye.

Adicionar solución salina fisiológica, tapar con papel parafilm y mezclar por inversión.

Centrifugar a 2500 r.p.m. durante 5 minutos, retirar el sobrenadante.

Repetir la operación dos veces más y en el último lavado retirar el sobrenadante.

Se toma 0.5 ml de paquete celular y se le adiciona 4.5 ml de solución salina fisiológica, mezclar bien. El paquete celular separado se le denomina "eritrocitos lavados".

### Procedimiento

Técnica en Placa de vidrio

En un extremo de la placa de vidrio colocar 0.05 ml de suero anti-D y en el otro extremo de la placa colocar 0.05 ml de albúmina bovina al 22% como control

Agregar 0.05 ml de suspensión de eritrocitos al 5.0% a las dos muestras, mezcla bien con un aplicador de madera.

Para leer la placa se toma y se rota para poder apreciar mejor el resultado.

Si la prueba es positiva se detecta el antígeno Du

Si la prueba es negativa se procede a la detección de antígeno Du por la técnica en tubo y Suero de Coombs

En la siguiente tabla se menciona el procedimiento de detección de antígeno Du por la técnica de tubo:

Detección del antígeno Du por la técnica de tubo		
Reactivo	TUBO	
	1	2
Suero anti-D	0.05 ml	
Albúmina bovina al 22%		0.05 ml
Suspensión de eritrocitos al 5%	0.05 ml	0.05 ml

Incubar los tubos a 37°C durante 15 minutos, observar si hay o no aglutinación, en caso de no presentarse la aglutinación se dispone a lavar los eritrocitos de cada tubo con solución salina fisiológica, decantando completamente después de cada lavado, proceder con la técnica de suero de Coombs para detectar el antígeno Du.

Reactivo	TUBO	
	1	2
Suspensión de eritrocitos al 5%		
Suero de Coombs	0.05 ml	0.05 ml

Centrifugar a 3500 r.p.m. durante 15 minutos y resuspender al paquete; proceder a leer los tubos buscando la aglutinación

### Interpretación de resultados

Si se presenta aglutinación se reporta como prueba positiva

Si no se presenta aglutinación se reporta como prueba negativa

### Cuidados en la determinación<sup>1,8,15,16,40</sup>

→ La reacción entre los eritrocitos y el antisuero-D da lugar a la formación de grumos o conglomerados muy finos, a veces difíciles de apreciar a simple vista. Para evitar la acción de las crioaglutininas, que pueden hallarse presentes en forma ocasional en algún suero, es preciso realizar la prueba en un ambiente cálido, cerca de una lámpara de mesa

→ Para evitar que se seque el suero es conveniente realizar las pruebas fuera de corrientes de aire.

**Nota:** La hemaglutinación puede ser inducida de dos modos:

1. Reduciendo la distancia entre los eritrocitos: El tratamiento de los eritrocitos con enzimas, como la neuraminidasa, tripsina, papaína, bromelina o ficina, los cuales reducen irreversiblemente el contenido de ácido siálico y disminuye los valores del potencial zeta. Las células tratadas así son fácilmente aglutinadas por los anticuerpos adecuados.
2. Proporcionando puentes entre dos anticuerpos cortos: El mecanismo de la albúmina en la reacción de ciertos anticuerpos es que se comporta como un condensador eléctrico y tiene sus cargas (+) que neutralizan las cargas (-) de los eritrocitos, los anticuerpos específicos cortos tienen entonces la oportunidad de ponerse en contacto con más de una célula y producir aglutinación específica.  
La centrifugación fuerza a los eritrocitos a acercarse más entre si facilitando la hemaglutinación.

## PRUEBAS CRUZADAS

En una transfusión la única sangre compatible al 100% es la de la propia persona que la recibe, o la procedente de un gemelo idéntico, llamándose a esta transfusión autóloga.

En caso contrario la tipificación ABO y Rho, debe realizarse con cada receptor antes de usar la sangre, conociendo de antemano el grupo sanguíneo del donador. Posteriormente se procederá a realizar el examen de compatibilidad a través de lo que conocemos como "pruebas cruzadas"; con la finalidad de detectar anticuerpos salinos y anticuerpos clase IgG determinando así la aceptación o rechazo de una transfusión.

### a) Principio:

La utilización de las pruebas cruzadas (prueba mayor y prueba menor), empleando ambas partes de la sangre (suero y paquete globular) con cada uno de los receptores y donadores, dará lugar a la reacción Antígeno-anticuerpo característica, manifestándose como aglutinación o hemólisis, en caso contrario la muestra permanecerá sin cambios.

### b) Material

Cristalería: Tubos de ensayo 13 x 100 mm

Pipeta Pasteur

Aparatos: Centrifuga

Agitador "vortex", baño de incubación

Termómetros, microscopio

### Material biológico

Sangre con anticoagulante

### c) Reactivos o soluciones

Solución salina fisiológica:

NaCl 0.85 gr.

H<sub>2</sub>O destilada 100.00 ml

Suero hemoclasificador: anti-D

Suero de Coombs

Albúmina sérica bovina al 22%

Suspensión de eritrocitos al 5%

**l) Procedimiento**

Extraer sangre por punción venosa, con anticoagulante EDTA al 5% proceder como sigue:

PASO 1			
PRUEBA MAYOR		PRUEBA MENOR	
medio proteínico	medio salino	medio proteínico	medio salino
0.1 µl de suero del receptor +	0.1 µl de suero del receptor +	0.1 µl de suero del donador +	0.1 µl de suero del donador +
0.1 µl de suspensión de eritrocitos al 5% del donador +	0.1 µl de suspensión de eritrocitos al 5% del donador	0.1 µl de suspensión de eritrocitos al 5% del receptor +	0.1 µl de suspensión de eritrocitos al 5% del receptor
0.1 µl de albúmina bovina al 22%		0.1 µl de albúmina bovina al 22%	
PASO 2			
Mezclar y centrifugar a 1000 r.p.m. durante un minuto, observar y anotar			
PASO 3			
Incubar a 37°C/15 min.	Dejar temperatura ambiente 15 min.	Incubar a 37°C/15 min.	Dejar a temperatura ambiente 15 min.
Centrifugar a 1000 r.p.m. durante 1 minuto; observar y anotar si la reacción continua siendo negativa (sin aglutinación se procede al paso 4)			
PASO 4			
Lavar 4 veces los eritrocitos con solución salina fisiológica centrifugando a 3500 r.p.m./ 3 min.			
PASO 5			
Después del último lavado se elimina el sobrenadante, y se resuspenden los eritrocitos en los últimos 0.1 µl de SSF, a cada uno de los tubos se le adiciona 0.1 µl de suero de Coombs.			
Centrifugar a 3500 r.p.m. durante 15 segundos; observar y anotar resultados			

**m) Valores normales**

- No aglutinación: En prueba mayor y prueba menor significa 100% de compatibilidad sanguínea (se transfunde paquete globular y plasma)
- Aglutinación: En prueba mayor significa el 75% de incompatibilidad (se transfunde plasma del donador)
- Aglutinación: En prueba menor significa el 25% de incompatibilidad (se transfunde paquete de donador)

**n) Interpretación de resultados:**

- Aglutinación en todos los tubos: Indica incompatibilidad AB (no se realiza transfusión)
- Aglutinación en el tubo con solución salina fisiológica a temperatura ambiente indica la presencia de anticuerpos en frío por ejemplo: aglutininas de infecciones víricas (una prueba de confirmación útil consiste en poner el tubo a 4°C y ver si la aglutinación aumenta; luego el tubo se pone a 37°C y la reacción debe de desaparecer).
- Aglutinación en los tubos de albúmina y de Coombs: se debe a un anticuerpo clase IgG en caliente la sangre debe considerarse incompatible.

**o) Cuidados en la determinación**

- ⇒ Material limpio, libre de grasa, detergentes o restos de algún otro reactivo en cristalería.
- ⇒ La temperatura de incubación deberá ser de 37°C estrictamente.
- ⇒ La preparación de soluciones debe ser a la concentración indicada para evitar la hemólisis.
- ⇒ Evitar trabajar con muestras hemolizadas.

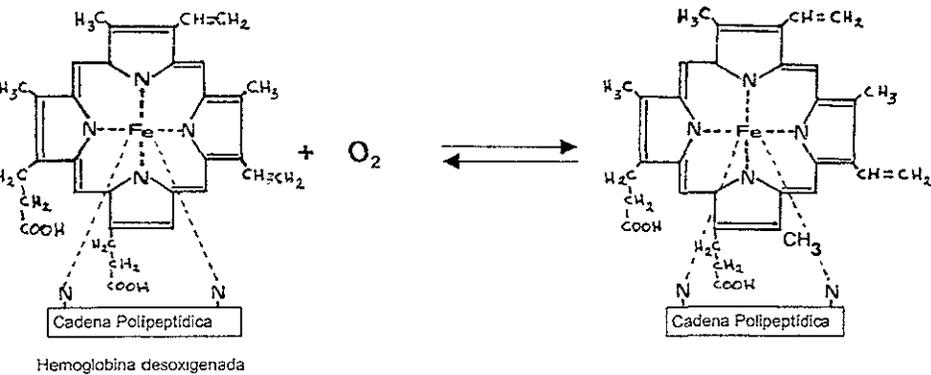
## BIOMETRIA HEMÁTICA (CITOMETRIA)

La biometría hemática (citometría) comprende una serie de estudios que permiten tener una visión bastante precisa del estado de todos los elementos formes de la sangre, que incluye concentración de hemoglobina, hematocrito, recuento de eritrocitos y leucocitos, recuento diferencial y conteo de reticulocitos; además de orientar en cuanto a la necesidad de nuevos estudios, los datos de la biometría completa son útiles por sí mismos.

Los datos señalados permiten detectar anemias, advertir su gravedad y comparar el estado de elementos específicos de la sangre.<sup>1,3,4</sup>

### DETERMINACION DE HEMOGLOBINA<sup>1,3,4,7,11</sup>

La hemoglobina es una proteína conjugada de peso molecular de 64,5450 daltons, que sirve de vehículo para transportar bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y oxígeno (O<sub>2</sub>), la cual está representada mediante la siguiente reacción:



La hemoglobina totalmente saturada contiene alrededor de 1.34 ml de oxígeno por gramo de hemoglobina; la masa de eritrocitos de un adulto contiene 600 g. de hemoglobina capaz de transportar 800 ml de oxígeno (O<sub>2</sub>).

La molécula de hemoglobina está constituida por cuatro cadenas o subunidades proteínicas (globinas); dos a las que se designa alfa (α) y dos a las que se nombra beta (β), las que se representan como (α)(β) y se abrevia como HbA; y cuatro grupos prostéticos hem que contienen cada uno un átomo de hierro ferroso.

En el adulto existen tres tipos de hemoglobina: la HbA que se considera como normal, otro componente secundario de la hemoglobina de adulto es la HbB la cual sus cadenas beta son sustituidas por cadenas delta (δ); otro tipo de hemoglobina presente es la hemoglobina fetal HbF, la cual se encuentra en pequeñas cantidades en adultos (es más abundante en la infancia), la cual tiene intercambiadas las dos cadenas beta (β) por cadenas gamma (γ).

### Principio

Se diluye sangre en solución de Drabkin; donde el ferricianuro de potasio oxida las hemoglobina a metahemoglobina y el cianuro de potasio proporciona los iones cianuro (CN<sup>-</sup>) para formar cianometahemoglobina; que tiene una absorción máxima a una longitud de onda de 540 nm.

**g) Material**

Cristalería: Tubos de ensaye de 12 x 75 mm

Pipeta de 5.0 ml (1/10)

Pipeta de Sahli con manguera de succión y boquilla

Aparatos: Espectrofotómetro con celdas

Otros: Algodón

Manguera látex como "ligadura"

**Material Biológico**

Sangre con anticoagulante

**h) Reactivos o soluciones**

Alcohol al 70%

Solución de Drabkin<sub>1,2,13</sub>

Ferriicianuro de potasio

KFe(CN)

200 mg

Cianuro de potasio

K (CN)

50 mg

Carbonato de sodio

NaHCO

1 gr.

Agua destilada c.b.p.

1000 ml

**i) Procedimiento (método de Dacie)<sub>1</sub>**

1. Obtener sangre por punción venosa con anticoagulante EDTA al 5%, mezclar bien por inversión sin agitación.

2. Con la pipeta de sahli tomar 0.02 ml y agregar al tubo que contiene 5 ml del reactivo de Drabkin (dilución 1:125), mezclar bien.

3. Mantener a temperatura ambiente durante al menos 3 minutos, al término de este tiempo leer en el espectrofotómetro a 540 nm frente al blanco de reactivos

Cálculos: Hb (g / dl) = (Abs problema) 36.8

**j) Valores de referencia**

Individuo	g. Hb / 100 ml	mmol Hb/ L
Hombres	14 - 18	8.7 - 11.2
Mujeres	12 - 16	7.5 - 10.0
Lactantes	10 - 15	6.2 - 9.3
Niños	12 - 16	7.5 - 10.0

**k) Interpretación de resultados**

AUMENTO	DISMINUCIÓN
Hemoconcentración por policitemia o deshidratación	Anemia
	Hemorragia reciente
	Retención de líquidos

**l) Cuidados en la determinación**

⇒ Se debe tener cuidado con el KCN en la preparación de la solución de Drabkin ya que las soluciones de cianuro son venenosas.

⇒ Es conveniente calibrar el espectrofotómetro al utilizarse para la determinación de cianometahemoglobina preparando una curva estándar o una tabla que relacione a la concentración de Hb en g./dl.

⇒ No hemolizar la sangre ya que esto interfiere con la determinación.

**2.- DETERMINACION DE HEMATOCRITO (HCTO)<sub>1,3,4,14</sub>**

El valor del hematocrito es una cuantificación de uso frecuente y de carácter fidedigno que se practica junto con los estudios de Hb y recuento eritrocítico, para calcular los índices eritrocíticos.

El hematocrito de una muestra de sangre es la relación del volumen de eritrocitos con el de la sangre total; y se expresa como un porcentaje (%).

### a) Principio

Al centrifugar la sangre entera con anticoagulante en un tubo capilar (microhematocrito) los eritrocitos se sedimentan y el plasma queda como sobrenadante sin hemólisis y el resultado se expresa como el porcentaje total de los glóbulos rojos.

### b) Material

Cristalería: Tubo capilar de 7 mm de longitud  
Aparatos: Microcentrífuga para hematocrito  
Otros: Mechero Fisher o Bunsen  
Algodón, papel secante

**Material Biológico**  
Sangre con anticoagulante  
(EDTA o heparina)

### c) Reactivos o soluciones

Anticoagulantes: EDTA: 0.1 ml de solución acuosa al 5 % por 5.0 ml de sangre  
Heparina: 0.1 a 0.2 mg heparina por ml de sangre.

### d) Procedimiento

1. Obtener sangre por punción venosa con anticoagulante por cualquiera de los dos métodos ya sea por el método de jeringa o bien por el método del vacutainer, mezclar bien la sangre con el anticoagulante
2. Con el tubo capilar se recoge por capilaridad la sangre del tubo que contiene la sangre anticoagulada hasta aproximadamente las  $\frac{3}{4}$  partes de su capacidad.
3. Limpiar bien la sangre que se haya quedado sobre el capilar, cerrar por la parte contraria al llenado del tubo capilar con fuego con el mechero.
4. El tubo capilar se coloca en uno de los canales de la placa de la microcentrífuga, (con la parte sellada hacia afuera) proceder a centrifugar a 10,000 r.p.m. durante 5 minutos.
5. Una vez que se haya terminado de centrifugar, retirar el tubo capilar de las ranuras de la centrifuga y proceder a leer en el lector de hematocrito

e) Valores de referencia: Hombres: 40 a 54 %  
Mujeres: 37 a 47%

### f) Interpretación de resultados

Aumentado	Disminuido
<ul style="list-style-type: none"><li>• Poliglobulia genuina o policitemia primitiva idiopática (policitemia vera).</li><li>• Policitemias sintomáticas.</li><li>• Intoxicación con producción de metaHb: después de ingestión de algunas sustancias químicas o medicamentosas.</li><li>• Enfermedades renales.</li></ul>	Anemias de distinto origen.

### g) Cuidados en la determinación

- ⇒ Si el tubo de hematocrito es sellado en forma incompleta el resultado será erróneo y anormalmente bajo ya que al girar los tubos en la centrifuga se produce una pérdida de hematíes que es mayor que la pérdida de plasma.
- ⇒ Verificar que no se coloque la parte no sellada hacia afuera, ya que al girar se sale toda la muestra.
- ⇒ La presencia de burbujas de aire en el tubo capilar no afecta el resultado, pero denota una técnica muy deficiente.

## 3.- DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE SEDIMENTACION GLOBULAR (VSG)<sub>3,4,40</sub>

Esta sencilla prueba es empleada universalmente como índice de la presencia de enfermedades activas de muchas clases, la prueba depende del hecho de que en la sangre (a la que se ha añadido anticoagulante), los glóbulos rojos sedimentan hasta formar una columna compacta en la parte inferior del tubo; la velocidad de este proceso depende de

varios factores, siendo las principales: el volumen de los eritrocitos, el área de superficie y su densidad, la agregación y las cargas de la superficie.

#### 1) Principio

Cuando se coloca sangre venosa bien mezclada en un tubo vertical, los eritrocitos tenderán a caer hacia la parte inferior. La velocidad de sedimentación globular (VSG) es equivalente a la longitud recorrida descendente de la parte superior de la columna de eritrocitos en un intervalo determinado de tiempo y varios factores contribuyen a este valor.

#### 2) Material

Cristalería: Tubos de Wintrobe de 3 mm de diámetro con dos escalas:

Izquierda: 0 - 10 descendente VSG

Derecha: 10 - 0 ascendente Hcto

Pipetas Pasteur

Otros: Perillas de succión o propipetas

Gradilla de eritrosedimentación y Reloj de intervalos

#### Material Biológico

Sangre con anticoagulante

(EDTA, Heparina, Citrato)

#### 3) Reactivos o soluciones

Citratos: se utiliza la sal disódica, la solución al 3.8% (p/v) es isotónica y se emplea en proporción de una parte de solución de citrato y cuatro partes de sangre para la VSG de Westergren.

EDTA

Heparina

#### 4) Procedimiento

1. Se emplea sangre con anticoagulante (se recomienda EDTA en lugar de citrato), se debe mezclar bien y a temperatura ambiente.

2. Con la pipeta Pasteur se procede a llenar con mucho cuidado el tubo de Wintrobe, procurando que no se formen burbujas de aire, hasta la marca de cero.

3. Una vez lleno colocarlo en la gradilla de eritrosedimentación, ajustando el nivel de la gradilla para que quede en la posición vertical adecuada, dejar por espacio de 60 minutos el tubo para que se efectúe la eritrosedimentación.

4. Al término de este tiempo, anotar el nivel de la columna eritrocítica, reportando el resultado como la velocidad de sedimentación globular expresado en mm/hr.

#### 5) Valores de referencia

	1 hr.	2 hrs
Hombres	3 a 8 mm	6 a 20 mm
Mujeres	3 a 10 mm	6 a 20 mm

#### 6) Interpretación de resultados

AUMENTADOS	DISMINUIDOS
• Estados inflamatorios.	• Poliglobulia sintomática.
• Enfermedades infecciosas.	• Policitemia vera.
• Tuberculosis.	• Alergias.
• Enfermedades reumáticas.	• Anemia Hemolítica.
• Ataques de gota.	• Insuficiencia cardíaca congestiva.

#### 7) Cuidados en la determinación

⇒ Si la concentración de anticoagulante es muy elevada la VSG estará disminuída, los cambios bruscos de temperatura darán valores de VSG aumentados o disminuídos respectivamente.

⇒ La presencia de burbujas en el tubo con sangre dará resultados erróneos.

⇒ La determinación de la VSG debe efectuarse en el transcurso de las 2 hrs que siguen a la extracción de sangre.

→ Si utiliza EDTA como anticoagulante este lapso puede prolongarse hasta 12 hrs a condición de que la sangre se encuentre refrigerada.

## - DETERMINACIÓN DE CÉLULAS HEMÁTICAS

Los recuentos de eritrocitos, leucocitos y plaquetas se expresan cada uno como concentración (células por unidad de volumen de sangre). La unidad de volumen para los recuentos celulares se expresó originalmente como milímetros cúbicos ( $\text{mm}^3$ ) debido a las dimensiones lineales de la cámara hemocitométrica. El Comité Internacional de Standardización en hematología recomienda que la unidad de volumen sea el litro (L). Para el recuento de plaquetas y el recuento bajo de leucocitos aún está establecida esta técnica, pero ya no para el recuento sistemático de eritrocitos en ningún laboratorio salvo los más pequeños, sin embargo, todavía el laboratorista técnico requiere estar capacitado para emplear esta técnica con eficacia y de conocer sus limitaciones.

### 1. CONTEO DE ERITROCITOS<sup>1,4,5,40</sup>

El recuento se realiza por dispositivo manual del hemocitómetro, pero en la actualidad se hace con dispositivos electrónicos que permiten obtener resultados más exactos y rápidos.

#### 1) Principio

La sangre se diluye en una porción exacta con el líquido diluyente de Hayem para cuantificar el número de eritrocitos en un  $\text{mm}^3$  ( $\mu\text{l}$ ) de sangre entera.

#### 2) Material

Cristalería: Pipeta de Thoma para recuento de eritrocitos

Caja de petri

Otros: Manguera de succión con boquilla

Algodón, papel secante

Apósitos: Cámara de Neubauer (Hemocitómetro)

Microscopio

Material Biológico

Sangre con anticoagulante  
(EDTA)

#### 3) Reactivos o soluciones

Líquido diluyente: Solución de Hayem:	Sulfato de sodio	2.50	gr.
	Cloruro de sodio	0.50	gr.
	Cloruro de mercurio	0.25	gr.
	Agua destilada c.b.p.	100.00	ml.

#### 4) Procedimiento

- Obtener sangre por punción venosa con anticoagulante, con la pipeta de Thoma se aspira sangre exactamente hasta la marca de 0.5, si hay exceso de sangre se limpia la pipeta con un pedazo de papel secante.
- Con la pipeta inclinada  $45^\circ$ , se gira mientras se va llenando con el líquido diluyente hasta la marca de 101 (dilución de 1:200)
- Tapando con papel parafilm el extremo inferior de la pipeta, se retira cuidadosamente el sistema de aspiración.
- Se toma la pipeta entre los dedos pulgar y medio, agitando durante 3 minutos. o en agitador para pipetas.
- Para llenar la cámara de conteo (cámara de Neubauer), desechar las primeras cuatro gotas sobre un pedazo de papel secante, después poner la punta de la pipeta entre el cubreobjetos y la cámara cuidando que no se derrame a los canales y a su vez que quede bien cubierta la superficie.
- Dejar reposar durante tres minutos en cámara húmeda para que sedimenten los eritrocitos.
- Colocar la cámara de Neubauer en la platina del microscopio y con el objetivo 10x localizar la cuadrícula central y con el objetivo 40 X se cuentan los eritrocitos en 5/25 cuadros centrales (ver figura 3-1).

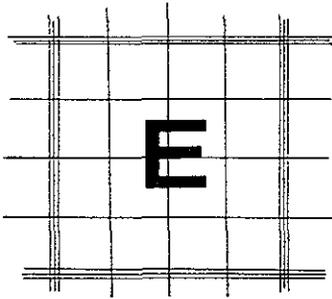
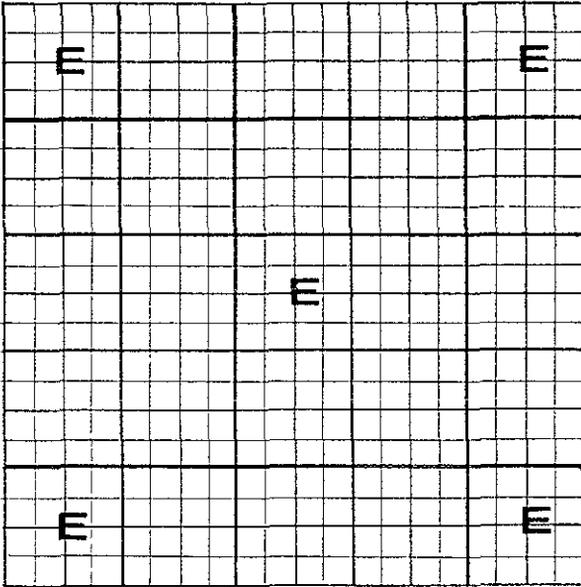


Fig.3-1 Cuadrícula de Neubauer (para glóbulos rojos) en donde E = cuadros para conteo de eritrocitos y plaquetas (el cuadro pequeño es la representación de uno de los cinco cuadros para el conteo).

## Cálculos de cifras de hematíes

$$\text{Hematíes / mm}^3 = \text{N}^\circ \text{ de Células contadas} \times \text{corrección debida al volumen} \times \text{corrección debida a la dilución}$$

5 cuadros secundarios

### e) Valores de referencia

	Eritrocitos / mm <sup>3</sup> x 10 <sup>6</sup>
Hombres	4.0 - 6.2
Mujeres	4.0 - 5.5

### f) Interpretación de resultados

Valores aumentados	Valores disminuidos
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Policitemia primaria</li> <li>• Policitemia secundaria</li> <li>• Deshidratación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemias</li> <li>• Sobrecarga de líquidos</li> <li>• Hemorragia reciente</li> </ul>

### g) Cuidados en la determinación

- ⇒ El líquido diluyente no debe contener restos de sangre u otros factores que puedan determinarlo.
- ⇒ Tanto las pipetas de Thoma, como la cámara de Neubauer y el cubreobjetos deben estar escrupulosamente limpios.
- ⇒ El líquido de Hayem en algunos estados patológicos tienden a formar pilas de "monedas" y la agregación de los hematíes.

## 4.2. CONTEO DE LEUCOCITOS (Fórmula blanca)<sup>1,3,4,5,40</sup>

El recuento se realiza por dispositivo manual del hemocitómetro, pero en la actualidad se hace con dispositivos electrónicos que permiten obtener resultados más exactos y rápidos.

### a) Principio

La técnica consiste en diluir la sangre en una porción exacta con el líquido diluyente de Turk, el cual lisa los eritrocitos dejando las estructuras de la fórmula blanca, con esto podemos cuantificar el número de leucocitos por milímetro cúbico de sangre completa.

### b) Material

Cristalería: Pipeta de Thoma para recuento de leucocitos

Caja de petri

Otros: Manguera de succión con boquilla

Algodón, papel secante

Aparatos: Cámara de Neubauer (Hemocitómetro)

Microscopio

#### Material Biológico

Sangre con anticoagulante (EDTA)

### c) Reactivos o soluciones

Líquido diluyente de Turk:	Ácido acético glacial	3 ml
	Violeta de genciana acuosa al 1% (p/v)	1 ml
	Agua destilada c.b.p.	100 ml

### d) Procedimiento

1. Obtener sangre por punción venosa con anticoagulante, con la pipeta de Thoma se aspira sangre exactamente hasta la marca de 0.5, si hay exceso de sangre se limpia la pipeta con un pedazo de papel secante.
2. Con la pipeta inclinada 45°, se gira mientras se va llenando con el líquido diluyente hasta la marca de 11 (dilución de 1:20)
3. Tapando con papel parafilm el extremo inferior de la pipeta, se retira cuidadosamente el sistema de aspiración.
4. Se toma la pipeta entre los dedos pulgar y medio, agitando durante 3 minutos, o en agitador para pipetas.

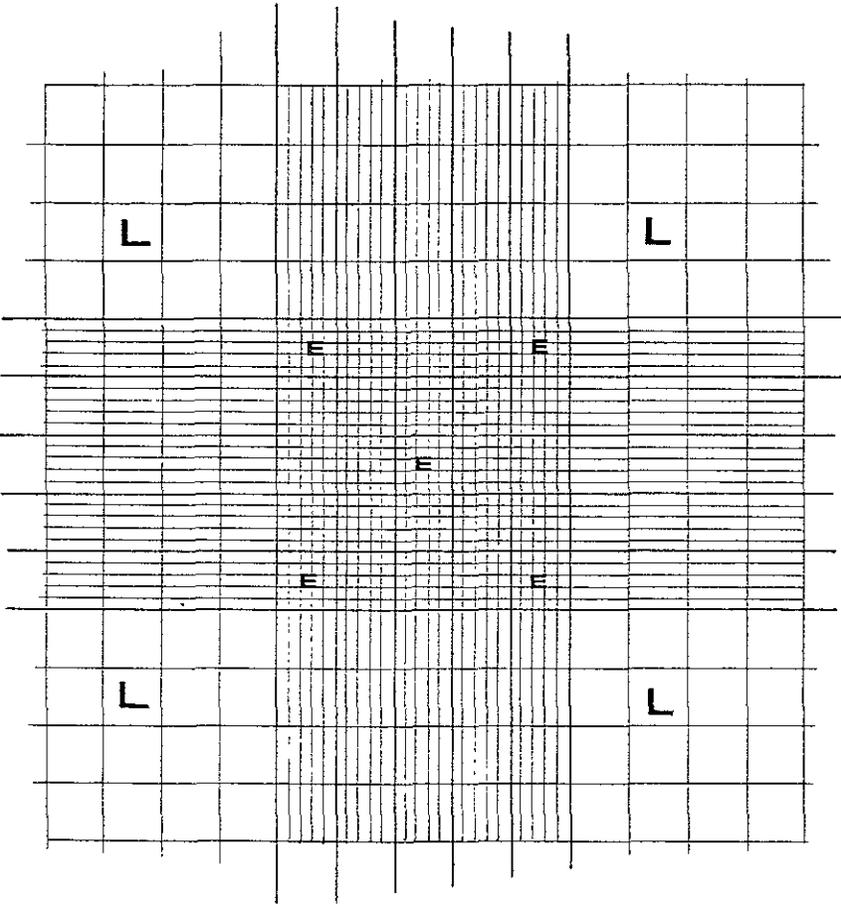


Fig.3-2 Cuadrícula de Neubauer (para glóbulos blancos) en donde E = cuadros para conteo de eritrocitos y plaquetas y L = es la cuadrícula para conteo de leucocitos.

5. Para llenar la cámara de conteo (cámara de Neubauer), desechar las primeras cuatro gotas sobre un pedazo de papel secante, después poner la punta de la pipeta entre el cubreobjetos y la cámara cuidando que no se derrame a los canales y a su vez que quede bien cubierta la superficie.
6. Dejar reposar durante tres minutos en cámara húmeda para que sedimenten los leucocitos.
7. Colocar la cámara de Neubauer en la platina del microscopio y con el objetivo 10x localizar la cuadrícula central y con el objetivo 40x se cuentan los leucocitos en las cuatro cuadrículas grandes de los extremos (ver figura 3-2).

Cálculo del recuento de leucocitos

$$\text{Leucocitos / mm}^3 = \frac{\text{No. de leucocitos contados}}{\text{corrección de volumen}} \times \frac{\text{corrección de dilución}}{1}$$

$$\begin{aligned} \text{No. de leucocitos contados} &= \text{cuadro 1} = N^{\circ} X \\ &\quad \text{cuadro 2} = N^{\circ} X \\ &\quad \text{cuadro 3} = N^{\circ} X \\ &\quad \text{cuadro 4} = N^{\circ} X \\ \Sigma \text{ cuadro} &= \Sigma N^{\circ} X \end{aligned}$$

Corrección de volumen: el recuento de leucocitos representa el N° de células en 0.1 mm<sup>3</sup> de sangre

Factor de corrección: 4 cuadros = 0.4 mm<sup>3</sup>; 1.0 mm<sup>3</sup> / 0.4 mm<sup>3</sup> = 2.5

Corrección de dilución: (1:20) el factor de dilución es 20

Tomamos como constante los dos factores tenemos un solo factor que es: (2.5)(20)=50

#### b) Valores de referencia

	N° de células por milímetro cúbico (mm <sup>3</sup> )
HOMBRES	5000 - 10000
MUJERES	5000 - 10000

#### c) Interpretación de resultados

Leucopenias	Linfopenias
Depresión de médula ósea dada por infecciones virales o reacciones tóxicas como las que aparecen después de tratamientos con antineoplásicos, ingestión de mercurio u otros metales pesados: exposición al benceno o arsenicales. Es característica en la influenza, fiebre tifoidea, sarampión, hepatitis infecciosa, mononucleosis y rubéola.	Infecciones bacterianas, meningitis, leucemia y necrosis tisular por quemaduras, infarto agudo al miocardio o gangrena.

#### d) Cuidados en la determinación

- ⇒ Es importante evitar la contaminación del líquido diluyente con sangre ya que la presencia de pequeñas cantidades de sangre de ella en este líquido puede afectar la precisión del recuento y hacer difícil la diferenciación de los leucocitos.
- ⇒ Las pipetas deben mantenerse limpias y sin restos de sangre, no dejar nunca sangre sin diluir en una pipeta ya que se endurece rápidamente y obstruye los conductos.
- ⇒ El recuento debe efectuarse inmediatamente después de haber llenado la cámara, si transcurre demasiado tiempo entre estas dos operaciones el líquido de la cámara puede comenzar a evaporarse, con lo que los resultados no serán correctos.

## 5.- DETERMINACIÓN MORFOLÓGICA DE LA SANGRE (FROTIS SANGUÍNEO)<sup>1,3,4,5,14,40</sup>

El examen de la extensión de sangre es una parte importante de la evaluación hematológica. La fiabilidad de la información obtenida depende en gran parte de lo bien hechas que estén las extensiones, las cuales son sistemáticamente examinadas. La extensión de sangre una vez preparada se tiñe con colorante de Wright que permite establecer la fórmula leucocitaria y estudiar la morfología de las células hemáticas.

### a) Principio

El frotis sanguíneo consiste en hacer una extensión de sangre completa sobre un portaobjetos realizándole una tinción con colorantes usados en los estudios de la sangre, siendo los más usados de dos tipos generales: los básicos, como el azul de metileno y los ácidos como la eosina. Los núcleos y algunas otras estructuras de las células sanguíneas se tiñen con los colorantes básicos y se denominan basófilos, las estructuras celulares que se tiñen con los colorantes ácidos se denominan acidófilas (eosinófilas), las estructuras de las células sanguíneas que se tiñen por una combinación de ambos colorantes se denominan neutrófilas.

### b) Material

Cristalería: Portaobjetos con bordes lisos  
Capilar de 7 cm de longitud  
Pipeta Pasteur

Aparatos: Microscopio  
Contador para células

Otros: Charola para tinción  
Pinzas para portaobjetos  
Algodón

**Material biológico**  
Sangre con anticoagulante  
(EDTA, Heparina)

### c) Reactivos o soluciones

Colorante de Wright: solución de eosina y una mezcla compleja de tiacina, que incluyen el azul de metileno (normalmente del 50 al 70%) en etanol.

Solución amortiguadora de fosfatos: de pH 6.4:

fosfato de potasio monobásico anhidro ( $K_2HPO_4$ )	= 6.63 gr.
fosfato de sodio dibásico anhidro ( $Na_2HPO_4$ )	= 2.56 gr.
Agua destilada	= 1000 ml.

### d) Procedimiento

1. Colocar una gota de sangre homogeneizada en el portaobjetos
2. Con otro portaobjetos de borde liso hacer un ángulo de  $45^\circ$  y recorrerlo hasta que el borde toque la gota y dejar que por capilaridad se extienda a lo largo del borde (ver figura 3-3)
3. Con un movimiento suave hacer la extensión de sangre lo más delgada que se pueda (ver figura 3-4)

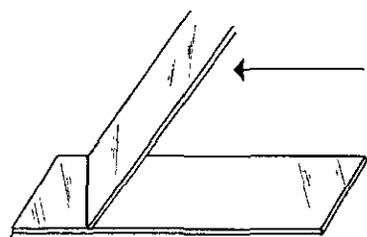


Fig.3-4

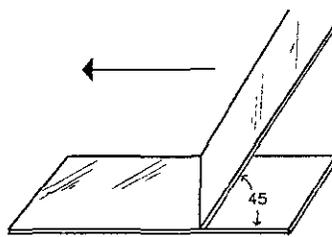


Fig. 3-3

- k. Dejar que seque al aire rápidamente para evitar ruptura de células.
- l. Cubrir la extensión con el colorante de Wright y dejar reposar durante 4 minutos
- m. Sin extraer el colorante añadir sobre el portaobjetos un volumen igual de solución amortiguadora de fosfatos, haciendo que se mezclen bien las dos soluciones sobre el portaobjetos y dejar reposar durante 7 minutos.
- n. Lavar con abundante agua, limpiar el dorso del portaobjetos con un pedazo de papel secante y dejar que seque.
- o. Observar al microscopio (ver figura 3-5 del movimiento del campo para determinar la fórmula leucocitaria y esquema de las porciones que pueden diferenciarse en una extensión de sangre) con objetivo de inmersión (100X).

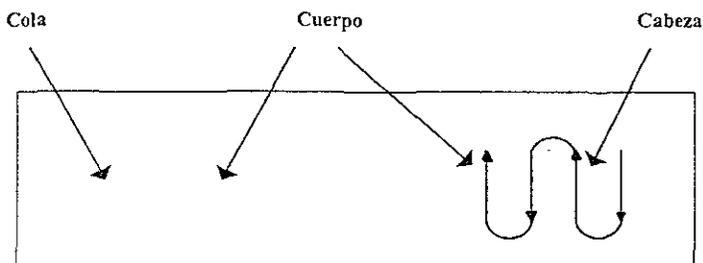


Fig. 3-5 Partes que componen la extensión de sangre y movimiento del campo.

e) Valores de referencia

CELULAS	ADULTOS (%)	NINOS (DE 6 A 18 AÑOS)	
		Niños (%)	Niñas (%)
Neutrófilos	47.6 - 78.8	38.5 - 71.5	41.9 - 76.5
Linfocitos	16.2 - 43.0	19.4 - 51.4	16.3 - 46.7
Monocitos	0.6 - 9.6	1.1 - 11.6	0.9 - 9.9
Eosinófilos	0.3 - 7.0	1.0 - 8.1	0.8 - 8.3
Basófilos	0.3 - 2.0	0.25 - 1.3	0.3 - 1.4
Valor relativo			

f) Interpretación de resultados

Célula	Aumento	Disminución
Neutrófilo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecciones.</li> <li>• Necrosis.</li> <li>• Isquemia por infarto del miocardio.</li> <li>• Quemaduras y carcinoma.</li> <li>• Trastornos metabólicos.</li> <li>• Respuesta al estrés.</li> <li>• Enfermedades inflamatorias.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Depresión de la médula ósea por radiación o por citotóxicos.</li> <li>• Infecciones.</li> <li>• Hiperesplenismo.</li> <li>• Lupus eritematoso sistémico.</li> <li>• Deficiencia de ácido fólico.</li> </ul>
Eosinófilo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trastornos alérgicos.</li> <li>• Parasitosis.</li> <li>• Dermatitis.</li> <li>• Enfermedades neoplásicas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estrés por traumatismo.</li> <li>• Quemaduras.</li> <li>• Cirugía o alteraciones mentales.</li> <li>• Síndrome de Cushing.</li> </ul>
Basófilo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucemia mielocítica crónica.</li> <li>• Policitemia vera.</li> <li>• enfermedad de Hodgkin.</li> <li>• Mastocitosis sistémica.</li> <li>• Mixidema.</li> <li>• Colitis ulcerosa, nefrosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipertiroidismo,</li> <li>• Ovulación</li> <li>• Embarazo</li> <li>• Estrés</li> </ul>
Linfocitos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecciones</li> <li>• Leucemia linfocítica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedades debilitantes graves como:  Insuficiencia cardiaca congestiva;  Insuficiencia renal y tuberculosis avanzada.  Defectos de circulación linfática.  Niveles elevados de corticoides suprarrenales.  Inmunodeficiencia por inmunosupresión.</li> </ul>
Monocitos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecciones.</li> <li>• Endocarditis bacteriana subaguda.</li> <li>• Tuberculosis. Hepatitis.</li> <li>• Paludismo.</li> <li>• Enfermedades vasculares.</li> <li>• Lupus eritematoso sistémico.</li> <li>• Artritis reumatoide.</li> <li>• poliartritis nodosa.</li> <li>• Carcinomas.</li> <li>• Leucemia monocítica.</li> <li>• Linfomas.</li> </ul>	<p>No hay reportes</p>

La información dada por la tinción con respecto a los eritrocitos se da a continuación en la tabla 3-1

Tabla 3-1. Manifestación de tinción con respecto a los eritrocitos	
Término	Manifestación
Hipocromía	Disminución del contenido de hemoglobina (provoca atenuación de la coloración de los hematíes).
Hipercromía	Exceso del contenido de hemoglobina (provoca incremento de la coloración de los hematíes).
Anisocromía	Los hematíes se tiñen en forma desigual
Microcitos	Son hematíes con diámetro inferior a 5 $\mu\text{m}$
Macroцитos	Son hematíes con diámetro de 10 a 12 $\mu\text{m}$
Megalocitos	Son hematíes con diámetro de 12 a 16 $\mu\text{m}$
Gigantocitos	Son hematíes con diámetro mayor de 16 $\mu\text{m}$
Anisocitosis	Gran variación de tamaño entre células rojas
Poiquilocitosis	Cuando las variaciones son de forma muy acentuadas.

Algunos hematíes pueden conservar aún una débil afinidad por los colorantes básicos, por lo que en los preparados se tiñen de rosa azulado o violáceo. Esta propiedad se denomina policromatofilia y se considera signo de regeneración:

1. **Punteado basófilo:** Provocado por intoxicación plúmbica, saturnismo, arsénico, anilina, benzol, oro, fenilhidrazina, cloruro de mercurio, zinc, yoduro de potasio.
2. **Corpúsculos de Howel-Jolly:** Esplenectomizados, atrofia del bazo, anemia hemolítica, anemia megaloblástica y a veces en leucemia.
3. **Anillos de Cabot:** Intoxicación plúmbica, anemia perniciosa y leucemia.
4. **Cuerpos azules de heintz:** Intoxicación provocada por sustancias que producen hemólisis o forman metahemoglobina.

#### g) Cuidados en la determinación

- ⇒ Los portaobjetos deben estar escrupulosamente limpios.
- ⇒ La extensión debe efectuarse tan pronto como la gota de sangre se deposite sobre el portaobjetos ya que si se deja más tiempo la distribución de los leucocitos en la extensión no será uniforme, también se pueden formar "pilas de monedas" de los hematíes y agregación de las plaquetas.
- ⇒ El tamaño de la gota de sangre en el portaobjetos es muy importante no debe ser ni muy grande ni muy pequeña.
- ⇒ El movimiento de empuje del portaobjetos en forma indecisa o irregular no dará una extensión muy buena.
- ⇒ Los tiempos de tinción de sangre periférica puede variar de un laboratorio a otro, cuando se comience una nueva botella de colorante de Wright es conveniente modificar los tiempos de tinción.
- ⇒ La charola de tinción y su soporte debe estar situado sobre una superficie horizontal para facilitar la distribución más uniforme del colorante sobre el portaobjetos.
- ⇒ Un mal lavado del portaobjetos para eliminar la mezcla del colorante y la solución amortiguadora causará precipitados en la extensión.

#### 5.-DETERMINACION DE RETICULOCITOS (CONTEO DE RETICULOCITOS)<sup>4,5,40</sup>

Los reticulocitos son eritrocitos inmaduros que permanecen en la sangre periférica durante 24 a 48 hrs, en tanto maduren; por lo regular son más grandes que los eritrocitos maduros y contienen ribosomas, centriolo, partículas de vesículas de golgi y mitocondrias, que producen hemoglobina.

El recuento de reticulocitos es un instrumento de diagnóstico muy importante, ya que su número refleja de forma relativamente precisa la cantidad de hematíes

producidos por la médula ósea. Dado que el ciclo vital de un hematíe es de 120 días, la médula reemplaza todos los días aproximadamente 1% de los hematíes maduros. Los reticulocitos contienen restos de eritroblastos (precursores) que absorben el colorante de Wright y lo de tipo supravital como los colorantes de azul de metileno o azul de cresilo brillante, razón por la cuál pueden ser diferenciados de otras células hemáticas en un frotis de sangre periférica.

#### a) Principio

Después de que el eritroblasto ortocrómico pierde su núcleo, una pequeña cantidad de RNA permanece en el hematíe y la célula se denomina entonces reticulocito. Para localizar la presencia de este RNA, los hematíes deben ser teñidos in vivo. Este proceso se denomina tinción supravital, después de haber teñido las células con azul de cresilo brillante, se determina la cifra de reticulocitos por cada 1000 hematíes. Este número se divide por 10 para obtener el recuento de reticulocitos en porcentaje.

#### b) Material

Cristalería: Portaobjetos

Capilares de 7 cm de largo

Tubo de ensaye

Aparatos: Microscopio

#### Material biológico

Sangre completa con anticoagulante (EDTA o heparina)

#### c) Reactivos o soluciones

Solución de azul de cresilo brillante: Azul de cresilo brillante 1.0 gr.  
 Cloruro de sodio 0.85% (p/v) 99.0 ml  
 filtrar antes de usar

#### d) Procedimiento

1. Se obtiene sangre por punción venosa con anticoagulante, mezclar bien.
2. En un tubo de ensaye limpio y seco se colocan 0.15 ml de colorante para reticulocitos filtrado, se añade 0.15 ml de sangre, se mezclan perfectamente, dejando en reposo 15 minutos.
3. Con un tubo capilar se toma una pequeña cantidad de la mezcla y se coloca una gota sobre un portaobjetos seco y desengrasado.
4. Con otro portaobjetos de bordes lisos se realiza una extensión de la mezcla, dejar secar.
5. Observar al microscopio con el objetivo de inmersión 100x, diez campos contando 100 hematíes por cada reticulocito) ver la figura 3-6 para el movimiento del campo.

#### Cálculo de la cifra de reticulocitos

% de reticulocitos = No. de reticulocitos X 1000 hematíes / 10

e) Valores de referencia: de 0.5% a 1% de reticulocitos por cada 100 hematíes

#### f) Interpretación de resultados

AUMENTO	DISMINUCION
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia megaloblástica</li> <li>• Patología de la médula ósea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia hemolítica</li> <li>• Anemia ferropénica</li> <li>• Hemorragias agudas</li> <li>• Hemorragias crónicas</li> </ul>

#### g) Cuidados en la determinación

- ⇒ No es preciso que la proporción entre sangre y colorante sea constante.
- ⇒ El tiempo de tinción no está establecido de forma rígida, aunque jamás debe ser inferior a 10 minutos.
- ⇒ Es importante realizar una buena mezcla entre sangre y colorante antes de realizar las extensiones ya que los reticulocitos poseen una gravedad específica menor que la de los hematíes maduros por lo que tienden a sedimentar sobre los últimos en la mezcla.

⇒ El azul de metileno es el colorante de elección sobre el azul de cresilo brillante debido a que las propiedades de tinción de este último son algo variables.



Fig. 3-6 Movimiento del campo para recuento de reticulocitos.

## PRUEBAS DE TENDENCIA HEMORRÁGICA (HEMOSTASIA)

La hemostasia es el proceso por el cual el aparato circulatorio se protege de la pérdida excesiva de sangre en dicho proceso la lesión de los vasos desencadena una serie completa de fenómenos como son:

- 1) Vasoconstricción (respuesta primaria)
- 2) Agregación plaquetaria
- 3) Coagulación

Donde estos eventos conducen a la formación del coágulo (trombo) que inhibe la hemorragia sin entorpecer la corriente de sangre por el vaso lesionado.

La inhibición de la hemorragia depende principalmente de la agregación plaquetaria y de la polimerización de fibrina. En la formación de este coágulo interviene la interacción secuencial de una serie de proteínas plasmáticas que se realiza en forma ordenada y compleja, estas proteínas plasmáticas se denominan factores de coagulación y son designados por números romanos (estos no indican la posición del factor en la secuencia de reacciones que llevan a la formación del trombo, en la Tabla 4-1 se numeran los factores de coagulación su lugar de probable síntesis así como su perfil.) 1,4,18,40

**TABLA 4-1 FACTORES DE COAGULACIÓN**

FACTOR	SINÓNIMO	LUGAR PROBABLE DE SÍNTESIS	PERFIL
I	Fibrinógeno	Hígado	Precursor de fibrina
II	Protrombina	Hígado	Precursor de Trombina
III	Tromboplastina	Tejido	Activador de protrombina
IV	Iones calcio	Alimentos	Activador de protrombina y formación de fibrina
V	Proacelerina (factor lábil)	Hígado	Acclera la conversión de protrombina en trombina
VI	No asignado		
VII	Proconvertina (Protrombina sérica, o factor estable, o autoprotrombina)	Hígado	Acclera la conversión de protrombina en trombina
VIII	Factor hemofílico A (Cofactor plaquetario I, o factor Von Willebrand)	Sistema fagocítico mononuclear	Facilita la formación de tromboplastina plasmática y la conversión de protrombina en trombina
IX	Factor hemofílico B (Autoprotrombina II o factor Christmas).	Hígado	Activado por Factor XI esencial en la formación de tromboplastina
X	Autoprotrombina II (Factor Stuart-Power).	Hígado	Dependiente de vitamina K, desencadena la conversión de protrombina
XI	Factor hemofílico C (Antecedente plasmático de tromboplastina).	Hígado	Activado por Factor XII, relacionado con Factor IX y VIII en la formación de tromboplastina plasmática
XII	Factor de contacto (Factor Hageman).	Desconocido	Primer factor activado de vía intrínseca, activa Factor XI.
XIII	Factor estabilizador de fibrina (Factor Lakilorand)	Desconocido	Produce un coágulo de fibrina más compacto
OTROS FACTORES SIN ASIGNACIÓN DE NUMERO ROMANO			
Precalcicreina	Factor Fletcher	Desconocido	Dirige mayor activación de factor XII
Protrombina de elevado peso molecular	Factor Fitzgerald	Desconocido	Cofactor requerido para la plena activación del Factor XII por contacto.

La coagulación se percibe como una secuencia de reacciones estrechamente acopladas en las cuales los factores de coagulación que circulan como precursores enzimáticos inactivados se convierten en enzimas activas, actuando cada factor primero como sustrato y después como enzima.<sup>18</sup>

En la figura 4-1 se observa que la “cascada de coagulación” se activa por dos sistemas diferentes:

**I) Sistema intrínseco**

Se inicia por la activación por contacto del F-XII, precalicreína, cininógenos de elevado peso molecular, fosfolípidos (F-3 plaquetario), F-XI, F-IX y F-VIII

**II) Sistema Extrínseco**

Se desencadena por activación del F-III tisular y del F-VII en presencia de iones calcio.

Ambos sistemas desembocan en una vía común que incluyen los factores X, V, II, I, y XIII, así como F-3 plaquetario (fosfolípidos) y de iones calcio.<sup>1,4,8,18,40</sup>

Las tendencias hemorrágicas pueden ser consecuencia de anomalías en cualquiera de los mecanismos hemostáticos principales (extravascular, vascular e intravascular). En resumen, puede considerarse que estas anomalías se relacionen con alguna de las etapas de la coagulación sanguínea, o bien, con varias.<sup>3,4</sup>

**Etapas de la coagulación:**

I. Etapa: Aparición de la actividad tromboplastínica, aunque esta actividad puede considerarse intrínseca o extrínseca, ambas variedades intervienen en la hemostasia.

II. Etapa: Transformación de la protrombina en trombina

III. Etapa: Es la producción de fibrina a partir de fibrinógeno.

Anomalías extravasculares	
Tendencias hemorrágicas debidas a anomalías de :	
Tejidos	Sistema vascular
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atrofias de tejidos elástico.</li> <li>• Hiperlaxitud de la piel.</li> <li>• “fragilidad excesiva de la piel”.</li> <li>• Presiones locales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Retracción y concentración defectuosas de capilares.</li> <li>• Anomalía congénita o hereditaria de los vasos.</li> <li>• Escorbuto, anoxia, traumatismos.</li> <li>• Púrpuras no trombocitopénicas:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Púrpura alérgica</li> <li>• Púrpura tóxica</li> </ul> </li> <li>• Trombocitopenia.</li> <li>• Diatesis hemorrágica hereditaria de Von Willebrand.</li> </ul>

TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA (TTPA)

TIEMPO DE PROTROMBINA (TP)

SISTEMA INTRINSECO

SISTEMA EXTRINSECO

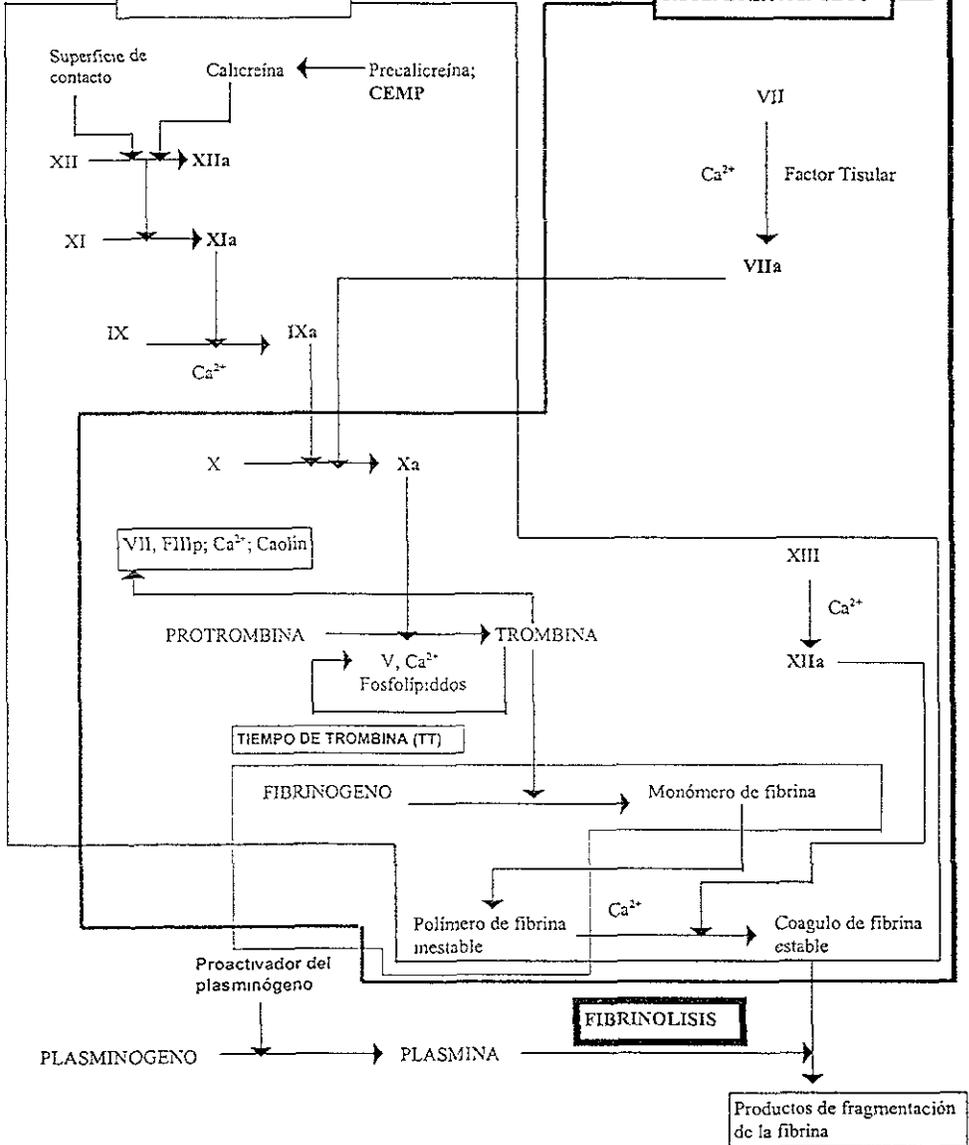


Fig. 4-1 Representación de la "Cascada de coagulación" en donde se muestra la activación de los factores de la coagulación implicados en las pruebas de TTPact., TP y TT<sup>1,3,4,18</sup>

## Anomalías Intravasculares

### Estados hemorrágicos debidos a defectos del mecanismo de coagulación

1. Defectos del mecanismo intrínseco de producción de tromboplastina.
2. Defectos que afectan tanto a la primera como a la segunda etapa de la coagulación
3. Defectos que afectan principalmente a la segunda etapa de la coagulación
4. Defectos de la tercera etapa de la coagulación
5. Anomalías de las plaquetas.
6. Anticoagulantes circulantes.

Casi todas las pruebas de coagulación son mediciones de la velocidad de la secuencia general de reacciones de coagulación o partes de la misma con la formación de fibrina como punto terminal.

En seguida se consideran los métodos de laboratorio comúnmente empleados para localizar alteraciones hemostáticas.<sup>1,2,3,4,18,40</sup>

#### 1.-Tiempo de coagulación de sangre completa (TCSC)<sup>1,2,3,19</sup>

##### a) Principio

Esta método se basa en la coagulación de sangre venosa poniendo en cada tubo una cantidad de sangre e incubarlo a baño de agua donde a lapsos de tiempo se va observando la coagulación de sangre completa.

##### b) Material

Cristalería: 3 tubos de ensaye de 13 x 100 mm

Pipeta Pasteur

Aparatos: Jeringa de 10 ml

Aguja de 21 x 32 mm

Cronómetro

Baño de agua con temperatura controlada

Otros: Manguera latex como "ligadura"

Gradilla y guantes de latex para cirujano

##### Material Biológico

Sangre fresca recién obtenida

##### c) Reactivos o soluciones: No se requieren

##### d) Procedimiento

1. Se extrae sangre venosa con jeringa limpia y seca; al momento de aparecer sangre en el portaagujas poner en marcha el cronómetro.
2. Una vez extraída la sangre, retirar la aguja de la jeringa y colocar en cada tubo 1 ml de sangre. Se realiza por triplicado, numerandolos para su mejor identificación.
3. Colocar los tubos en baño de agua a 37°C durante 3 minutos, revisar el tubo uno cada 30 segundos, hasta que la sangre no fluya libremente, después revisar el tubo número dos, como se describió anteriormente y una vez coagulado proceder a revisar el tercer tubo que fué el menos manipulado.
4. El tiempo a reportar es el del tercer tubo.

##### e) Valores de referencia: Tiempo de coagulación de sangre completa: 4 a 15 minutos

## c) Interpretación de resultados

Prueba	Posibles causas
Tiempo de coagulación de sangre completa	Hemofilia clásica, deficiencia de Factor IX, hemorragias.

## d) Cuidados en la determinación

- ⇒ La interpretación de los resultados puede ser entropécida por el hecho de no registrar el tiempo en que se reunió la muestra, no conservarla a 37°C o no llenar los tubos en el nivel exacto durante las pruebas.
- ⇒ La hemólisis por una técnica inadecuada de punción o por el manejo demasiado violento de la muestra, puede alterar los resultados del examen.

## 2.-Tiempo de sangrado (TS)<sub>3,4,19</sub>

### a) Principio

Este método mide la duración de la hemorragia después de una punción estandarizada en la piel; la duración de la hemorragia depende de la elasticidad de la pared de los vasos sanguíneos, del número y capacidad funcional de las plaquetas.

### b) Material

Aparatos: Lancetas estériles desechables.  
Otros: Discos de papel filtro, guantes de latex.

c) Reactivos o soluciones: No aplican.

### d) Procedimiento

1. Estimular previamente el lóbulo de la oreja, por frotación con una torunda de algodón, para que haya una mejor irrigación de la sangre.
2. Una vez que se ha estimulado el lóbulo se practica una punción con la lanceta estéril, procurando realizar una incisión limpia y profunda, cuando se haya puncionado poner en marcha el cronómetro.
3. A intervalos de tiempo de 30 segundos, colocar el disco de papel filtro sobre la gota de sangre, procurando no tocar la piel, en otra porción del papel filtro recolectar otra gota de sangre, realizar esta operación durante los intervalos de 30 segundos hasta que deje de salir sangre, se toma como punto final el momento en el cual el papel filtro ya no absorbe sangre.

Cálculos: 
$$\text{tiempo en minutos} = \frac{\text{No. de gotas}}{2}$$

e) Valores de referencia: Tiempo de sangrado: de 1 a 9 minutos

## f) Interpretación de resultados

Prueba	Posibles causas
Tiempo de sangrado	Trombocitopenia, disfunción plaquetaria.

## g) Cuidados en la determinación

- ⇒ Permitir que la sangre fluya libremente, sin oprimir el lóbulo de la oreja.

### 3.-Conteo Plaquetario (CP)<sub>1,2,3,4,19</sub>

#### a) Principio

La sangre entera se diluye en una solución de oxalato de amonio al 1%, el cuál permite tener a las plaquetas libres y así determinar la cantidad de plaquetas presentes en 1 mm<sup>3</sup>, el conteo plaquetario se realiza en la cámara de Neubauer.

#### b) Material

Cristalería: Tubos de ensaye 13 x 100 mm

Capilares sin heparinizar

Pipeta de Shali

Tubo Vacutainer con anticoagulante

Aparatos: Jeringa o sistema Vacutainer

Cámara de Neubauer

Microscopio, contador de células

Otros: Manguera látex como "ligadura", Algodón, papel secante

Papel parafilm.

#### Material biológico

Sangre con anticoagulante

(EDTA)

#### c) Reactivos o soluciones

Alcohol al 70%

EDTA al 5%

Oxalato de amonio al 1%

#### d) Procedimiento

1. Se obtiene sangre venosa con anticoagulante, EDTA al 5% se mezcla bien.
2. Con la pipeta de shali se aspira sangre hasta la marca de 0.02 y se diluye en un tubo que contenga 2 ml de oxalato de amonio al 1%, esta mezcla se realiza aspirando y expirando dentro de la solución para limpiar bien por dentro la pipeta, tapar con papel parafilm.
3. Dejar en reposo a 4°C durante 15 minutos.
4. Una vez que haya transcurrido este tiempo, con un tubo capilar se toma mezcla suficiente para llenar la cámara de Neubauer, posteriormente colocar la cámara en un ambiente húmedo aproximadamente 5 a 10 minutos, para permitir que sedimenten las plaquetas.
5. Al término de este tiempo leer al microscopio con objetivo 40X, para realizar el conteo plaquetario nos posicionamos en la cuadrícula de Neubauer para conteo de glóbulos rojos, recorriendo los 25 cuadros, con baja intensidad de luz, para obtener el total de plaquetas por mm<sup>3</sup> multiplicamos el número de plaquetas contadas por 1000.

e) Valores de referencia: Conteo plaquetario: De 150 a 400 x 10<sup>3</sup> cél / mm<sup>3</sup>

#### f) Interpretación de resultados

Prueba	Posibles causas
Conteo plaquetario	Trombocitopenia, policitemia vera, leucemia mieloide crónica, anemia ferropéica, trastornos infecciosos

#### g) Cuidados en la determinación

⇒ La hemólisis por una técnica inadecuada de punción o por el manejo demasiado violento de la muestra, puede alterar los resultados del examen.

#### 4.-Tiempo de Tromboplastina parcial activada (TTPact)<sup>1,3,19</sup>

##### a) Principio

La prueba se efectúa en plasma citratado mediante la activación de los factores de contacto (caolin), la incorporación de un preparado fosfolipídico estándar como sustituto de las plaquetas y la medición del tiempo de formación del coágulo tras la adición de un exceso de calcio.

##### b) Material

Cristalería: Tubos de ensaye 12 x 75 mm  
Tubo vacutainer con anticoagulante

**Material biológico**  
Sangre con anticoagulante  
(Citrato de sodio)

Aparatos: Jeringa o sistema vacutainer  
Baño de incubación  
Cronómetro

Otros: Manguera látex como "ligadura"  
Papel secante, guante de látex

##### c) Reactivos o soluciones

Alcohol al 70%  
Reactivo comercial de TTP (mantener en refrigeración a 4°C)  
Cloruro de calcio 0.025 M  
Anticoagulante EDTA al 5%

##### d) Procedimiento

1. Obtener sangre por punción venosa con anticoagulante (citrato de sodio), mezclar bien.
2. Calentar los reactivos a 37°C durante 5 minutos.
3. En un tubo colocar 0.1 ml de plasma normal, añadirle 0.1 ml de sustituto de plaquetas con activador (reactivo comercial de TTP), mezclar y dejar en incubación durante 2 minutos a 37°C.
4. Al tubo en incubación después del tiempo establecido añadir 0.1 ml de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) 0.025 M, mezclar bien, hacer funcionar el cronómetro, dejar en reposo durante 20 segundos.
5. Para revisar el tubo se saca del baño de incubación observar bien cuando la mezcla ya no corra libremente al inclinar el tubo, al poner resistencia al corrimiento se toma como punto final la aparición de filamentos de fibrina, realizar la prueba por triplicado.

**Cálculos:**  $\Sigma 1+2+3 / 3$

e) **Valores de referencia:** Tiempo de Tromboplastina parcial activada: de 25 a 40 segundos

##### f) Interpretación de resultados

Prueba	Posibles causas en tiempos prolongados.
Tiempo de Tromboplastina parcial activada	Deficiencia de Factores II, V, VIII, IX, X, XI, XII; precalicreína, cininógenos de elevado peso molecular, deficiencia de Vitamina K, anticoagulantes orales, heparina, coagulación intravascular diseminada, enfermedad hepática, anticuerpos contra factores de coagulación, anticoagulante lúpico.

**g) Cuidados en la determinación**

⇒ La hemólisis por una técnica inadecuada de punción o por el manejo demasiado violento de la muestra, puede alterar los resultados del examen.

**5.- Tiempo de Protrombina (TP)<sub>1,2,3,19</sub>**

**a) Principio**

La adición de una fuente de extracto hístico (de cerebro o pulmón con calcio) al plasma citratado, y midiendo el tiempo que tarda en producirse el coágulo o trombo.

**b) Material**

Cristalería: Tubos de ensaye 12 x 75 mm  
Tubo vacutainer con anticoagulante

**Material biológico**  
Sangre con anticoagulante  
(Citrato de sodio)

Aparatos: Jeringa o sistema vacutainer  
Baño de incubación, Cronómetro

Otros: Manguera látex como "ligadura", papel secante  
Guantes de látex

**c) Reactivos o soluciones**

Alcohol al 70%

Reactivo comercial de Tromboplastina con calcio (mantener en refrigeración a 4°C)

**d) Procedimiento**

1. Se obtiene sangre por punción venosa con anticoagulante, mezclar bien.
2. Obtener plasma libre de plaquetas, se toman 5 ml de sangre con anticoagulante y se centrifugan a 3000 r.p.m. durante 5 minutos.
3. En un tubo colocar 0.1 ml de plasma normal y añadirle 0.2 ml de reactivo de Tromboplastina con calcio, mezclar bien y poner en marcha el cronómetro.
4. Colocar en baño de incubación el tubo, inclinar rápidamente el tubo verificando que aparezcan los filamentos de fibrina, cuando esto suceda se detiene el cronómetro, realizar la determinación por triplicado.

**Cálculos:**  $\Sigma 1+2+3 / 3$

**e) Valores de referencia:** Tiempo de Protrombina: de 9 a 13 segundos

**f) Interpretación de resultados**

Prueba	Posibles causas en tiempos prolongados.
Tiempo de Protrombina	Deficiencia de Factores II, V, VII, X; deficiencia de Vitamina K, anticoagulante oral, inhibidor de factores II, V, VII, X.

**g) Cuidados en la determinación**

⇒ La hemólisis por una técnica inadecuada de punción o por el manejo demasiado violento de la muestra, puede alterar los resultados del examen.

## 6.- Recalcificación de Plasma.<sup>13,14,28</sup>

### a) Principio

Se basa en la evaluación en forma general de la vía intrínseca de la cascada de coagulación, adicionando al plasma problema rico en plaquetas, reactivo de calcio y midiendo el tiempo en que tarda en producirse el coágulo o trombo.

### b) Material

Cristalería: Tubos de ensaye 12 x 75 mm  
Tubo vacutainer con anticoagulante

**Material biológico**  
Sangre con anticoagulante  
(Citrato de sodio)

Aparatos: Jeringa o sistema vacutainer  
Baño de incubación, Cronómetro  
Otros: Manguera látex como "ligadura", papel secante  
Guantes de látex

### c) Reactivos o soluciones

Cloruro de calcio 0.025 M

### d) Procedimiento

1. Se obtiene sangre por punción venosa con anticoagulante (citrato de sodio), mezclar bien.
2. Obtener plasma rico en plaquetas, se toman 5 ml de sangre con anticoagulante y se centrifugan a 1500 r.p.m. durante 5 minutos.
3. En un tubo colocar 0.2 ml de plasma rico en plaquetas y añadirle 0.2 ml de reactivo de Cloruro de calcio 0.025M, mezclar bien y poner en marcha el cronómetro.
4. Colocar en baño de incubación el tubo a 37°C, observar a los 45 seg. y después cada 15 seg. inclinando rápidamente el tubo verificando que aparezcan los filamentos de fibrina, cuando esto suceda se detiene el cronómetro, realizar la determinación por triplicado.

**Cálculos:**  $\Sigma 1+2+3 / 3$

e) **Valores de referencia:** Tiempo de Protrombina: de 80 a 180 segundos

### f) Interpretación de resultados

Prueba	Posibles causas en tiempos prolongados.
Recalcificación de plasma	<ul style="list-style-type: none"><li>• Afibrinogenemia</li><li>• Deficiencia muy severa de Factores II, V, VIII, IX</li><li>• Administración de anticoagulantes</li><li>• Hiperheparinemia</li><li>• Efectos de radiaciones ionizantes</li><li>• Disproteinemias<ol style="list-style-type: none"><li>a) Crioglobulinemia</li><li>b) Plasmocitoma</li><li>c) Macroglobulinemia</li></ol></li></ul>

### g) Cuidados en la determinación

⇒ La hemólisis por una técnica inadecuada de punción o por el manejo demasiado violento de la muestra, puede alterar los resultados del examen.

## QUIMICA SANGUINEA

El metabolismo es la suma de procesos que tienen lugar en el interior de una célula viva; para que se lleve a cabo es necesario que surjan una serie de fenómenos a fin de que los diversos sustratos lleguen y se incorporen a las células. Estos procesos constituyen el **metabolismo intermediario**; el mecanismo de incorporación es complejo y con numerosas variantes, la membrana selecciona el material que ha de atravesarla, así, la célula sólo recibe los sustratos que va a utilizar y elimina los que no puede aprovechar. Los principales constituyentes del organismo son los glúcidos, proteínas y lípidos.<sup>21,22</sup>

El organismo es un sistema metabólico en constante estado de renovación, en el que se alternan las degradaciones y las síntesis, sirviendo esto para que sus componentes conserven el equilibrio funcional o dinámico en sus estructuras. Las perturbaciones en el intercambio de las materias que integran el organismo crean desequilibrios en la composición del mismo (debido a excreciones y secreciones), que repercuten en el plasma humano alterando el equilibrio químico-energético, dando lugar a diversas enfermedades.

En el plasma existen más de 15 compuestos nitrogenados no proteínicos (CNNP) diferentes con una concentración total de nitrógeno de 250 a 400 mg/L; El contenido de CNNP en sangre completa es de aproximadamente 75% superior al del plasma debido principalmente al alto contenido de glutatión en los eritrocitos; estos compuestos de mayor a menor porcentaje son: Urea (que representa un 45% del total siendo el principal CNNP), **Ácido úrico**, **Creatinina**, **Creatina**, **Amoníaco** y **aminoácidos** (éstos aportan el 30% restante y reflejan la concentración de aminoácidos).

La determinación de nitrógeno se hace mediante la urea y creatinina en el suero, los cuales constituyen índices más sensibles y específicos de la función renal; el diagnóstico de los trastornos del metabolismo de los carbohidratos se apoya en parte en la medición de la **Glucosa** plasmática, ya sea en ayunas con estimulación; la prueba más especializada para manejar dosis diferentes de glucosa es la **Prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG)**.<sup>1,2,3,22,23</sup>

En seguida se consideran los métodos de laboratorio clínico empleados rutinariamente para cuantificar los componentes metabólicos antes mencionados:

### **) Determinación de Urea**<sup>7,11,21,22,23,24,25,26,27</sup>

El hígado es el principal sitio de formación de urea, la síntesis a través del ciclo de Krebs-Henseleit implica la conversión del aminoácido **ornitina** en **citruilina** y luego en **arginina**, después de lo cual se regenera la **ornitina** y se separa la **urea**. En la figura 5-1 se esquematizan las reacciones e intermediarios de la biosíntesis de la urea.

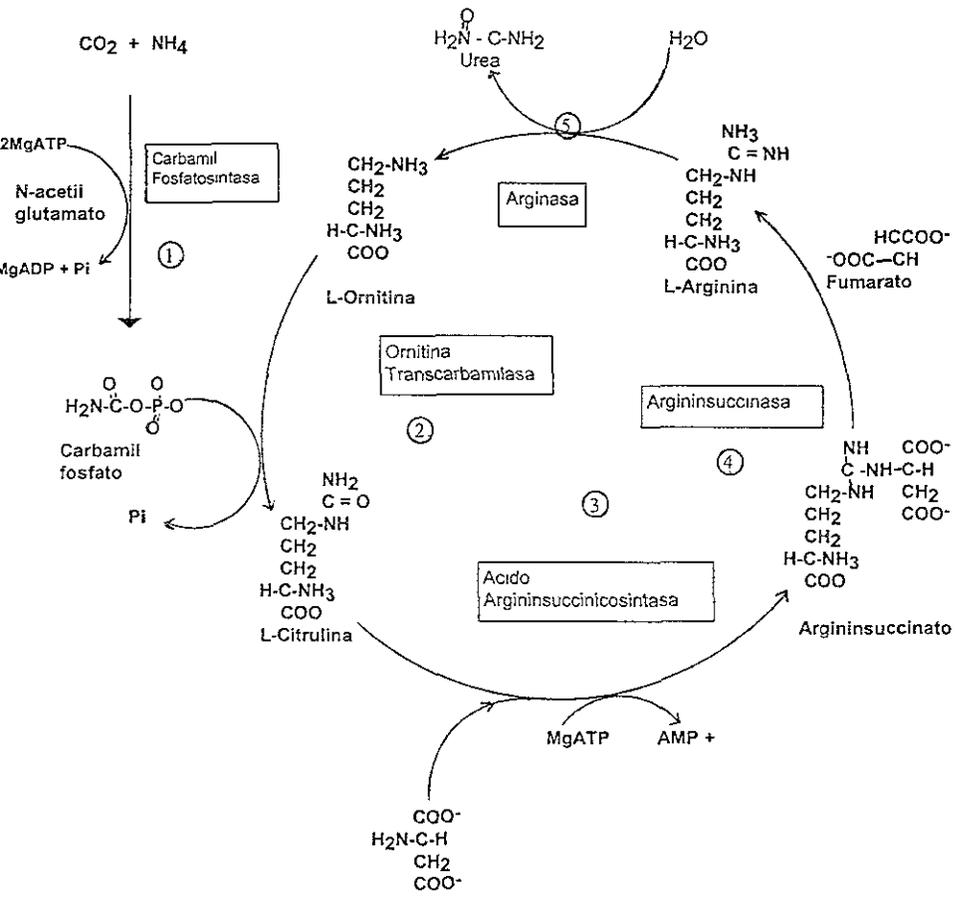


Fig. 5-1 Reacciones e intermediarios de la biosíntesis de la urea.

La urea es el principal producto terminal nitrogenado del metabolismo de las proteínas y de la degradación de los aminoácidos. Su peso molecular es de aproximadamente 60 daltones y está distribuida en toda el agua corporal. La urea constituye el 80 - 90 % del nitrógeno excretado (el nitrógeno uréico constituye aproximadamente el 45% del nitrógeno no proteínico total del suero o plasma).

La concentración de nitrógeno uréico en la sangre representa el equilibrio entre la velocidad de síntesis de la urea en el hígado y la de excreción de esta sustancia por el riñón.

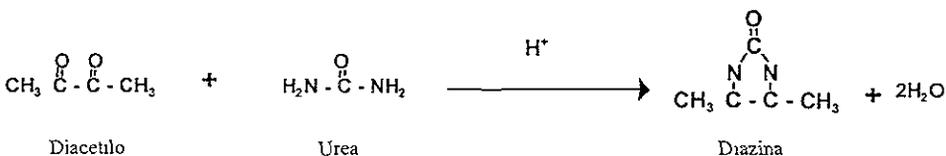
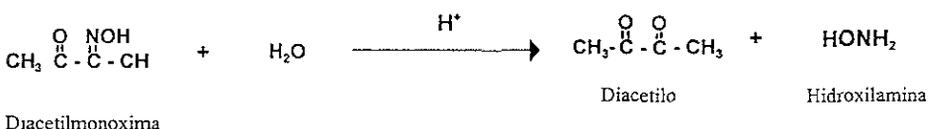
Los métodos para la determinación de urea pueden clasificarse en dos grupos:

- Métodos directos: los cuales consisten en la condensación de la urea con diacetilo para formar un cromógeno cuantificable (medible).
- Métodos Indirectos: consisten en la determinación de amonio resultante de la reacción de la ureasa sobre la urea.

### 1) Método de DAM (diacetilmonoxima) <sup>22,23,24,26,27</sup>

#### a) Principio

La urea reacciona con la diacetilmonoxima en presencia de tiosemicarbacida en medio ácido, formando un cromógeno de color rosa púrpura, la reacción se lleva a cabo en dos etapas, la concentración de urea presente en la muestra es proporcional a la intensidad del color formado.



#### b) Material

Cristalería: Tubos de ensayo 13 x 100 mm  
 Pipetas graduadas de 1 ml. (1/10 y 1/100)  
 Aparatos: Espectrofotómetro  
 Centrifuga, cronómetro, termómetro  
 Baño de agua con temperatura controlada  
 Micropipeta con puntas

**Material biológico**  
 Suero o plasma (EDTA, heparina, oxalato)

#### c) Reactivos o soluciones

Solución ácida: ácido tricloroacético al 5%

Solución de catalizadores: FeCl<sub>3</sub>

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Tiosemicarbacida

Agua destilada o desionizada  
 Solución de diacetilmonoxima  
 Solución patrón de urea (40 mg/100 ml)  
 Mezcla comercial de enzimas-coenzimas-sustrato

**d) Procedimiento**

<b>Método con desproteización</b>			
	Problema (ml)	Patrón (ml)	Blanco (ml)
Solución ácida	1.0	1.0	
Suero	0.05		
Patrón		0.05	
Mezclar y centrifugar el problema durante 5 minutos, posteriormente pipetear en los tubos			
Sobrenadante	0.05	0.05	
Solución de catalizadores	1.0	1.0	1.0
Solución de DAM	1.0	1.0	1.0
Mezclar bien, dejar 6 minutos en baño de agua hirviendo, medir las absorbancias del problema y patrón contra blanco de reactivos, no antes de 10 minutos, después de sacarlo del baño de incubación. Máximo de absorbancia 525 nm, espesor de la celda 1 cm.			

<b>Método sin desproteizar</b>			
	Problema (ml)	Patrón (ml)	Blanco (ml)
Suero o plasma diluido	0.05		
Patrón diluido		0.05	
Proceder de acuerdo con la metodología anterior, sustituyendo los diluidos por la de los sobrenadantes del problema y del patrón.			

**Dilución: mezclar bien: 0.05 ml de suero o plasma + 1.0 ml de agua destilada.**

**Cálculos: suero o plasma**

$$[\text{urea}] = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 40 \text{ mg/100 ml}$$

$$[\text{N ureico}] = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 18.7 \text{ mg/100 ml}$$

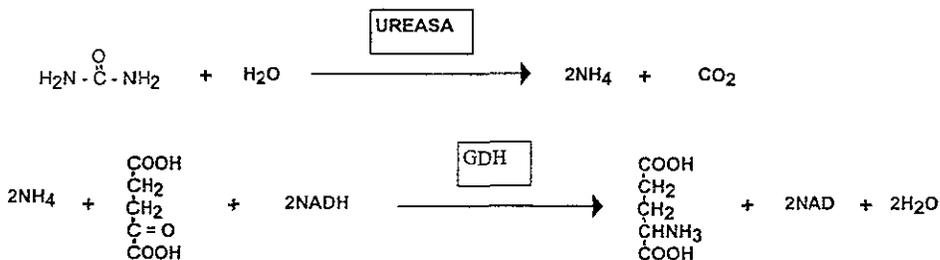
**e) Valores de referencia**

**Suero o plasma:** 20 - 40 mg Urea / dl  
 10 - 20 mg N ureico / dl

## 2) Método enzimático (urea amidohidrolasa EC 3.5.1.5)<sub>22,23,24,26,27</sub>

### a) Principio

La hidrólisis de la urea, por la enzima ureasa produce amoníaco y ácido carbónico; el amoníaco se cuantifica por medio de la aminación reductiva del  $\alpha$ -cetoglutarato catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa, que tiene lugar junto con la oxidación simultánea de la nicotinamidaadeninucleótido reducido (NADH).



La disminución en la extinción debida al consumo de NADH, es directamente proporcional a la concentración de urea presente en la muestra.

### b) Material

Cristalería: Tubos de ensayo 12 x 75 mm

Pipetas graduadas de 1 ml. (1/10 y 1/100)

Aparatos: Espectrofotómetro

Centrífuga, cronómetro, termómetro

Baño de agua con temperatura controlada

Guantes de látex

### Material biológico

Suero o plasma (EDTA, heparina, oxalato)

### c) Reactivos o soluciones

Agua destilada o desionizada

Solución patrón de urea (80 mg / dl)

Solución reactiva: mezcla comercial de enzimas-coenzimas-sustrato

### d) Procedimiento

Preincubar la solución reactiva a temperatura de medición: entre 25°C a 37°C antes de adicionar la muestra problema.

Semimicrotécnica		
pipetear directamente en las células espectrofotométricas		
	Problema [ $\mu$ l]	Patrón [ $\mu$ l]
Solución reactiva	500	500
Patrón		10
Muestra (problema)	10	

Mezclar bien, medir la absorbancia ( $E_1$ ) del problema y patrón exactamente 5 minutos después de medir ( $E_2$ ), controlando la temperatura. La longitud de onda es de 340 nm; la temperatura de medición es 25°C o 37°C.

Cálculos:

$$[\text{Urea}] = \frac{E_2 \text{ Pb} - E_1 \text{ Pb}}{E_2 \text{ Pt} - E_1 \text{ Pt}} \times [80] \text{ mg/dl}$$

e) Valores de referencia: Suero o plasma: 20 mg - 40 mg Urea / dl.

## f) INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Nitrógeno de Urea en suero	
Aumentado	Disminuído
<p>a) Causas prerrenales</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Descompensación cardíaca</li> <li>• Deshidratación ocasionada por ingesta reducida o pérdida excesiva de agua.</li> <li>• Aumento del catabolismo proteínico</li> </ul> <p>b) Causas renales</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glomerulonefritis aguda</li> <li>• Nefritis crónica</li> <li>• Riñón policístico</li> <li>• Nefrosclerosis o necrosis tubular</li> </ul> <p>c) Causas postrenales</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cualquier tipo de obstrucción del tracto urinario</li> </ul>	<p>Es menos frecuente y ocurre primariamente en enfermedad hepática avanzada.</p>

## g) Cuidados en la determinación

⇒ Evitar contacto con reactivos en la piel, si es necesario limpiar la piel inmediatamente con mucha agua.

⇒ No pipetear con la boca.

⇒ Pueden utilizarse las mismas muestras de sangre empleadas para hacer otras determinaciones ya que los anticoagulantes y conservadores comúnmente empleados en bioquímica clínica, no interfieren en la reacción, pero no así, para las determinaciones enzimáticas ya que los fluoruros y amonio interfieren con la determinación.

⇒ Las siguientes sustancias a las concentraciones indicadas no interfieren con la determinación: Hemoglobina  $\leq 500$  mg/ dl; Bilirrubina  $\leq 20$  mg/ dl; Triglicéridos  $\leq 1$  g/ dl.

⇒ Para evitar la contaminación de la solución reactiva se recomienda vaciar en otro recipiente la cantidad requerida para uso diario.

## II) Determinación de Creatinina<sup>11,22,23,25,27</sup>

La creatinina es sintetizada en el hígado, partiendo de la metionina, de la glicina y de la arginina a través de la reacción de transamidación, que es catalizada por la enzima **Arginoglicintransamidasa**.

La creatinina formada difunde hacia la sangre y se absorbe en el tejido muscular (músculo esquelético) donde se fosforila para formar fosforilcreatina en una reacción catalizada por la **creatinfosfocinasa (CPK)**, las reacciones se representan en la fig 5-2.

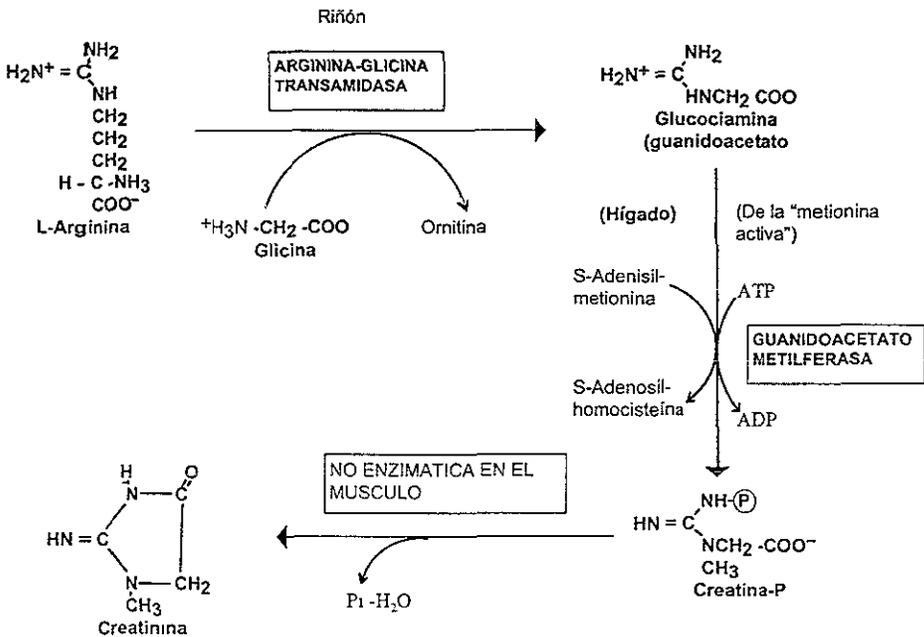


Fig. 5-2 Biosíntesis de la creatina y de la creatinina

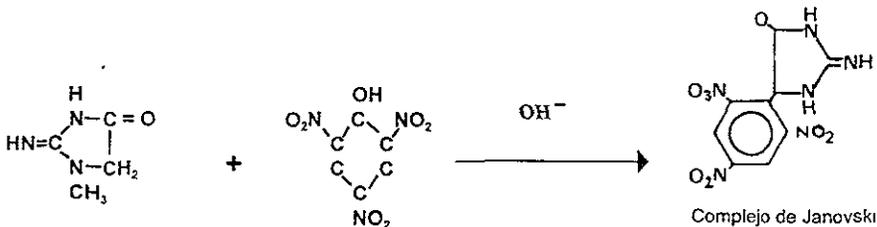
Durante el ejercicio la reacción es revertida, manteniendo el aporte de ATP que es la fuente inmediata de energía para la contracción muscular.

La creatinina es un catabolito orgánico nitrogenado que deriva de la creatina del tejido muscular, tiene un peso molecular de 113 daltones y se encuentra distribuida en toda el agua corporal; la mayoría de los métodos para la determinación de creatinina se basan en la reacción de Jaffé, desafortunadamente este método tan simple es inespecífico para la creatinina, existiendo muchas sustancias en la sangre que también reaccionan con el picrato alcalino, las más importantes son: *acetona, acetoacetato, piruvato, ácido ascórbico, glucosa, barbitúricos y proteínas.*

## 1) Reacción de Jaffé

### a) Principio

La creatinina y otros cromógenos presentes en el plasma; en medio alcalino, reaccionan con el ión picrato dando un complejo de color amarillo. La concentración del complejo colorido producido en un determinado tiempo de reacción corresponde a la concentración de creatinina.



**b) Material**

Cristalería: Tubos de ensaye 13 x 100 mm

Pipetas de 1.0 ml (1/10)

Aparatos: Espectrofotómetro

Agitador "Vortex"

Baño de agua con temperatura controlada

**Material biológico**

Suero o plasma

**c) Reactivos y soluciones**Reactivo alcalino (solución amortiguadora): NaOH 313.0 mmol / L  
PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 12.5 mmol / L

Acido pícrico 8.73 mmol / L

Solución patrón de creatinina 1 mg / dl.

**d) Procedimiento**

Técnica I				
Reactivo	Problema		Patrón	
	Macrotécnica	semimicrotécnica	Macrotécnica	semimicrotécnica
Suero	0.5 ml	0.2 ml		
Acido pícrico	1.0 ml	0.5 ml	1.0 ml	0.5 ml
Solución patrón			0.5 ml	0.2 ml
Mezclar bien y ajustar a la temperatura de reacción (entre 20°C a 37°C) durante 5 minutos				
Soln. amortiguadora	1.0 ml	0.5 ml	1.0 ml	0.5 ml
Mezclar bien y pasar inmediatamente a la celda; medir la absorbancia M <sub>1</sub> antes de transcurrir 1 min.; Medir la absorbancia M <sub>2</sub> exactamente 5 min. después de la primera medición. La longitud de onda se determina a 492, 500 o 509 nm, el espesor de la celda es de 1 cm.				

Cálculos:

$$[\text{Creatinina}] = \frac{M_2 \text{ Pb} - M_1 \text{ Pb}}{M_2 \text{ Pt} - M_1 \text{ Pt}} \text{ mg / dl}$$

Técnica II			
Reactivos	Problema	Patrón	Blanco
Solución amortiguadora	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml
Agua destilada			0.5 ml
Suero o plasma	0.5 ml		
Patrón		0.5 ml	
Acido pícrico	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Agitar y dejar en reposo 20 min. o incubar 10 min / 37°C, leer a 495 nm ajustando a cero con el blanco. después de leer y anotar la absorbancia (M <sub>1</sub> ), pipetear:			
Acido acético	0.2 ml		0.2 ml
Después de 3 minutos leer nuevamente a 495 nm igualando a cero con el blanco, anotar la absorbancia (M <sub>2</sub> )			

Cálculos:

$$[\text{Creatinina}] = \frac{M_2 - M_1}{\text{Abs. Patrón}} \times 3 \text{ (mg / 100 ml)}$$

$$\text{Factor de calibración} = \frac{3}{\text{Abs Pt}}$$

$$[\text{muestra}] \text{ mg / 100 ml} = (M_2 - M_1) \text{ factor de calibración}$$

### e) Valores de referencia

Técnica	Hombres	Mujeres
Técnica I	0.7 - 1.1 mg / dl	0.6 - 0.9 mg / dl
Técnica II	0.4 -- 1.4 mg / dl	

### f) Interpretación de resultados

- La concentración de creatinina en suero es una excelente prueba para valorar la función renal.
- Las concentraciones de creatinina por encima de 3 mg / dl son causadas por factores prerenales.
- En pacientes con nefropatías conocidas, la existencia de concentraciones permanentes de 2.5 a 4.9 mg / dl. significa una grave disminución de la función renal
- Las concentraciones de 5.0 a 9.9 mg / dl demuestran la existencia de enfermedad renal muy grave.
- Las concentraciones por encima de 100 mg / 100 ml ponen en evidencia que es el momento de considerar el tratamiento de reemplazo crónico ya sea bajo la forma de diálisis permanente o de un transplante renal.

### g) Cuidados en la determinación

- ⇒ Para la obtención de resultados exactos y precisos, seguir estrictamente la metodología propuesta.
- ⇒ Las muestras ligeramente hemolizadas no interfieren en el resultado, pero si la hemólisis es intensa, se obtendrán falsos positivos.
- ⇒ Comprobar periódicamente las técnicas utilizando sueros control para detectar posibles alteraciones en el espectrofotómetro

### III) Determinación de Ácido Úrico<sup>11,22,23,24,25,27</sup>

El ácido úrico se forma por la degradación de las purinas, las mismas bases pueden ser oxidadas: según se puede ver en la figura 5-3.

El ácido úrico es un ácido orgánico débil que constituye un producto terminal del metabolismo de las purinas, tiene un peso molecular de 169 daltones; se encuentra en sangre y articulaciones como sal de sodio, urato monosódico, cuya solubilidad es de alrededor de 120 mg / 100 ml, y en líquidos corporales más ácidos como la orina, se encuentra solubilizado en el orden de los 6 mg / 100 ml.

El ácido úrico se mide en los filtrados desproteinizados de sangre, orina u otros líquidos corporales mediante técnicas colorimétricas o bien por métodos enzimáticos.

### 1) Método enzimático

#### a) Principio

El ácido úrico se transforma en presencia de oxígeno y la enzima uricasa, en alantoína y peróxido de hidrógeno. Este último reacciona simultáneamente con el ácido 2-OH-3,5-diclorobencensulfónico (2-OH-3,5-DCBSA) y con 4-aminoantipirina (4-AAP), formando una quinonimina roja. La absorbancia de la quinonimina producida es proporcional a la concentración de ácido úrico presente en la muestra.

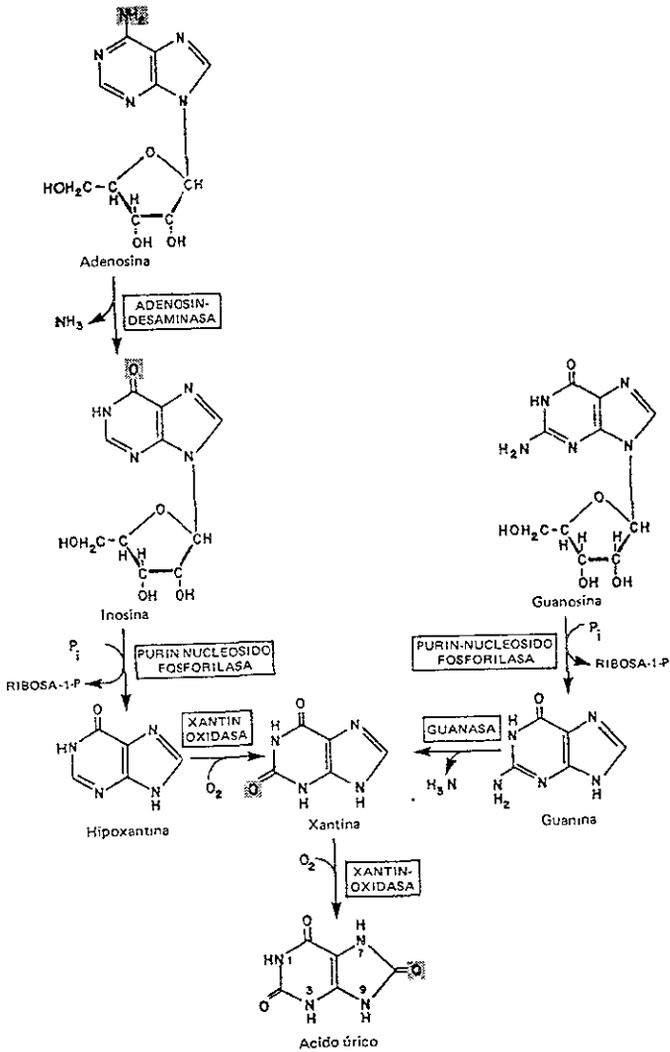
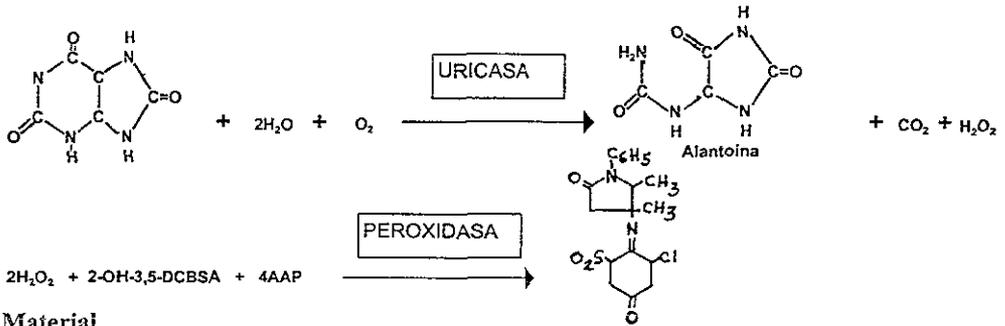


Fig. 5-3 Generación de ácido úrico a partir de los nucleósidos purínicos por la vía de las bases purínicas.



**b) Material**

- Cristalería: Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- Aparatos: Espectrofotómetro
- Agitador "vortex"
- Baño de agua con temperatura controlada
- Micropipeta graduable con puntas

**Material biológico**  
Suero fresco no hemolizado

**c) Reactivos y soluciones**

- Solución patrón ácido úrico 8 mg / dl
- Solución reactiva: Ácido 3,5-dicloro-2-Hidroxibencensulfónico (2-OH-3,5-DCBSA) = 574 mg / L
- 4-aminoantipirina (4-AAP) = 240 mg / L
- Peroxidasa = 1050 U / L
- Uricasa = 175 U / L

**d) Procedimiento**

Método enzimático			
Semimicrotécnica			
Reactivos	Problema	Patrón	Blanco
Muestra problema	20 µl		
Solución patrón		20 µl	
Solución reactiva	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Mezclar bien e incubar durante 10 minutos a 37°C, leer las absorbancias del problema y del patrón contra blanco de reactivos a 505 nm. El color es estable durante 30 minutos.

**Cálculos:**

$$[\text{Ác. Úrico}] = \frac{\text{Abs Pb}}{\text{Abs Pt}} \times 8 \text{ mg / dl}$$

**e) Valores de referencia**

En individuos sanos, la concentración de ácido úrico en suero puede variar entre: 2.5 y 7.3 mg / dl

**f) INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

La determinación de ácido úrico en suero, es útil en el diagnóstico de alteraciones en el metabolismo de las nucleoproteínas. Una concentración elevada de ácido úrico es una anomalía relativamente común que se encuentra en los perfiles químicos; en la mayoría de los casos es un trastorno secundario y no primario.

Hipouricemia	Hiperuricemia
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acromegalia</li> <li>• Tratamiento de salicilatos</li> <li>• Orientación hacia el diagnóstico de enfermedades primarias como: trastornos de los túbulos proximales del riñón; en enfermedad de Wilson</li> <li>• Deficiencia hereditaria de xantinaoxidasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gota</li> <li>• Leucemia</li> <li>• Anemia</li> </ul>

### g) Cuidados en la determinación

⇒ El desproteinizante utilizado permite la obtención de sobrenadante o filtrados límpidos y claros además de pH óptimo para una excelente recuperación del ácido úrico.

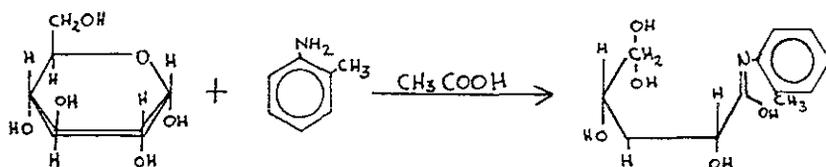
⇒ La hemoglobina en concentraciones mayores de 250 mg / dl, la lipemia (triglicéridos) a más de 250 mg / dl, la bilirubina en cantidades mayores de 20 mg / dl, y el ác. ascórbico interfieren con la determinación de ác. úrico.

### IV) Determinación de glucosa plasmática<sup>7,11,22,23,26</sup>

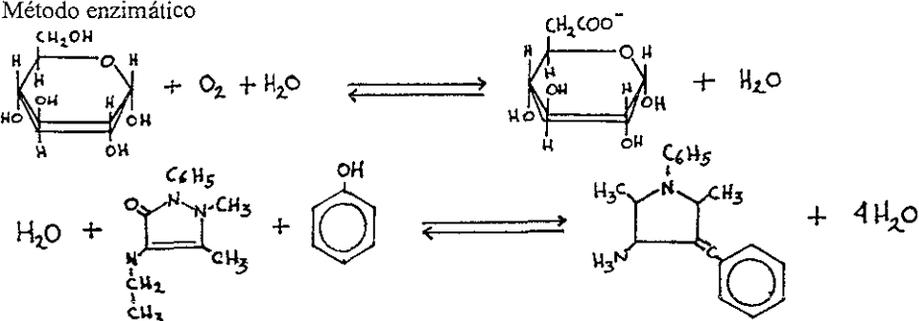
La glucosa una vez que penetra en las células es normalmente fosforilada para formar Glucosa-6-fosfato. La enzima que cataliza esta reacción es la hexocinasa; La G-6-f es polimerizada en glucógeno o catabolizada. Las etapas que sigue se representan en la figura 5-4. La glucosa es un monosacárido de seis carbonos (hexosa) cuyo peso molecular es de 180 daltones, la variación de los valores normales de concentración de glucosa en muestras de plasma en personas con ayuno es de 60 a 100 mg / 100 ml. Los procedimientos que miden la glucosa verdadera emplean aminas aromáticas (ortotoluidina) o enzimas tales como la glucosa oxidasa o la hexocinasa.

Reacciones:

Método de la O-toluidina



Método enzimático



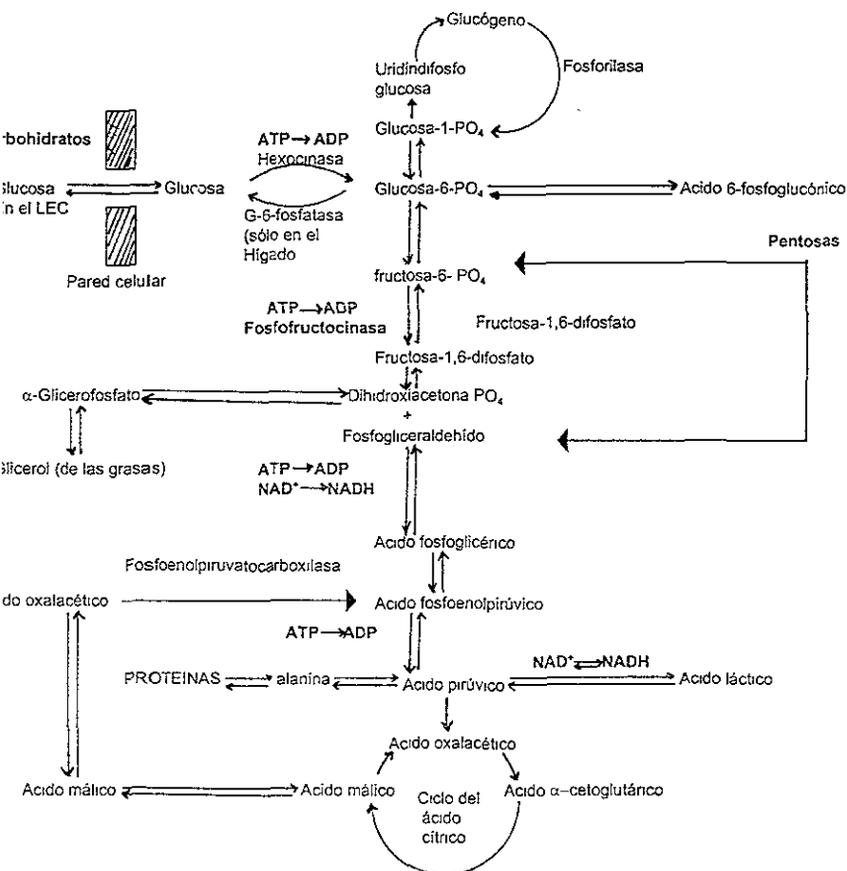


Fig. 5-4 Metabolismo de los carbohidratos

## 1) Método de la O-toluidina

### a) Principio

La glucosa formada con O-toluidina en solución de ácido acético bajo temperatura, da una sustancia de color verde que puede determinarse espectrofotométricamente entre los 575 y 650 nm.

### b) Material

Cristalería: Tubos de ensaye de 13 x 100 mm

Pipetas graduadas de 1.0 y 2.0 ml

Aparatos: Espectrofotómetro

Agitador "vortex"

Micropipeta ajustable

Baño de agua con temperatura controlada

### Material biológico

Suero o plasma obtenido dentro de los 30 min.

después de haber extraído la sangre.

**c) Reactivos o soluciones**

Reactivo comercial de coloración: Soln. de O-toluidina (800 mmol / L) en ácido acético

Solución patrón de glucosa: 100 mg / dl

**d) Procedimiento**

Método sin desproteinización			
Reactivo	Problema	Patrón	Blanco
Suero		0.02	
Patrón	0.02		
Reactivo de color	2.0	2.0	2.0

Mezclar bien, dejar en reposo durante 8 minutos en agua hirviendo, posteriormente pasar inmediatamente a agua fría, después medir las absorbancias del problema y del patrón contra blanco de reactivos. La longitud de onda debe encontrarse entre 575 y 650 nm.

**Cálculos:**

$$[\text{glucosa}] = \frac{\text{Abs Pb}}{\text{Abs Pt}} \times 100 \text{ (mg / dl)}$$

**e) Valores de referencia**

Sangre venosa en ayunas: 50 - 100 mg / dl

Plasma o suero venoso en ayunas: 60 - 100 mg / dl

**2) Método enzimático**

La glucosa es oxidada por la enzima glucosa oxidasa (GOD) liberando peróxido de hidrógeno, este reacciona con fenol y 4-aminofenazona en presencia de peroxidasa (POD), dando un color rojo-violeta de antipirilquinonimina en cantidad proporcional a la glucosa presente en la muestra.

**b) Material**

Cristalería: Tubos de ensaye de 13 x 100 mm<sup>3</sup>

Pipetas graduadas de 1.0 y 2.0 ml

Aparatos: Espectrofotómetro

Agitador "vortex"

Micropipeta ajustable

Baño de agua con temperatura controlada

**MateriaL biológico**

Suero o plasma obtenido dentro de los 30 min.

después de haber extraído la sangre.

**c) Reactivos o soluciones**

Solución patrón de glucosa: 100 mg / dl

Reactivo comercial de color-(mezcla de enzimas):

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 mol / L (pH=7.5)

4-aminofenazona 0.25 mmol / L

Enzima glucosaoxidasa  $\geq 7.5$  kU / L

Enzima peroxidasa  $\geq 1.5$  kU / L

#### d) Procedimiento

Semimicrotécnica			
Reactivos	Problema	Patrón	Blanco
Suero	10.0 µl		
Patrón		10.0 µl	
Reactivo de color	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Mezclar bien, incubar a 37°C durante 10 minutos, leer las absorbancias del problema y del patrón contra blanco de reactivos. La longitud de onda debe encontrarse entre 520 y 546 nm. El color es estable durante 60 minutos.

Cálculos:

$$[\text{glucosa}] = \frac{\text{Abs Pb}}{\text{Abs Pt}} \times 100 \text{ (mg / dl)}$$

e) Valores de referencia: Suero o plasma en ayunas: 75 - 115 mg / dl

#### f) INTERPRETACION DE RESULTADOS

La diabetes sacarina es un trastorno del metabolismo de los carbohidratos con una deficiencia absoluta de insulina o con la relativa sensibilidad de los órganos efectores a esta hormón.

El diagnóstico de diabetes sacarina implica reconocer un mayor riesgo del paciente para tener hiperlipidemia, enfermedades coronarias, padecimientos cerebrovasculares, complicaciones durante el embarazo, nefropatía periférica, enfermedad renal, edema o prurito, hipertensión, cataratas, glaucoma, ceguera.

#### g) Cuidados en la determinación

⇒ La concentración de glucosa plasmática disminuye a una velocidad aproximada del 5 % por hora en ausencia de inhibidores glucolíticos (fluoruro, yodoacetato de sodio) o en casos en que no se realiza de inmediato la separación del coágulo.

⇒ El reactivo de O-toluidina es de alto riesgo para la piel (producto altamente cancerígeno).

⇒ En la determinación enzimática, no interfiere el ácido úrico, ni de otros agentes reductores como el ácido ascórbico, glutatión, la bilirrubina, la creatinina, anticoagulantes a concentraciones fisiológicas.

⇒ Para evitar contaminar el reactivo se recomienda utilizar la cantidad necesaria de éste para realizar las determinaciones diarias.

⇒ Las pipetas y el material de vidrio empleados deberán ser lavadas y enjuagadas perfectamente, con agua destilada.

## PRUEBA ORAL DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (P.O.T.G.)

La prueba oral de tolerancia a la glucosa es una prueba natural, que permite establecer la respuesta insulínica frente a un estímulo fisiológico por glucosa. La rápida absorción de la glucosa significa elevación de la glucosa en sangre que desencadena la liberación de insulina (preformada en las células beta) en cantidad suficiente para cubrir las necesidades, o sea aumentar la captación de la hexosa por los tejidos, en especial del hígado, donde se almacena como glucógeno.<sup>1,3</sup>

La prueba oral de tolerancia a la glucosa es más sensible y específica que la medición de la glucemia en ayunas o en cualquier otro momento o que las valoraciones semicuantitativas de glucosa en orina; es una prueba de referencia para establecer el diagnóstico de la diabetes; por desgracia la productibilidad de la prueba de tolerancia a la glucosa deja mucho que desear debido a factores como la edad, la alimentación, la actividad, diferentes medicamentos o estados patológicos no diabéticos que pueden modificar los resultados.<sup>1,21,22,28</sup>

La clasificación de un paciente como diabético o no diabético depende del conjunto de criterios utilizados para la interpretación de los resultados de la prueba oral de tolerancia a la glucosa. En el sujeto normal, el nivel máximo de glucosa después de la absorción rara vez pasa de 150 mg/ 100 ml; las cifras normales se recobran generalmente antes de las dos horas y desde luego antes de las tres horas contadas a partir de la ingestión de la glucosa; no existe un patrón único de curvas de glucemia y todas muestran alteraciones más o menos manifiestas.

Las diferentes curvas de glucemia consideradas por la Organización Mundial de la Salud, son las siguientes:

### Curva normal:

tiempo	concentración
Ayunas	inferior a 100 mg / 100 ml
Primera hora	inferior a 150 mg / 100 ml
Dos horas	inferior a 110 mg / 100 ml
Tres horas	inferior a 100 mg / 100 ml

### Curva típicamente diabética

tiempo	concentración
Ayunas	superior a 100 mg / 100 ml
Primera hora	superior a 300 mg / 100 ml
Dos horas	superior a 340 mg / 100 ml
Tres horas	las cifras pueden ser más altas o más bajas, según la intensidad de la diabetes. <b>En casos de diabetes muy marcadas, las cifras siempre son superiores.</b>

## Curva típicamente hipoglucémica

tiempo	concentración
Ayunas	inferior a 70 mg / 100 ml
Primera hora	inferior a 90 mg / 100 ml
Dos horas	inferior a 70 mg / 100 ml
Tres horas	inferior a 50 mg / 100 ml

La tolerancia a la glucosa disminuye con la edad en razón de 10 a 15 mg / 100 ml, por cada decenio, después de los 50 años. En la gráfica 6-1 se pueden apreciar los resultados de las pruebas de tolerancia a la glucosa por vía bucal en diversas enfermedades.

## Prueba oral de tolerancia a la glucosa

### a) Principio<sup>28</sup>

Dosificaciones periódicas en el transcurso de algunas horas de glucemia, después de estimular el páncreas con una dosis de glucosa, para analizar en forma práctica y global el metabolismo de los glúcidos, diagnosticar hipoglucemias, diabetes latentes no diagnosticadas o comportamiento de las ya establecidas.

### b) Material

Cristalería: Tubos de ensaye de 13 x 100 mm

Pipetas graduadas de 1.0 y 2.0 ml

Aparatos: Espectrofotómetro

Agitador "vortex"

Micropipeta ajustable

Baño de agua con temperatura controlada

### Material biológico

Suero o plasma obtenido dentro de los 30 min.

después de haber extraído la sangre.

### c) Reactivos o soluciones

Solución patrón de glucosa: 100 mg / dl

Reactivo comercial de color-(mezcla de enzimas): Solución amortiguadora de fosfatos

0.1 mol / L (pH=7.5)

4-aminofenazona 0.25 mmol / L

Enzima glucosaoxidasa  $\geq 7.5$  kU / L

Enzima peroxidasa  $\geq 1.5$  kU / L

Reactivo comercial de coloración: Soln. de O-toluidina (800 mmol / L) en ácido acético

Solución glucosada (líquido de prueba): la dosis que es conveniente administrar es de 1 g de azúcar por kg de peso del paciente. cromatizada con jugo de limón.

### d) Procedimiento

1. Es absolutamente necesario que el paciente se haya preparado adecuadamente, a base de una alimentación que contenga 300 grs de carbohidratos al día, durante tres días antes de prueba, además de interrumpir cualquier tratamiento con hormonas, anticonceptivos por vía oral u otros medicamentos.

2. Un día antes de la prueba oral de tolerancia a la glucosa se pide al paciente que esté en ayunas para tomarle muestra de orina, la primera de la mañana.
3. Al día siguiente el paciente que debe tener un ayuno de por lo menos 8 hrs. antes de la prueba, es conveniente que el paciente guarde reposo, no fume, no realice ejercicio y no se le de alimentos con excepción de la dosis de solución glucosada, solo puede tomar un poco de agua.
4. Se toma una muestra de sangre en ayunas, posteriormente el paciente debe tomar la solución glucosada completamente, dejar transcurrir 5 minutos y poner en marcha el cronómetro.
5. Se obtienen muestras de sangre a los 30 minutos, a los 60 minutos, a los 120 minutos y a los 180 minutos.
6. Si la prueba oral de tolerancia a la glucosa se acompaña de mediciones de glucosa en orina, las muestras de orina se recogen simultáneamente a las de la sangre, en las muestras de orina se determinan sustancias reductoras y cetonas. Todas las muestras de orina deben ser negativas para la glucosa.
7. Las muestras de sangre se les determina glucosa por medio de cualquier técnica ya descrita en el capítulo de Química sanguínea.

#### **f) Interpretación de resultados**

La glucosa sanguínea en ayunas se encuentra dentro de los límites normales o sea entre 80 mg / 100 ml. A partir del nivel normal del ayuno la cifra de glucosa sube hasta un máximo que no pasa de 155 mg / ml de 45 a 60 minutos. después de tomar la dosis de prueba.

La concentración de glucosa en sangre a las 2 hrs. es la observación más útil: en sujetos normales, no debe pasar de 100 mg / dl.

Se considera una glucemia de 160 mg / dl de glucosa o más al final de la primera hora y un valor a las 2 hrs. de 120 mg / 100 ml o más como indicadores de diabetes sacarina.

Una cifra superior a 160 mg / 100 ml en la primera hora, y a las 2 hrs entre 110 y 120 mg constituye lo que se conoce como "diabetes probable".

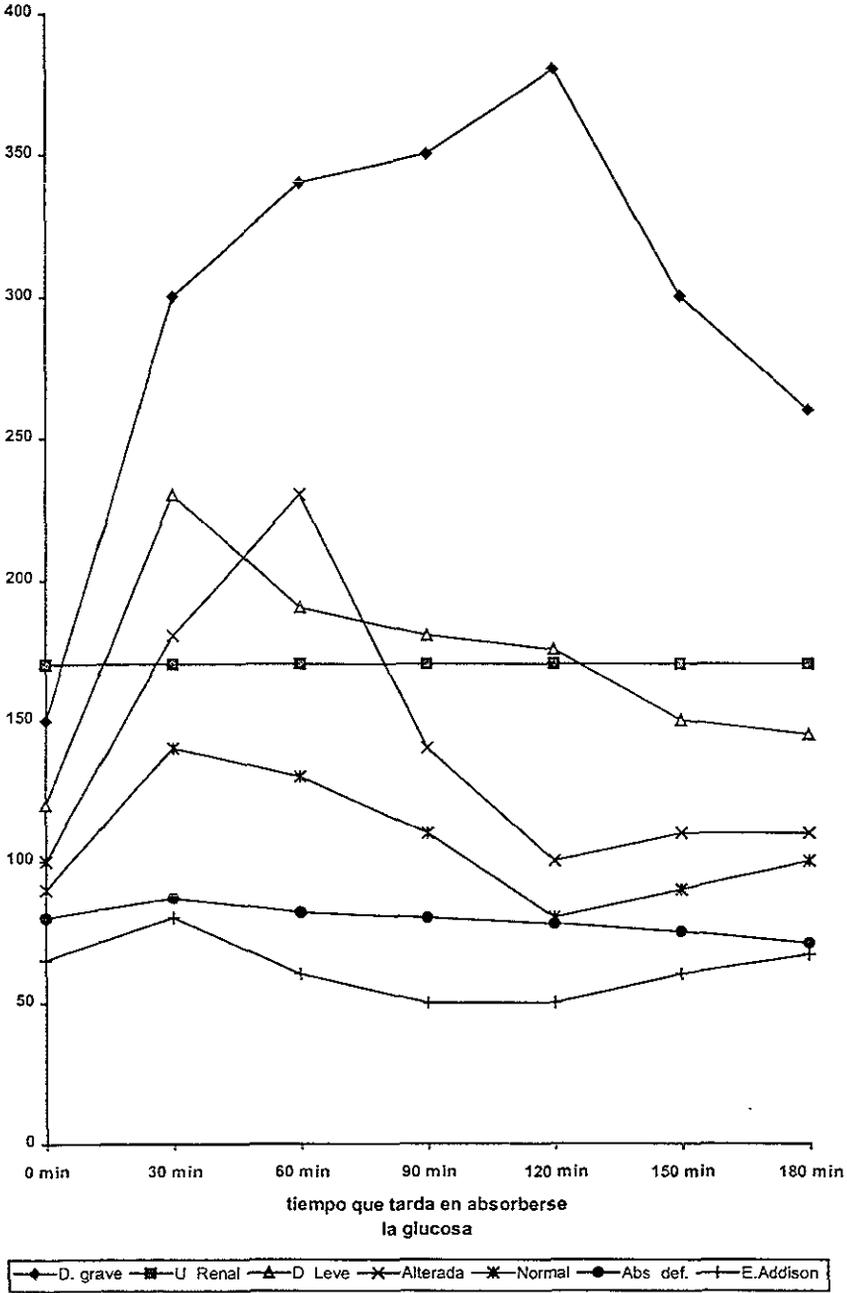
Para descartar un diagnóstico falso positivo de diabetes, en algunos casos en los cuales la curva de la POTG baja bruscamente al cabo de 1:30 hrs. y vuelve a subir por encima de los 120 mg / 100 ml a las 2 hrs., se propone para el diagnóstico de la diabetes un nivel de 140 mg / 100 ml o más a los 90 minutos después de la administración de la dosis de glucosa.

### g) Cuidados en la determinación

- ⇒ Es muy importante que el paciente siga al pie de la letra las indicaciones para someterse a la prueba de tolerancia a la glucosa
- ⇒ La prueba oral de tolerancia a la glucosa está contraindicada en los pacientes que presentan concentraciones de glucosa en ayunas o en otro momento; por encima de 200 y 300 mg / 100 ml respectivamente, dado que puede producirse un coma hiperglucémico hiperosmolar.
- ⇒ Es recomendable utilizar una de microtécnica en la oreja o en el dedo del paciente para evitar un trauma al paciente debido a las extracciones múltiples que se requieren para la prueba.
- ⇒ La administración de glucosa intravenosa para verificar las curvas, es útil cuando hay problemas de absorción intestinal, alteración hepática muy marcada y enfermedad de Addison.

mg /100 ml

Gráfica 6-1 Resultados de las pruebas de tolerancia a la glucosa por vía bucal en diversas enfermedades.



## PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPATICO (PERFIL HEPATICO)

El hígado es la víscera de mayor tamaño del organismo y su peso en el individuo adulto oscila entre 1500 y 1800 g. La mayor parte del hígado se encuentra alojado debajo de la cúpula diafragmática derecha; su cara anterior está protegida por las últimas costillas del hemitórax derecho como se muestra en la fig 7-1.<sup>20,29,30,31</sup>

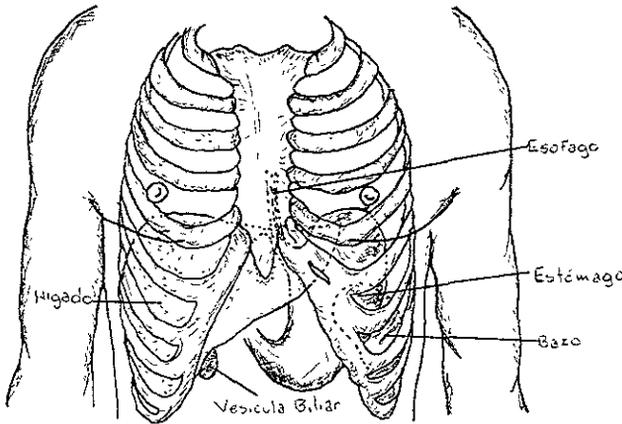


Fig. 7-1 Posición del hígado, por arriba llega hasta la quinta costilla y por abajo hasta el borde costal del lado derecho

El hígado está constituido por una masa única dividida en dos lóbulos por el ligamento falciforme: uno derecho y otro izquierdo como se muestra en la fig 7-2.

La vascularización se efectúa a través de la vena porta y la arteria hepática, la vena porta proporciona entre 65 y 85% de la sangre que llega al hígado. Estos grandes troncos sanguíneos penetran en el hígado por el hilio hepático, donde cada uno de ellos se divide en dos ramas: derecha e izquierda, destinadas a la irrigación de ambos lóbulos, en cuyo interior se realiza una sucesiva dicotomización en ramas cada vez más pequeñas que terminan en una red vascular común, (el sinusoides hepático) ver la figura 7-3 donde se muestran los vasos sanguíneos y los conductos biliares.<sup>20,29</sup>

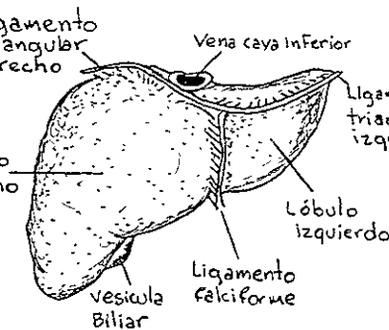


Fig.7-2 Superficie anterior del hígado

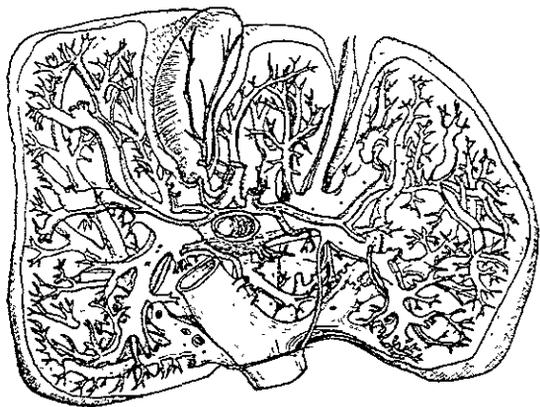


Fig.7-3 Vasos sanguíneos y conductos biliares

La unidad estructural del hígado es el lobulillo hepático; que tienen un aspecto piriforme en cuyo centro se dispone la vena central del lobulillo y en su periferia los espacios porta que contienen las ramas portal, arterial, y el conducto biliar. Entre ambos sistemas vasculares se extienden las columnas de células hepáticas (hepatocitos) y los sinusoides intercelulares, rodeados por las células fagocitarias (células de Kupffer) pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear, las ramas terminales de la vena porta y de la arteria hepática envían la sangre hacia los sinusoides y de ellos pasan a las venas centrolobulillares, debido al gradiente tensional existente entre ambos territorios sanguíneos; la masa hepática total esta formada por el conjunto de estas unidades estructurales. ver fig.7-4<sup>20,31</sup>

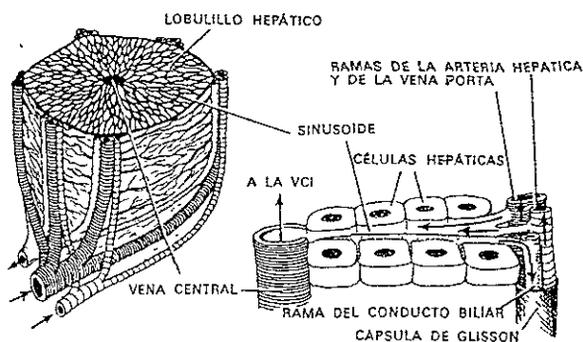


Fig. 7-4 Aspecto microscópico de un lobulillo hepático.

El hígado interviene en la mayoría de los procesos metabólicos del organismo, recibe todos los productos finales de la absorción intestinal, de proteínas, carbohidratos y lípidos, transformándolos en sustancias más complejas e indispensables en el funcionamiento normal de los seres vivos. A su vez juega un papel fundamental en la eliminación de productos tóxicos, hormonas y medicamentos por medio de la excreción biliar o por la orina; También se relaciona con el contenido normal de la sangre:

1. Formación de hematíes en la vida fetal.
2. Intervienen en la destrucción de los hematíes.
3. Almacena la hematina requerida para la maduración de nuevos hematíes.
4. Forma la mayor parte de las proteínas del plasma.
5. Elimina la bilirrubina de la sangre.
6. Interviene en la producción de protrombina y fibrinógeno.
7. Producción y almacenamiento temporal de glucógeno, hierro y vitamina A y D.
8. Formación de urea.
9. Secreción de bilis: las sales biliares son esenciales para la digestión y absorción de las grasas.
10. Regulación de la temperatura orgánica.

Las determinaciones bioquímicas que reflejan el estado de enfermedad hepática se conocen como "Pruebas de funcionamiento hepático"<sup>1,20,30</sup>

Algunas determinaciones bioquímicas son de utilidad para la detección de una enfermedad hepática como la medición de los componentes de la sangre que cuando aumentan, reflejan una lesión del hepatocito o una falta de permeabilidad de las vías biliares. Ninguna de las pruebas es suficiente para el análisis clínico de la mayoría de los problemas pues se debe seleccionar un grupo de procedimientos que sean aplicables al problema clínico particular.

1) Determinación de bilirrubinas<sup>1,22,23,24,25</sup>

Alrededor del 85% de bilirrubina se deriva de los eritrocitos "viejos" la mayor parte del resto es producida por degradación intracorpúscular de la hemoglobina de eritrocitos inmaduros en la médula ósea y otra parte de la degradación de enzimas que contienen grupo hem. La vía bioquímica para la transformación del hem en bilirrubina se representa en la figura 7-5. La bilirrubina ligada a albúmina (bilirrubina indirecta o no conjugada o liposoluble, ver fig. 7-6a) se transporta a través de la sangre hacia el hígado donde se da la separación de la albúmina y el transporte de la bilirrubina a la superficie interna de la membrana del hepatocito depende de unas proteínas de fijación situadas en la membrana. En el hepatocito la bilirrubina se fija fundamentalmente a las proteínas "ligandina" y "proteína Z", ver fig. 7-6.

En el hígado la bilirrubina se torna hidrosoluble por conjugación con glucuronato para formar monoglucuronido y diglucuronido (bilirrubina directa, ver fig 7-6b). En el intestino la acción de las enzimas bacterianas transforman la bilirrubina en varios componentes denominados "urobilinógeno".

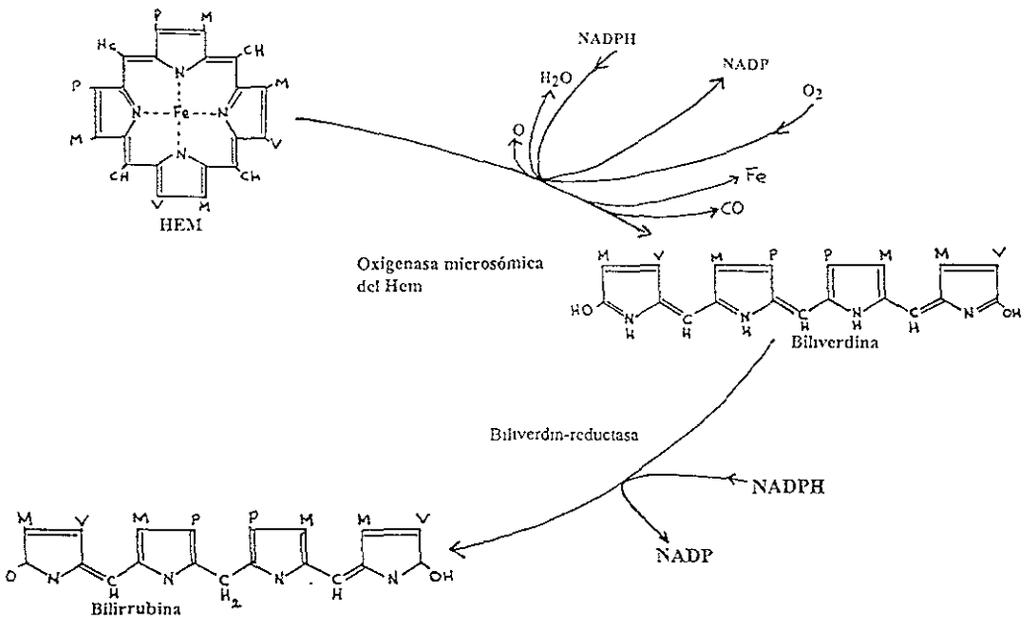


Fig. 7-5 Vía bioquímica para la transformación del hem en bilirrubina

Categoría

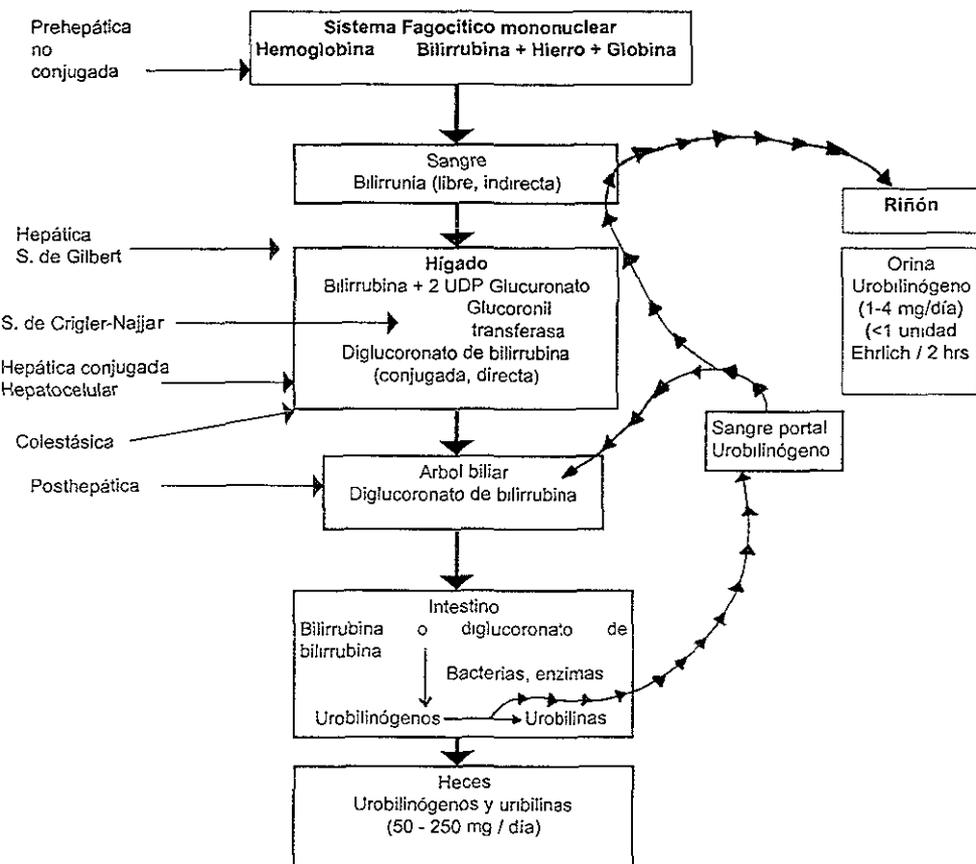


Fig. 7-6 Representación esquemática de la bilirrubina, la clasificación de la ictericia se muestra a la izquierda, las flechas apuntan al lugar del defecto biológico responsable de la correspondiente categoría de la ictericia.

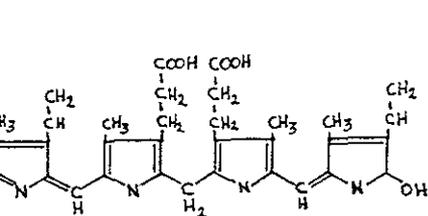


Fig. 7-6a Bilirrubina indirecta

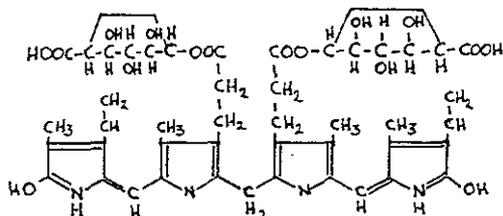


Fig. 7-6b Bilirrubina directa



### Bilirrubina directa:

La bilirrubina directa, principalmente los glucurónidos hidrosolubles de bilirrubina, reaccionan a los 5 minutos sin la adición de un acelerador. La bilirrubina libre, bajo estas condiciones, reaccionan más lentamente.

### Procedimiento

Bilirrubina directa		
Reactivos	Problema [ml]	Blanco [ml]
Acido sulfanílico	0.20	0.20
Nitrato de sodio	0.05	
Solución salina fisiológica	2.00	2.00
Suero	0.20	0.20

Mezclar bien inmediatamente, dejar en reposo temperatura entre 15°C a 25°C, a los 5 minutos exactos, tras la adición del suero, medir las Absorbancias del problema contra el blanco de reactivos) a 546 nm.

### Cálculos:

#### Medición sin blanco

$$[\text{bilirrubina total}] = (\text{Abs} - 0.015)(10.5 \text{ mg / dl})$$

#### Medición con blanco

$$[\text{bilirrubina total}] = (\text{Abs}) (10.5 \text{ mg / dl})$$

#### Medición con blanco

$$[\text{bilirrubina directa}] = (\text{Abs}) (14.0 \text{ mg / dl})$$

#### Bilirrubina indirecta

$$[\text{bilirrubina indirecta}] = [\text{bilirrubina total}] - [\text{bilirrubina directa}]$$

### e) Valores de referencia

Bilirrubina Total = Hasta 1.0 mg / dl

Bilirrubina directa = Hasta 0.25 mg / dl

Bilirrubina indirecta = Hasta 0.75 mg / dl

### f) Interpretación de resultados

Ictericia prehepática	Bilirrubina indirecta
Síndrome de Gilbert Síndrome de dubin-Johnson	Bilirrubina indirecta y ocasionalmente bilirrubina directa
Ictericia hepática Hepatitis vírica Cirrosis alcohólica	Bilirrubina indirecta y bilirrubina directa
Ictericia obstructiva	Bilirrubina indirecta

### g) Cuidados en la determinación

- ⇒ En la determinación de bilirrubina total se prepara un blanco sólo para sueros turbios.
- ⇒ Si las Absorbancias exceden 1.0 debe diluirse el suero a 1 + 5 (1:6) con solución salina fisiológica y multiplicar por 6.0 el resultado obtenido.

### 2) Determinación de enzimas transaminasas<sup>1,22,23,25</sup>

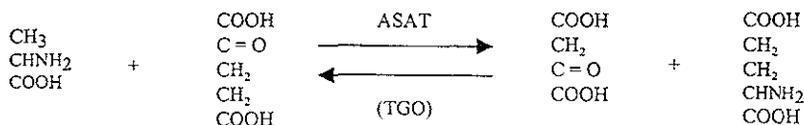
En el hígado suelen existir gran número de enzimas por múltiples reacciones metabólicas que se producen en él; las enzimas se liberan a la sangre como resultado de la lesión del hepatocito, falta de permeabilidad de las vías biliares o ambas.

La existencia de enzimas que catalizan la reacción reversible de un grupo  $\alpha$ -amino de un aminoácido a un  $\alpha$ -cetoácido, se denominaron *enzimas aminotransferasas* (transaminasas). Aunque se ha demostrado un gran número de transaminasas de sustrato específico en varios tejidos animales, sólo se han descrito dos en el suero: La *aspartato aminotransferasa (ASAT)* o *Transaminasa glutámico-oxalacética (TGO)* y la *alanín-aminotransferasa (ALAT)* o *Transaminasa glutámico-pirúvica (TGP)*.

### I) Determinación de Transaminasa glutámicooxalacética (TGO)

#### a) Principio

La determinación de TGO (ASAT) utiliza como sustrato el  $\alpha$ -cetoglutarato y el aspartato a partir de la cual se forma oxalacetato, este se mide espectrofotométricamente como su producto colorido 2,4-dinitrofenilhidrazona, al reaccionar con la 2,4-dinitrofenilhidrazina en solución alcalina y es medido entre 500 y 560 nm.



#### b) Material

Cristalería: Tubos de ensayo 13 x 100 mm  
Matraz Erlenmeyer de 50 ml  
Pipeta graduada de 1.0 y 5.0 ml

Aparatos: Espectrofotómetro

Agitador "vortex"

Centrífuga

Baño de agua con temperatura controlada

#### Material biológico

Suero fresco sin hemólisis

#### c) Reactivos y soluciones

Soln. amortiguadora de sustrato TGO:

Amortiguador de fosfatos 100 mmol / l pH 7.4

aspartato 100 mmol / l

$\alpha$ -cetoglutarato 2 mmol / l

Reactivo de coloración: 2,4-dinitrofenilhidrazina 1.5 mmol / l

Patrón: piruvato sódico 2 mmol / l

Hidróxido de sodio 0.4 N

### 3) Procedimiento

Transaminasa glutamicooxalacética (TGO)		
Reactivos	Problema (ml)	Blanco (ml)
Soln. amortiguadora de sustrato	0.5	0.5
Colocar los tubos en incubación durante 5 minutos a 37°C		
Suero	0.2	
Mezclar bien e incubar exactamente 30 minutos a 37°C		
Reactivo de coloración	0.5	0.5
Suero		0.2
Mezclar bien y dejar en reposo exactamente 20 minutos entre 15°C y 25°C		
NaOH 0.4 N	5.0	5.0
Mezclar bien, después de 5- 30 minutos medir la absorbancia a 546 nm del problema contra el blanco de reactivos.		

Cálculos: Los valores relativos a la actividad por volumen de TGO pueden medirse en la siguiente tabla:

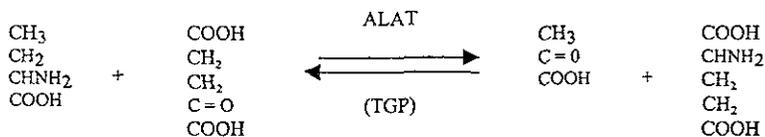
TGO (ASAT)	
Absorbancia	Uv (u / l)
0.02	03
0.04	06
0.06	10
0.08	14
0.10	18
0.12	23
0.14	28
0.16	34
0.18	41
0.20	50
0.22	60
0.24	72
0.26	86

e) Valores de referencia: 2- 19 U / L

### 4) Determinación de Transaminasa glutamicopirúvica (TGP)

#### a) Principio

La determinación de TGP (ALAT) utiliza como sustrato el  $\alpha$ -cetoglutarato y alanina a partir de la cual se forma el piruvato, este se mide espectrofotométricamente como su producto colorido, la 2,4-dinitrofenilhidrazona, al reaccionar con la 2,4-dinitrofenilhidrazina en solución alcalina y es medido entre 500 y 560 nm.



**b) Material**

Cristalería: Tubos de ensayo 13 x 100 mm  
 Matraz Erlenmeyer de 50 ml  
 Pipeta graduada de 1.0 y 5.0 ml

**Material biológico**  
 Suero fresco sin hemólisis

Aparatos: Espectrofotómetro  
 Agitador "vortex", Centrífuga  
 Baño de agua con temperatura controlada

**c) Reactivos y soluciones**

Solución amortiguadora de sustrato TGO: Amortiguador de fosfatos 100 mmol / l pH 7.4

L alanina 200 mmol / l  
 $\alpha$ -cetoglutarato 2 mmol / l

Reactivo de coloración: 2,4-dinitrofenilhidrazina 1.5 mmol / l

Patrón: piruvato sódico 2 mmol / l

Hidróxido de sodio 0.4 N

**d) Procedimiento**

Transaminasa glutamicooxalacética (TGO)		
Reactivos	Problema (ml)	Blanco (ml)
Soln. amortiguadora de sustrato	0.5	0.5
Colocar los tubos en incubación durante 5 minutos a 37°C		
Suero	0.1	
Mezclar bien e incubar exactamente 30 minutos a 37°C		
Reactivo de coloración	0.5	0.5
Suero		0.1
Mezclar bien y dejar en reposo exactamente 20 minutos entre 15°C y 25°C		
NaOH 0.4 N	5.0	5.0
Mezclar bien, después de 5- 30 minutos medir la absorbancia a 546 nm del problema contra el blanco de reactivos.		

**Cálculos:** Los valores relativos a la actividad por volumen de TGO pueden medirse en la siguiente tabla:

TGP			
Absorbancia	Uv (u / l)	Absorbancia	Uv (u / l)
0.02	03	28	43
0.04	05	30	46
0.06	08	32	50
0.08	10	34	53
0.10	13	36	57
0.12	16	38	61
0.14	19	40	65
0.16	22	42	69
0.18	26	44	74
0.20	29	46	79
0.22	32	48	84
0.24	36	50	90
0.26	39	52	98

**e) Valores de referencia:**  
 3- 17 U / L

### f) INTERPRETACION DE RESULTADOS

La determinación de la TGO junto con la TGP son de gran utilidad en el estudio y diferenciación de los padecimientos hepáticos y cardíacos.

Los trastornos hepáticos que se acompañan de necrosis celular o de alteraciones de la permeabilidad celular pueden dar lugar a la elevación de la concentración de TGO en suero. Las elevaciones de la concentración de TGO se observan en hepatitis aguda, en la que el aumento de esta enzima presenta un curso temporal semejante al de la bilirrubina.

Los enfermos con hepatitis vírica y otras formas de necrosis hepática muestran elevaciones importantes del nivel de TGP. Los valores de TGP son tan altos o más que los de TGO en la mayoría de enfermos con hepatitis, ictericia posthepática o colestasis intrahepática y son normales o están mínimamente elevados en paciente con infarto de miocardio.

Para calcular la relación entre las dos transaminasas se utiliza el Cociente de Ritis =  $TGO / TGP > 1$

### g) Recomendaciones en la determinación

**TGO:** si las observaciones sobrepasan de 0.260 (546 nm) se repite la determinación con el suero diluído 1:5 (1+4) con solución salina fisiológica y se multiplica el resultado por 5.

**TGP:** si las observaciones sobrepasan de 0.500 (546 nm) se repite la determinación con suero diluído 1:5 (1+4) con solución salina fisiológica y se multiplica el resultado por 5.

### 3) Determinación de colesterol<sup>1,7,11,22,23,24,25</sup>

La mayor parte del colesterol del cuerpo se origina por síntesis (cerca de 1 g / día) mientras que sólo aproximadamente el 0.3 gr / día se suministra en la dieta promedio; prácticamente todos los tejidos que contienen células nucleadas son capaces de sintetizar colesterol, en particular el hígado, corteza suprarrenal, piel, intestino, testículos y aorta; las fracciones microsómicas y del citosol son responsables de la síntesis del colesterol.

La acetil-CoA es la fuente de todos los átomos de carbono en el colesterol; el proceso de síntesis se realiza en varias etapas, como se muestra en la figura 7-7

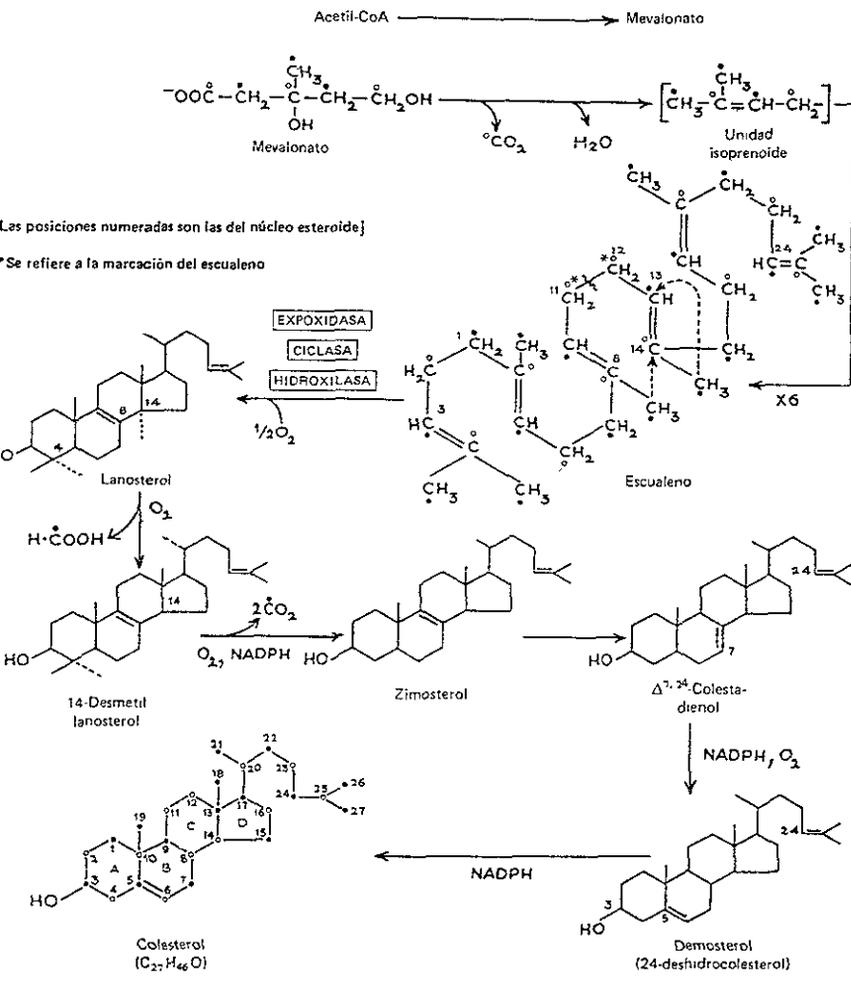


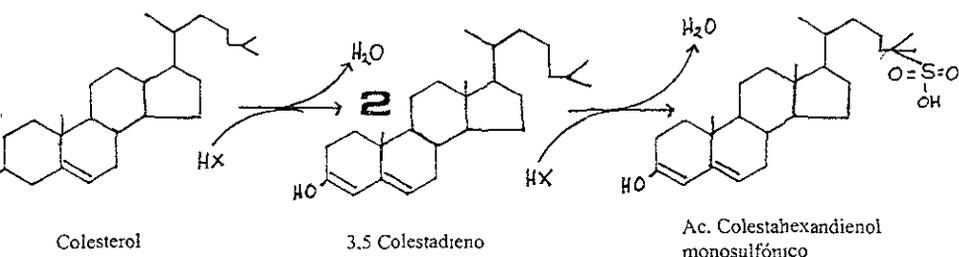
Fig. 7-7 Biosíntesis de colesterol

El colesterol es el precursor de las hormonas esteroideas y de los ácidos biliares, así, como un constituyente esencial de las membranas celulares, el colesterol es absorbido en el intestino e incorporado en los quilomicrones formados en la mucosa. Después de que los quilomicrones remanentes llevan el colesterol al hígado; algo del colesterol hepático en la bilis es resorbido del intestino.

La mayor parte del colesterol en el hígado es incorporado a la lipoproteína de muy baja densidad (LMBD); cuando la ingestión del colesterol hepático disminuye y viceversa. Sin embargo, la compensación de retroalimentación es incompleta debido a que una dieta baja en colesterol y grasas saturadas sólo lleva a una leve disminución del colesterol sanguíneo circulante.

#### a) Principio

El colesterol libre y el esterificado reaccionan con el reactivo estable de Liebermann-Burchard constituido por anhídrido acético y ácido sulfúrico. Formando un complejo de color verde (ácido colestahexanmonosulfónico), el cuál es medido espectrofotométricamente a 625 nm.



#### b) Material

Cristalería: Tubos de ensaye 13 x 100 mm  
 Pipeta graduada de 1.0 y 5.0 ml  
 Aparatos: Espectrofotómetro  
 Agitador "vortex"  
 Centrífuga  
 Baño de agua con temperatura controlada  
 Guantes de látex

**Material biológico**  
 Suero fresco sin hemólisis

#### c) Reactivos y soluciones

Reactivo de Liebermann-Burchard: Anhídrido acético 6.33 mol/l en ácido acético al 99%  
 Acido sulfúrico 95-97%

Solución patrón de colesterol 300 mg / 100 ml

Preparación de reactivo de coloración: Para series más amplias de determinaciones es conveniente preparar la cantidad correspondiente de un reactivo de coloración, mezclando previamente el anhídrido acético y ácido acético en ácido sulfúrico, antes de realizar esta mezcla debe enfriarse previamente durante 12 horas en el congelador, posteriormente añadir gota a gota con una pipeta graduada, 10 ml de ácido sulfúrico concentrado a 75 ml de la mezcla de anhídrido acético en ácido acético. Ésta mezcla se guarda entre 2 a 8°C y es estable durante 4 meses.

**d) Procedimiento**

Colesterol total		
Reactivos	Problema [ml]	Patrón [ml]
Suero	0.1	
Patrón		0.1
Reactivo de color	5.0	5.0

Mezclar bien y dejar en incubación durante 10 minutos a 37°C, leer las absorbancias del problema y patrón a 625 nm, ajustando a cero con agua destilada. El color es estable por 10 minutos.

**Cálculos:**

$$[\text{Colesterol total}] (\text{mg} / 100 \text{ ml}) = \frac{\text{Absorbancia Problema}}{\text{Absorbancia Patrón}} \times 200$$

e) Valores de referencia: Colesterol total = 150 - 250 mg / 100 ml

**f) Interpretación de resultados**

Hipercolesterolemia	Hipocolesterolemia
Condiciones fisiológicas <ul style="list-style-type: none"> <li>• Embarazo</li> <li>• Lactancia</li> <li>• Alimentación</li> </ul> Condiciones patológicas <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ictericia obstructiva</li> <li>• Coledocolitiasis</li> <li>• Hepatitis colestásica</li> <li>• Síndrome nefrótico</li> <li>• Diabetes mellitus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Condiciones fisiológica</li> <li>• Alimentación</li> </ul> Condiciones patológicas <ul style="list-style-type: none"> <li>• Origen hepático</li> <li>• Hipotiroidismo</li> <li>• Enfermedades hemáticas</li> <li>• Procesos infecciosos</li> <li>• Tratamiento con insulina</li> </ul>

**g) Cuidados en la determinación**

- ⇒ Si al adicionar el reactivo de color se presenta turbidez, agitarlo e incubar a 37°C.
- ⇒ Las lecturas deberán hacerse no más de 10 minutos, después de haber agregado el reactivo de color.
- ⇒ El reactivo de color es altamente corrosivo ya que contiene anhídrido acético, ácido acético y ácido sulfúrico.
- ⇒ La presencia de tono amarillo en el reactivo de color no interfiere con la determinación si esto ocurre, usar el reactivo de color como blanco en lugar de agua destilada.

**4) Determinación de Triglicéridos<sup>1,7,11,22,25,26,27,28</sup>**

Los triglicéridos, también llamados grasas neutras, son ésteres de ácidos grasos, glicerol y alcohol. En las grasas que se encuentran en la naturaleza la proporción de moléculas de triglicéridos que contienen el mismo residuo de ácido graso en las 3

posiciones esterificadas es muy pequeña, casi todos son acilgliceroles mixtos. La biosíntesis de los triglicéridos se especifica en la figura 7-8.

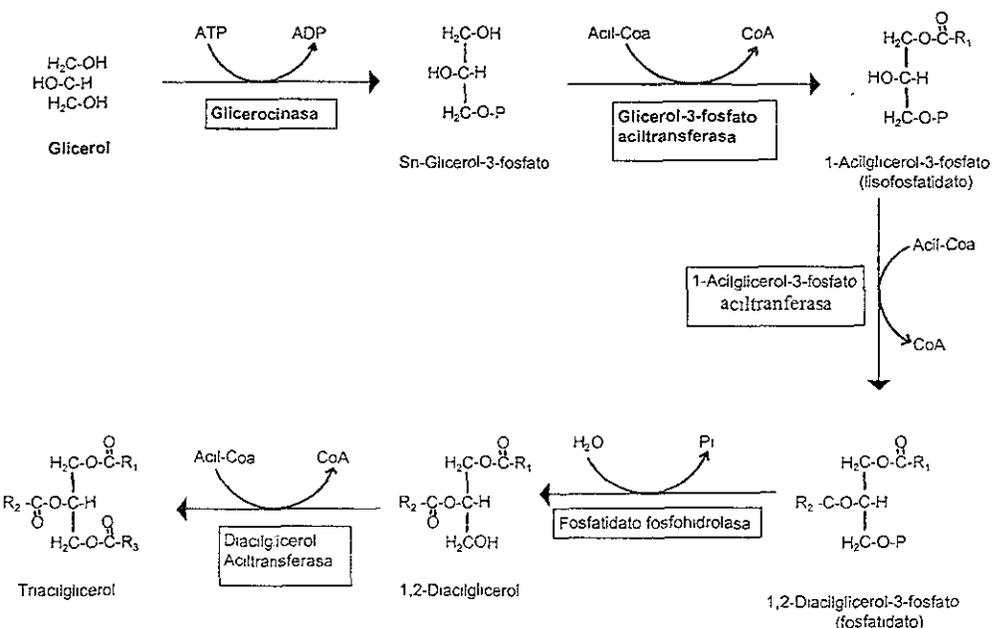


Fig. 7-8 Biosíntesis de los triacilglicéridos

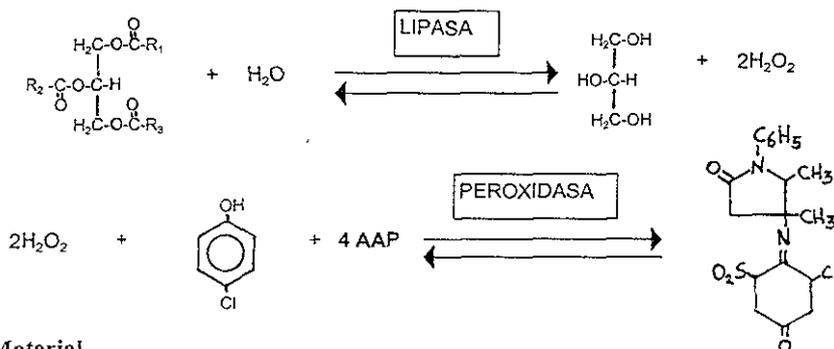
Los triglicéridos constituyen alrededor del 95% del tejido adiposo y representan la forma de almacenamiento en el humano. Los triglicéridos son transportados en el plasma fundamentalmente en forma de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (LMBD).

Los quilomicrones transportan los triglicéridos exógenos y sobre ellos actúa un grupo de enzimas llamadas Lipoproteín-lipasa (LPL); esta enzima puede ser activada por la heparina, separa los triglicéridos de los quilomicrones. Los triacilglicéridos que constituyen mayormente a las LMBD derivan de precursores tales como los carbohidratos y los ácidos grasos libres circulantes movilizadas desde el tejido adiposo. Estos triglicéridos endógenos circulan asociados con otros lípidos y los componentes proteínicos de las LMBD; su presencia imparte al plasma un aspecto opalescente y su destino metabólico es semejante al de los triglicéridos exógenos y de los quilomicrones.

Se han desarrollado una amplia gama de métodos para medir los triglicéridos plasmáticos, pero los más utilizados con fines clínicos son los basados en la hidrólisis de los triglicéridos y la determinación del glicerol liberado en la reacción. Las reacciones pueden llevarse a cabo química o enzimáticamente.

### a) Principio

Los triglicéridos se determinan en el suero después de ser hidrolizados enzimáticamente con lipasas. En la reacción se produce  $H_2O_2$  que, en presencia de Peroxidasa (POD), por reacción con 4-aminoantipirina y 4-Clorofenol se transforma en un colorante de quinonimina.



### b) Material

Cristalería: Tubos de ensayo 12 x 75 mm  
 Aparatos: Espectrofotómetro  
 Agitador "vortex"  
 Centrifuga  
 Baño de agua con temperatura controlada  
 Micropipeta graduable

**Material biológico**  
 Suero o plasma (EDTA,  
 heparina)

### c) Reactivos y soluciones

Reactivo de color: 4-aminoantipirina 0.4 mmol / l;  
 4-Clorofenol 5.0 mmol / l  
 ATP 1.0 mmol / l  
 $Mg^{2+}$  5.0 mmol / l.

Solución de enzimas-sustrato: Lipasa > 600 U / L; Glicerocinasas > 200 U / L;  
 Glicero-3-Fosfato oxidasa > 800 U / L  
 Peroxidasa > 200 U / L.

Patrón de triglicéridos: 200 mg / dl.

Preparación de la solución reactiva (reactivo de color):

Mezclar 0.45 ml de la solución de enzimas-sustrato con 15 ml del reactivo de color, dejar 30 minutos a temperatura ambiente antes de usar.

### d) Procedimiento

Reactivos	Problema [ $\mu$ l]	Patrón [ $\mu$ l]	Blanco [ $\mu$ l]
Suero o plasma	20		
Patrón		20	
Reactivo de color	2000	2000	2000

Mezclar bien y colocar a incubación durante 20 minutos a  $25^\circ C$ , Leer las Absorbancias del problema y patrón contra el blanco de reactivos a 546 nm. ajustando a cero con el blanco de reactivos. El color es estable durante 60 minutos.

## Cálculos:

$$[\text{Triglicéridos}] = \frac{\text{Absorbancia Problema}}{\text{Absorbancia Patrón}} \times 200 \text{ mg / dl}$$

## e) Valores de referencia

Sospechoso a partir de 150 mg / dl

Elevado a partir de 200 mg / dl

## f) Interpretación de resultados

Las concentraciones anormales de triglicéridos se consideran como factores de riesgo para la enfermedad coronaria aterosclerótica. Se observa un aumento importante de los triglicéridos plasmáticos en los pacientes con lipoproteinemia tipo Y y deficiencia congénita de la actividad de la enzima lipoprotein-lipasa y en los pacientes obesos que presentan hiperlipoproteinemia de tipo IV al igual que en algunas ocasiones en los pacientes que padecen el tipo III y en los diabéticos. La hipertrigliceridemia grave puede acompañarse de síntomas y signos llamativos como: dolor abdominal agudo, hepatosplenomegalia, trastornos neuromusculares y xantomatosis eruptiva.

## g) Cuidados en la determinación

⇒ El plasma o suero debe ser obtenido después de un ayuno de 12 hrs.

⇒ Para corregir el valor de glicerol libre se restan 10 mg / dl al valor de triglicéridos obtenido.

⇒ A fin de evitar contaminaciones con sustancias oxidantes o inhibitoras, se recomienda no introducir la pipeta en el frasco original, sino vaciar la cantidad requerida en otro recipiente.

## 5) Determinación de Lípidos Totales<sup>1,7,11,22,25,26,27,28</sup>

Los lípidos son un grupo heterogéneo de compuestos relacionados con los ácidos grasos, tienen la propiedad común de ser:

1. Relativamente insolubles en agua

2. Solubles en los solventes no polares como el éter, cloroformo y benceno.

Así los lípidos incluyen a grasas, aceites, ceras y compuestos relacionados, los lípidos biológicamente importantes son las grasas neutras (triglicéridos), fosfolípidos, y los esteroides. Los ácidos grasos que ocurren en la naturaleza contienen un número par de átomos de carbón; pueden ser saturados (sin doble ligadura) o no saturados (deshidrogenados con varias dobles ligaduras).

Los fosfolípidos son constituyentes de las membranas celulares, especialmente en el sistema nervioso; los esteroides incluyen a las diversas hormonas esteroideas y al colesterol; además la existencia de una fracción menor de ácidos grasos de cadena larga inesterificado (ácidos grasos libres), que da cuenta de menos del 5% de los ácidos grasos libres (AGL), es la más activa metabólicamente de los lípidos del plasma.

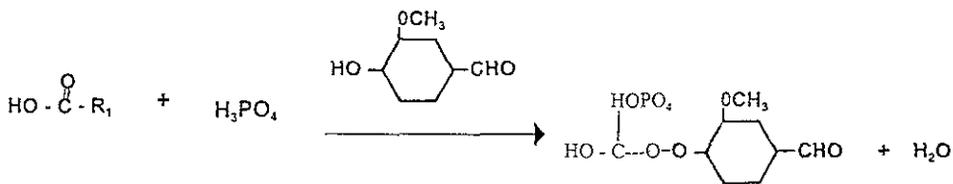
Un análisis del plasma sanguíneo que muestra las principales clases de lípidos se da en la tabla 7-1.

**Tabla 7-1 Lípidos del plasma sanguíneo del Hombre**

Lípido	[ mg / 100 ml ]	
	Promedio	Límites
Lípidos Totales	570	360 - 820
Triglicéridos:	142	80 - 180
Fosfolípidos totales	215	123 - 390
Lecitina		50 - 200
Cefalina		50 - 130
Esfingomieline		15 - 35
Colesterol Total	200	107 - 320
Colesterol libre	55	26 - 106
Ácidos grasos libres	12	6 - 16

**a) Principio**

El suero es calentado sin desproteinización previa con ácido sulfúrico concentrado y a continuación se trata con reactivo de ácido fosfórico-vainillina, en esta reacción, los lípidos del suero producen un color rosa que se determina espectrofotométricamente entre 510 y 560 nm. La concentración de lípidos totales en suero se obtiene comparando con solución patrón.



**b) Material**

Cristalería: Tubos de ensayo 13 x 100 mm  
 Pipeta graduada de 1.0 y 5.0 ml  
 Aparatos: Espectrofotómetro  
 Agitador "vortex"  
 Centrífuga  
 Baño de agua con temperatura controlada  
 Micropipeta graduable

**Material biológico**  
 Suero o plasma (EDTA,  
 heparina)

**c) Reactivos y soluciones**

Ácido sulfúrico: 95 - 97% de pureza  
 Reactivo de color: ácido fosfórico en vainillina  
 Solución Patrón de lípidos: 1000 mg / dl

#### d) Procedimiento

Reactivo	Problema [ml]	Patrón [ml]	Blanco [ml]
Suero	0.05		
Patrón		0.05	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.00	2.00	0.1
Mezclas reactivas			
Mezclar bien y calentar los tubos cerrados durante 10 minutos en agua hirviendo, dejando enfriar durante 5 minutos en agua fría; En otro tubo colocar:			
Mezcla reactiva	0.10	0.10	
Reactivo de color	2.00	2.00	2.00
Mezclar bien al cabo de 40 a 50 minutos medir a 546 nm las absorbancias del problema y del patrón contra blanco de reactivos.			

Cálculos: 
$$[\text{Lípidos totales}] = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 1000 \text{ mg / dl}$$

Valores de Referencia: 450 a 1000 mg / dl

#### f) Interpretación de resultados

La hiperlipidemia es un estado patológico que cursa silenciosamente, ejerciendo un peligro constante en el paciente que lo ignora puede ser productor de afecciones cardiovasculares, como isquemia del miocardio, arterioesclerosis local y generalizada; así como espasmos coronarios. El tipo de hiperlipidemia va a determinar el grado de riesgo en cuanto a una afección cardiovascular.

#### g) Cuidados en la determinación

⇒ Cuidar muy bien la temperatura respetando los tiempos de incubación para una buena lectura.

⇒ Preparar siempre un blanco y patrón para tener una lectura confiable.

#### 6) Determinación de Proteínas y Albúmina<sup>1,3,4,22,25,27,28</sup>

Todas las proteínas son polipéptidos de peso molecular elevado, aunque todas sean polipéptidos la mayoría contiene materiales extra que no son aminoácidos tradicionalmente, estas proteínas se conocen como proteínas complejas y aquellas que están constituidas por aminoácidos como proteínas simples.

Las proteínas se pueden clasificar de acuerdo a sus funciones biológicas, por ejemplo como proteínas estructurales, catalíticas o de transporte, anticuerpos y factores de la coagulación; se clasifican como albúminas y globulinas de acuerdo a sus propiedades de solubilidad.

La variación de los valores normales del contenido total de proteínas séricas es aproximadamente de 6 a 8 grs / 100 ml. Dentro de esta cifra a la concentración de albúmina le corresponde 3.5 a 5.0 grs / 100 ml, el resto representa las globulinas totales y es de 2 a 4.5 grs / 100 ml.

La determinación del contenido de las proteínas plasmáticas aporta información que refleja situaciones patológicas en múltiples sistemas orgánicos. La determinación fundamental de proteínas totales suele realizarse en suero ya que carece de fibrinógeno y

de cualquier anticoagulante que pueda diluir levemente las proteínas en el plasma, si bien, la determinación de proteínas totales proporciona al médico cierta información sobre el estado del paciente con respecto a su estado nutricional o a la presencia de una enfermedad como sucede en situaciones de pérdida de proteínas, los fraccionamientos posteriores aportan una información clínica mucho más precisa.

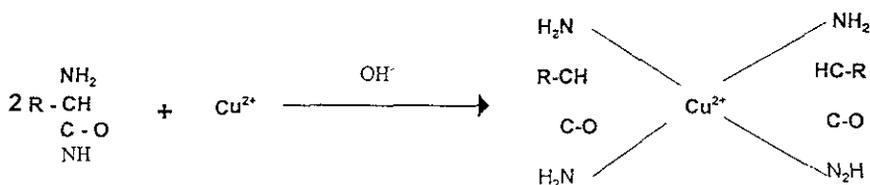
Así la cuantificación adicional de albúmina ofrece más información en relación al estado nutricional, a la capacidad sintética del hígado o a una hepatopatía con pérdida de proteínas, finalmente, la diferencia entre las proteínas totales y la albúmina informa sobre el valor de todas las globulinas, con una combinación de las otras fracciones que individualmente pueden aumentar en afecciones graves. El procedimiento clínico más generalizado para la medición de la concentración de proteínas totales en el suero sin duda es la técnica de Biuret.

La técnica para la medición de la fracción albúmina dentro de la concentración de proteínas totales son las que se basan en la fijación de colorante, la electroforesis y la inmunoprecipitación.

## Proteínas Totales

### a) Principio

Las proteínas y sus péptidos a diferencia de otros compuestos nitrogenados en solución básica, forman un complejo químico, entre el ión cúprico y los enlaces peptídicos, dando un complejo de color violeta (reacción de Biuret), con esta reacción se obtienen resultados reproducibles que coinciden con los del método de kjeldahl.



### b) Material

Cristalería: Tubos de ensaye 13 x 100 mm  
 Frasco ambar  
 Pipeta graduada de 1.0 y 5.0 ml

Aparatos: Espectrofotómetro  
 Agitador "vortex"  
 Centrifuga, cronómetro  
 Baño de agua con temperatura controlada

**Material biológico**  
 Suero fresco sin hemolizar

### c) Reactivos y soluciones

Reactivo de Biuret: Tartrato de sodio y potasio: 18 mmol / l  
 Sulfato de cobre: 12 mmol / l  
 Hidróxido de sodio: 200 mmol / l

Reactivo de referencia: Tartrato de sodio y potasio: 18 mmol / l  
 Hidróxido de sodio: 200 mmol / l

Solución patrón: 6 g. / dl

#### d) Procedimiento

Proteínas Totales			
Reactivo	Problema [ml]	Patrón [ml]	Blanco [ml]
Suero	0.05		
Patrón		0.05	
Reactivo de Biuret	2.50	2.50	2.50

Mezclar bien e incubar durante 15 minutos a 37°C, leer las absorbancias del Patrón y del Problema a 545 nm contra el Blanco de reactivos. El color es estable por 6 hrs.

Cálculos:

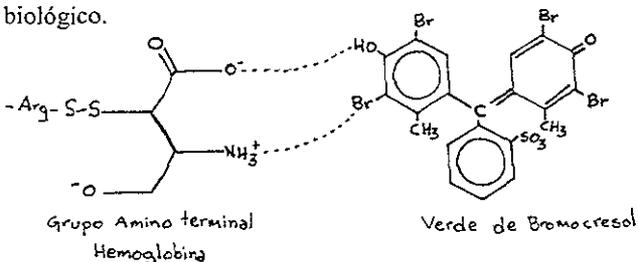
$$[\text{Proteínas Totales}] = \frac{\text{Absorbancia Problema}}{\text{Absorbancia patrón}} \times 6 \text{ grs / dl}$$

e) Valores de referencia: de 6.7 a 8.7 g / dl

#### Albúmina

##### a) Principio

Cuando la Albúmina del suero se encuentra en un medio amortiguador, a pH adecuado puede unirse por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van Der Waals a ciertos colorantes e indicadores como el verde de bromocresol, se forman complejos coloridos cuya intensidad es proporcional a la concentración de la albúmina con este medio biológico.



##### b) Material

Cristalería: Tubos de ensaye 13 x 100 mm  
Pipeta graduada de 1.0 y 5.0 ml

**Material biológico**  
Suero fresco sin hemolizar

Aparatos: Espectrofotómetro  
Agitador "vortex"  
Centrífuga, cronómetro  
Baño de agua con temperatura controlada

##### c) Reactivos y soluciones

Reactivo de color: Acido láctico: 806 mmol / l  
Verde de bromocresol: 1432 mmol / l  
Hidróxido de sodio: 5000 mmol / l  
Tween 20: 20 mmol / l

Solución patrón: 4 grs / dl

**d) Procedimiento**

Albúmina			
Reactivo	Problema [ml]	Patrón [ml]	Blanco [ml]
Suero	0.01		
Patrón		0.01	
Reactivo de color	2.50	2.50	2.50

Mezclar bien e incubar durante 15 minutos entre 15 y 25°C, leer las absorbancias del Patrón y del Problema a 630 nm contra el Blanco de reactivos. El color es estable por 6 hrs.

Cálculos:

$$[\text{Albúmina}] = \frac{\text{Absorbancia Problema}}{\text{Absorbancia patrón}} \times 4 \text{ g. / dl}$$

Cálculo de la fracción globulina

$$[\text{Globulinas}] (\text{g / dl}) = \text{Proteínas Totales} - \text{Albúmina}$$

e) Valores de referencia: de 3.6 a 5.1 g. / dl

**f) Interpretación de resultados**

El aumento en la concentración de las proteínas séricas totales o de las globulinas totales se relaciona por lo general ya sea con deshidratación o con el aumento de una de las fracciones globulínicas.

La baja concentración de las proteínas totales del suero se presenta por lo general cuando, la albúmina como las globulinas están disminuidas, por ejemplo el síndrome del nefrótico o en la desnutrición proteínica calórica.

La baja concentración de albúmina en el suero (hipoalbuminemia) puede ser el resultado de una expresión del volumen plasmático cuando la cantidad total del albúmina corporal es normal.

La hipoalbuminemia es un hallazgo característico de las enfermedades hepáticas muy evolucionadas, el síndrome del nefrótico. Las enteropatías que producen pérdida de proteínas y la desnutrición proteínica calórica.

**g) Cuidados en la determinación**

⇒ En la preparación de reactivos utilizar agua recién destilada o desionizada con pH 7.0

⇒ Si la solución presenta ligera turbidez esta no altera los resultados

⇒ La reacción de albúmina en suero es lineal hasta 5.8 grs / dl, para valores mayores debe diluirse la muestra y multiplicar el resultado por el factor de dilución.

## EXAMEN GENERAL DE ORINA (E.G.O.)

El tracto urinario como se representa en la figura 8-1, representa la vía de eliminación de los derivados metabólicos y químicos no esenciales disueltos en agua. De las estructuras que constituyen el tracto urinario, los riñones son los de mayor interés, estos poseen la notable propiedad de seleccionar y retener las sustancias esenciales, excretando al mismo tiempo los productos de desecho del metabolismo y el exceso de los ingeridos con la dieta; mantienen el equilibrio del agua y los electrolitos, contribuyendo de manera fundamental en la homeostasia acidobásica. Es por esto que los riñones no son meramente instrumentos de excreción, sino órganos esenciales para conservar productos metabólicos, que trabajan para mantener los balances de concentración electroquímicos y la integridad de los comportamientos de agua corporal.

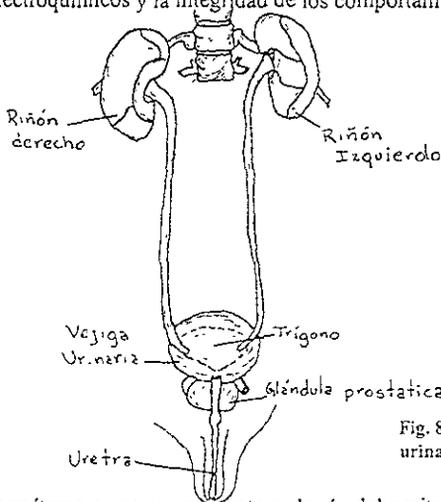


Fig. 8-1 Representación del tracto urinario.

Los riñones y uréteres en par se encuentran detrás del peritoneo parietal en la pared abdominal posterior. El riñón como se muestra en la figura 8-2 está constituido por una parte externa que consta de una corteza y de las pirámides medulares, otra parte interna formada por un grupo de tubos que crecen a partir del uretero, la médula y la corteza están constituidas por los túbulos uriníferos (las nefronas y los conductos colectores), una parte de los cuales procesa el plasma sanguíneo y otra parte añade o sustrae al filtrado resultando así la formación de la orina.<sup>1,3,31</sup>

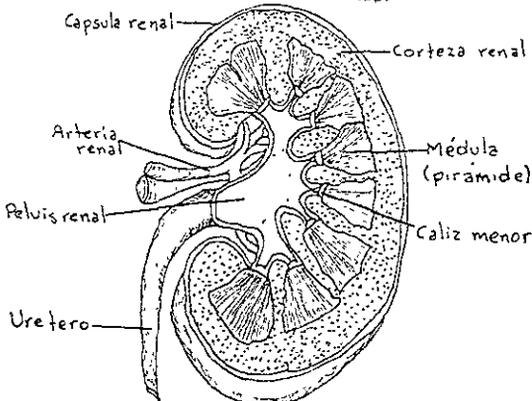


Fig. 8-2 Partes que componen el riñón

La unidad funcional del riñón es la nefrona (ver figura 8-3), de la cual hay cerca de un millón por cada uno de los riñones; cada nefrona junto con un túbulo colector forman un túbulo urinífero. En asociación con un gran número de vasos sanguíneos, estos túbulos llenan la corteza del riñón.

El plasma sanguíneo es filtrado en los capilares del glomérulo, los que poseen múltiples poros pequeños sobrepuestos en las células de la capa visceral de la cápsula de Bowman. Estas células (podocitos) tienen prolongaciones citoplasmáticas que rodean a los capilares porosos como un tejido fino separado por delgadas fisuras.

Es a través de la membrana glomerular lo que permite el paso libre de sustancias neutras hasta de 4 nm de diámetro, excluyendo casi en su totalidad aquellas con diámetros mayores de 8 nm. Sin embargo, las cargas eléctricas de las moléculas al igual que sus diámetros afectan su paso a través de la cápsula de Bowman. El promedio del área capilar en cada glomérulo es de 4.0 mm aproximadamente y el área total del endotelio capilar glomerular es de aproximadamente 0.8 mm a través de la cual ocurre la filtración hacia el espacio capsular y al túbulo proximal a un promedio de 125 ml / min / riñón.

Las células piramidales del túbulo proximal son las responsables de la absorción del 85% de NaCl y agua del filtrado, de toda la glucosa, proteínas pequeñas, aminoácidos y ciertas vitaminas. Aquí ocurre relativamente poca secreción de las células hacia el filtrado, los productos de desecho del metabolismo permanece en la luz del túbulo y continúan su viaje hacia los cálices.

El asa de Henle crea un mecanismo para aumentar la concentración de las partículas urinarias introduciendo agua a los tejidos situados entre los túbulos. La conservación del agua por el riñón es una de las funciones más críticas y para cuando el filtrado llega a los túbulos distales, cerca del 80% de la cantidad original ha sido reabsorbida por las células tubulares, fuertemente influenciadas por hormonas. Los túbulos contorneados distales y los colectores absorben la mayor parte del agua restante, de manera que el 99% del filtrado original ha regresado a los tejidos y solo el 1% pasa a los cálices menores. Los diferentes iones que se encuentran en la orina son los sobrantes de un intercambio complejo de iones entre las células tubulares, la luz tubular; los capilares vecinos y el líquido extracelular circundante.<sup>11,29,30,31</sup>

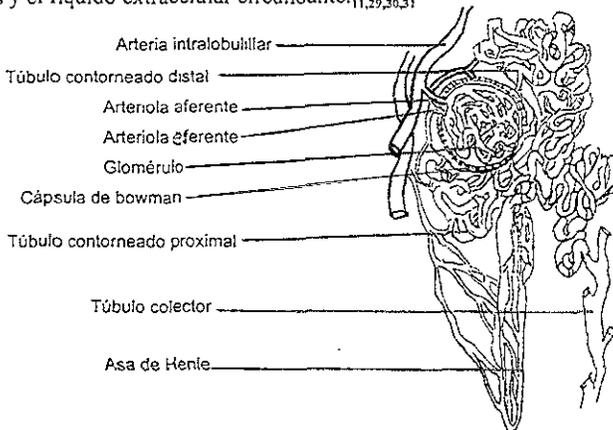


Fig. 8-3 Partes que componen la nefrona

## FORMACION DE URINA<sup>1,3,7,11,29,30,31</sup>

En el adulto normal el 25% del gasto cardíaco, es decir más de un litro de sangre pasa por los dos riñones en cada minuto y un ultrafiltrado del plasma atraviesa cada ovillo glomerular en la cápsula de Bowman, este filtrado tiene un pH de 7.4 y una osmolaridad similar a la del plasma (aproximadamente 264 mOsmol / Kg H<sub>2</sub>O).

El peso específico se encuentra al rededor de 1.007, la modificación de este filtrado que da lugar a la orina secretada se produce en los túbulos de cada nefrona, la concentración final depende del estado de hidratación.

El volumen del filtrado glomerular 180 lts / 24 hrs (para un varón de 80 Kg), pasa a ser de 1 a 2 lts, conservándose el agua y el sudor. Esto es ahora la orina que va desde los túbulos colectores hasta la pelvis renal, y de esta última a los uréteres, la vejiga y la uretra para salir al exterior.

## COMPOSICION DE LA URINA<sup>3,4,7,11</sup>

La composición de la orina normal cambia con la dieta, la actividad física y el estrés emocional. Los efectos de la resorción tubular y secreción sobre sustancias de interés fisiológico, se resumen a continuación en el cuadro 8-1.

Sustancia	Por 24 hrs.				Porcentaje	Sitio
	Filtrada	Resorbida	Secretada	Excretada	Resorbido	
Na (mEq)	26,000	25,800		150	99.4	TP,AH,TD, TC
K (mEq)	900	900	100	100	100.4	TP,TD
Cl (mEq)	18,000	17,850		150	99.2	TP,AH,TD, TC
HCO <sup>-</sup> (mEq)	4,900	4,900		000	100.0	TP,TD
Urea (mmol)	870	460		410	53.0	TP,AH,TD, TC
Creatinina (mmol)	12	1	1	12		
Ac. Úrico (mmol)	50	49	4	5	98.0	TP
Glucosa (mmol)	800	800		000	100.0	TP
Solutos tot. (mmol)	54,000	53,400	100	700	87.0	TP,AH,TD, TC
Agua (ml)	180,000	179,000		1000	99.4	TP,AH,TD, TC

Cuadro 8-1 Manejo renal de varios constituyentes plasmáticos en un adulto normal con una dieta promedio. TP (Túbulo proximal), AH (asa de Henle), TD (túbulo distal), TC (Túbulo colector).

En caso de alteración la orina puede incluir algunas proteínas, cuerpos cetónicos, hemoglobina, lípidos, bacterias, urobilinógeno, o cálculos. Así como también células epiteliales, cilindros, cristales, levaduras, contaminantes y “artefactos”.

### **RECOLECCION DE LA MUESTRA<sup>1,3,4,22</sup>**

Para el estudio rutinario de la orina, es mejor una muestra concentrada que una diluída, la concentración de solutos y de elementos formes varía a lo largo del día y depende de la ingesta de líquidos, la primera muestra de orina eliminada por la mañana al levantarse suele ser la más concentrada, ya que el paciente no ha bebido agua, en consecuencia esta muestra es la más adecuada para el estudio.

Para tomar la muestra de orina se proporciona al paciente un recipiente limpio y toallas de papel humedecidas, indicándole las siguientes instrucciones:

#### **Paciente de sexo masculino:**

1. Si el paciente no presenta circuncisión se desplaza hacia atras el prepucio.
2. Se limpia la porción anterior del glande con un papel humedecido desde el orificio uretral hacia afuera.
3. Desechar la primera porción en el orinal o en el migitorio.
4. Se recoge una muestra de 20 a 50 ml de manera que el chorro de orina caiga directamente en el recipiente y se desecha el resto de la orina.

#### **Paciente del sexo femenino:**

1. Se coloca en cuclillas o parada a horcajadas sobre el excusado.
2. Se separa los labios menores con los dedos de manera que exponga el meato uretral.
3. Se limpia la zona alrededor del meato con la toalla humedecida desde el orificio del meato hacia afuera.
4. Se orina con energía, manteniendo la separación de los labios y se desecha la porción inicial de la orina, dejándola caer en el interior del excusado.
5. Se coloca el recipiente para la recolección de la muestra bajo el chorro y se recoge de 20 a 50 ml de orina.
6. Se liberan los labios menores y se desecha el resto de la orina en el excusado.

Se debe proporcionar un embudo para que se colecten adecuadamente la muestra de orina. Durante el embarazo es difícil obtener muestras de orina libre de eritrocitos.

### **CONSERVACION DE MUESTRAS DE ORINA<sup>1,22</sup>**

Deben estudiarse muestras recientes de orina dentro de la primera hora de la micción o bien refrigerarla y estudiarla tan pronto como sea posible, esto permite conservarla prácticamente sin modificaciones de 8 a 12 hrs. En general muchas de las sustancias que se determinan así como las células y los cilindros se conservan mejor cuando la refrigeración va acompañada de un pH ácido (alrededor de 6.0) sin empleo de conservadores.

Los conservadores que se emplean para muestras de orina dependen de las sustancias que van a ser analizadas y del método que se va a emplear; en general los conservadores actúan como agentes antibacterianos, antimicóticos, los ácidos minerales y el ácido ascórbico hacen que descienda el pH.

El ácido bórico inhibe la multiplicación bacteriana, el ácido benzoico, los fenoles, el timol, el tolueno, el cloroformo, el fenol y los compuestos del mercurio evitan el crecimiento bacteriano o conservan las células.

1. **Formol (formaldehído al 40% p/v):** Ayuda a conservar los sedimentos añadiendo una gota a 10 ml de orina
2. **Timol:** Para pequeñas cantidades de orina es útil un cristal por cada 10 o 15 ml, ayuda a conservar el sedimento aunque interfiere en la determinación de proteínas.
3. **Azida de sodio (200 mg / lts):** Se utiliza para inhibir el crecimiento bacteriano de orina recogida para determinadas pruebas proteínicas.

El **Exámen General de Orina** es el conjunto de pruebas químicas y estudios que se realizan para descubrir ciertas anomalías bioquímicas e histopatológicas en este líquido.

El estudio de muestras de orina puede plantearse desde dos puntos de vista: diagnóstico y tratamiento de enfermedades metabólicas o sistémicas, no directamente relacionadas con el sistema urinario.

Los elementos del exámen general de orina incluyen la evaluación de sus características físicas (estudio macroscópico): color, olor, aspecto, medición de la densidad (refractometría), estudio químico (pH y presencia o ausencia de metabolitos), como: proteínas, glucosa, cuerpos cetónicos, bilirrubina, urobilinógeno, nitritos por medio de tiras reactivas. Así como también la evaluación microscópica del sedimento urinario que no sólo permite la posible presencia de una enfermedad renal, sino indicar también el tipo de lesión o del estado de actividad de una lesión preexistente.

## EXAMEN GENERAL DE ORINA

### ESTUDIO MACROSCOPICO

#### EXAMEN FISICO:<sup>1,22,33</sup>

##### 1.-Color

##### a) Principio

La identificación del color de la orina puede ser afectado por componentes como pigmentos, colorantes, sangre u otras sustancias y la intensidad del color normal depende de la concentración de la orina.

##### b) Material

Cristalería: Tubos de ensaye de 13 x 100 mm

Otros: Gradilla

Papel blanco tamaño carta

Guantes de látex

##### Material biológico

Orina fresca (la primera de la mañana).

##### c) Reactivos y soluciones: Ninguno

#### d) Procedimiento

1. En un tubo seco y limpio se coloca la cantidad de orina necesaria y se observa a contraluz.
2. Reportar el color como Voguel I, Voguel II y Voguel III dependiendo la intensidad del color

#### e) Valores de referencia

La orina normal concentrada tiene un color amarillo oscuro o ámbar, este color se debe sobre todo al pigmento urocromo y a pequeñas cantidades de urobilina y uroeritrina.

1. Voguel I: Color de la orina ambar
2. Voguel II: Color de la orina amarillo oscuro
3. Voguel III: Color de la orina que va desde anaranjado, café, rojizo, hasta marrón.

#### f) Interpretación de resultados

COLOR	CAUSAS
Incoloro	Orina muy diluida
Amarillo oscuro	Acriflavina
Amarillo anaranjado	Orina concentrada, exceso de urobilina, Bilirrubina
Amarillo verde	Biliverdina, bilirrubina
Rojo	Hemoglobina, hematíes, porfirinas, colorantes anilínicos, contaminación menstrual.
Rojo púrpura	Porfirina
Rojo marrón	Metahemoglobina, mioglobina.
Marrón negro	Metahemoglobina, melanina, ácido homogentísico.
Azul verdoso	Infecciones (Pseudomonas), clorofila.

#### ⇒ g) Cuidados en la determinación

⇒ No derramar la orina del tubo ya que esto implica una posible contaminación del operador y del area de trabajo.

## 2.- Aspecto<sub>1,3,4,22</sub>

### a) Principio

La orina normal de reciente emisión es usualmente clara o transparente, pero puede también tener una apariencia turbia, la cual indica alguna alteración por enfermedad.

### b) Material

Cristalería: Tubos de ensaye de 13 x 100 mm

Otros: Gradilla

Papel negro tamaño carta

Guantes de látex

### Material biológico

Orina fresca (la primera de la mañana).

### a) Reactivos y soluciones: Ninguno

#### d) Procedimiento

1. En un tubo seco y limpio se coloca la cantidad de orina necesaria y se observa a contrafondo negro.
2. Anotar la apariencia reportando si es turbio, ligeramente turbio o transparente.

#### e) Valores de referencia

La orina normal concentrada tiene un color amarillo oscuro o ámbar, cristalina o transparente, la apariencia neblinosa o turbia indica la posibilidad de algún desorden fisiológico.

#### f) Interpretación de resultados

Turbio	Lechoso
Fosfatos, carbonatos, uratos, ácido úrico, leucocitos, hematíes, bacterias, levaduras, espermatozoides, líquido prostático, mucina, hebras mucosas, cálculos, "arenillas", grumos, pus, contaminación fecal, medio de contraste radiológico.	Neutrófilos (piuria) Grasas (lipuria) Quiluria opalescente Parafina emulsionada lechosa.

#### g) Cuidados en la determinación

⇒ No derramar la orina del tubo ya que esto implica una posible contaminación del operador y del área de trabajo.

### 3.- Densidad<sup>1,3,4,12,33</sup>

#### a) Principio

La densidad y el índice de refracción permite apreciar la concentración relativa de solutos en orina. Estos datos constituyen indicadores bastante precisos del equilibrio hídrico y osmótico del organismo cuya conservación es la principal función del riñón. El índice de refracción varía de acuerdo a la concentración de los sólidos disueltos en una solución.

#### b) Material

Cristalería: Tubos de ensayo de 13 x 100 mm

Pipeta Pasteur.

Otros: Gradilla

Guantes de látex

Aparatos: Centrífuga, Refractómetro

**Material biológico**

Orina fresca (la primera de la mañana).

#### a) Reactivos y soluciones: Ninguno

#### d) Procedimiento

1. Calibrar el refractómetro con agua destilada a la temperatura de trabajo.
2. Mezclar bien la orina y colocar uno o dos gotas en la cámara limpia del refractómetro.
3. El índice de refracción se lee directamente observando el punto en el cuál la línea horizontal formada por la unión de las zonas claras y oscuras hacen intersección con la escala del aparato.

e) Valores de referencia: Densidad entre: 1.025 g/ml a 1.030 g/ml

#### f) Interpretación de resultados

Baja densidad ( $\delta$ )	Alta densidad ( $\delta$ )	Densidad constante ( $\delta$ )
Diabetes insípida	Trastornos hepáticos	Lesión renal grave
Glomerulonefritis	Insuficiencia congestiva cardíaca	
Pielonefritis		
Insuficiencia renal aguda	Deshidratación	
Alcalosis	Nefritis	
Hipercalcemia		

#### g) Cuidados en la determinación

- ⇒ No derramar la orina del tubo ya que esto implica una posible contaminación del operador y del área de trabajo.
- ⇒ Tener siempre en cuenta que la capacidad de la cámara del refractómetro no debe presentar derrames de la muestra ya que esto puede alterar la medición.
- ⇒ Enjuagar y limpiar muy bien la cámara del refractómetro para que no interfiera en siguientes lecturas.

### EXAMEN QUÍMICO<sub>1,3,34,35.</sub>

El examen químico se basa en el empleo de tiras reactivas multipruebas de lectura visual para determinar: pH, proteínas, glucosa, cuerpos cetónicos (ácido acetoacético), bilirrubina, urobilinógeno, sangre, nitritos y densidad de la orina. La lectura de la tira reactiva al tiempo exacto es esencial para obtener óptimos resultados; el empleo de orina de reciente emisión, bien mezclada y sin centrifugar es muy importante para el buen desarrollo de la prueba.

#### a) Principio

Las tiras reactivas comerciales contienen en los cojines de pruebas sustancias con las cuales las lecturas visuales son más rápidas, reduciendo el tiempo de análisis.

**pH:** Se basa en el empleo de un doble indicador que produce una gama de colores que van del anaranjado al amarillo y del verde al azul.

**Proteínas:** Se basa en el principio del error proteínico de los indicadores a un pH constante, el desarrollo de color verde es debido a la presencia de proteínas.

**Glucosa:** Esta prueba se basa en una doble reacción secuencial de enzimas: la glucosa oxidasa, que cataliza la formación de ácido glucónico y peróxido de hidrógeno a partir de la oxidación de la glucosa. La segunda enzima que actúa es la peroxidasa que cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno con un cromógeno de yoduro de potasio, el cual es oxidado produciendo colores que van del verde al café.

**Cuerpos cetónicos:** Se basa en la reacción entre el ácido acetoacético con el nitroprusiato.

**Bilirrubina:** Se basa en el acoplamiento de la bilirrubina con la dicloroanilina diazotada en medio ácido.

**Hemoglobina:** Se basa en la actividad similar que presenta la hemoglobina a la peroxidasa, la cual cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno y la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina.

**Nitritos:** Esta prueba depende de la conversión de nitrato (derivado de la dieta) a nitrito por la acción de las bacterias gram negativas presentes en la orina. Al pH ácido del área reactiva, el nitrito de la orina reacciona con el ácido p-arsanílico para formar un compuesto de diazonio, este compuesto a su vez se acopla con el 1,2,3,4-tetrahidrobenzoquinolinol, para producir un complejo color rosa.

**Urobilinógeno:** Se basa en la reacción entre el urobilinógeno con el p-dimetilaminobenzaldehído.

**Densidad:** La determinación comprende la concentración iónica de la orina y correlaciona bien con el método de refractometría. Se basa en la liberación de protones por la formación de complejos en presencia de cationes; se produce un cambio de color del indicador (azul de bromotimo!) que va del verde-azul hasta el amarillo.

#### a) Material biológico

Orina fresca de reciente emisión (la primera de la mañana)

#### c) Reactivos

Tiras reactivas comerciales con las que se puede determinar : pH, Proteínas, Glucosa, Bilirrubinas, Sangre o Hemoglobina, Nitritos, Urobilinógeno y densidad.

#### d) Procedimiento

1. Las determinaciones deben realizarse con muestras de reciente emisión, se mezcla bien antes de iniciar la prueba sin centrifugar.
2. Retirar una tira reactiva del frasco, cerrando enseguida el frasco, sumergir completamente la tira procurando que se cubran todos las áreas reactivas y retirar inmediatamente para evitar la disolución de los reactivos.
3. Eliminar el exceso de orina rasando el canto de la tira en el borde del recipiente, mantener la tira en posición horizontal para evitar la mezcla de las sustancias químicas de áreas adyacentes.
4. Comparar las áreas reactivas con los correspondientes cuadros de color en la carta de colores que acompaña al frasco a los tiempos correspondientes.
5. Sostengase la tira lo más cerca posible de la carta de colores y comparar cuidadosamente, en el tiempo que se indica evitando tocar la carta de colores con la tira, ya que esto ocasiona contaminación.

#### e) Valores de referencia

Determinación	Resultado
pH	5.0 a 9.0
Proteínas	Negativo
Glucosa	Negativo
Cuerpos cetónicos	Negativo
Bilirrubina	Negativo
Sangre	Negativo
Nitritos	Negativo
Urobilinógeno (mg / dl)	0.1 a 1.0
Densidad l. (g / ml)	1.025 a 1.030

NOTA: El reporte es cualitativo o semicuantitativo reportándose con cruces que van desde una hasta cuatro cruces como máximo.

f) Interpretación de resultados

pH ácido	pH Alcalino
Síndrome de Fanconi, alcalosis metabólica o respiratoria	Tuberculosis renal, pirexia, fenilcetonuria

<b>Proteinuria</b>	Nefropatías: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glomerulosclerosis.</li> <li>• Glomerulonefritis: aguda o crónica.</li> <li>• Riñón poliquístico.</li> <li>• Insuficiencia renal aguda o crónica.</li> <li>• Mieloma múltiple.</li> </ul>
<b>Glucosuria</b>	Diabetes sacarina Síndrome de Cushing Hipertensión intercraneal
<b>Cetonuria</b>	Diabetes sacarina. Inanición. Diarrea. Vómito.

<b>Bilirrubinuria</b>	Obstrucción de flujo biliar: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cálculos en colédoco</li> <li>• Carcinoma en páncreas</li> </ul> Fibrosis. Inflamación peritoneal. Tumefacción de los hepatocitos. Hepatitis vírica aguda Colestasis por fármacos.
<b>Hematuria</b>	Traumatismo de riñón o aparato urinario. Enfermedades hemorrágicas. Tratamiento con anticoagulantes. Esfuerzo excesivo.
<b>Bacteriuria</b>	Aumento en el número de bacterias. Aumento de reacción de nitratos a nitritos.

Urobilinógeno	
Aumentado	Disminuido
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia hemolítica.</li> <li>• Anemia perniciososa.</li> <li>• Malaria.</li> <li>• Hepatitis infecciosa.</li> <li>• Hepatitis tóxica.</li> <li>• Cirrosis portal.</li> <li>• Insuficiencia cardiaca congestiva.</li> <li>• Mononucleosis infecciosa.</li> </ul>	Obstrucción parcial o total de los conductos biliares: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Colelitiasis.</li> <li>• Enfermedades inflamatorias.</li> <li>• Enfermedades neoplásicas.</li> <li>• Terapia antibiótica..</li> </ul>

### g) Cuidados en la determinación

⇒ Existen sustancias que dan coloración normal a la orina especialmente aquellas que contienen colorantes azo, nitrofurantoína y vitaminas como la riboflavina, pueden afectar la lectura de las áreas reactivas.

⇒ El color desarrollado en las áreas reactivas puede estar enmascarado y ser interpretado como falso positivos, debido al corrimiento de la orina de las otras áreas, tener cuidado de que no se corran, manteniendo la tira en forma horizontal.. (Todas las áreas reactivas pueden leerse entre 1 y 2 minutos, después de haber sumergido la tira).

## EXAMEN MICROSCOPICO

### Sedimento Urinario<sup>1,3,4,22,33,34,35</sup>

#### a) Principio

En una muestra de orina normal recién emitida, obtenida siguiendo el procedimiento adecuado, presenta con aumento de 40X por campo microscópico los elementos formes de la orina, que pueden incluir eritrocitos, leucocitos, células epiteliales, cilindros, cristales, así como bacterias y levaduras.

#### b) Material

Cristalería: Tubos de ensayo de 13 x 100 mm

Pipeta Pasteur.

Porta y cubreobjetos

Otros: Gradilla, guantes de látex

Aparatos: Centrifuga, microscópio

#### Material biológico

Orina fresca (la primera de la mañana).

#### c) Reactivos y soluciones

El uso de colorantes para teñir la orina debe hacerse un hábito para el trabajo rutinario.

Solución de Sternheimer: Azul rápido natural (allied chemical corp. N° 1946p) en solución acuosa al 2%. Pironina B (Matheson coleman & Bell N° PB17) solución al 1.5%. Filtrar y mezclar bien la solución en partes iguales.

#### d) Procedimiento

1. Centrifugar 10 ml de orina a 2000 r.p.m. durante 15 minutos.
2. Descartar todo el sobrenadante, dejando en el tubo un volumen no mayor de 0.5 ml, mover el tubo para dispersar los elementos que quedaron acentados en el fondo del tubo .
3. Colocar una gota en el portaobjetos y cubrirlo.
4. Observar la muestra con el objetivo 40X, es necesario variar continuamente la intensidad de la luz para ayudar a localizar los diferentes tipos de elementos.

#### Tinción del sedimento

1. Añadir dos gotas de la mezcla de tinción ( solución de Sternheimer) a una gota de sedimento.
2. Colocar una gota del sedimento teñido en un portaobjetos limpio y sobre este un cubreobjetos.

c) Valores de referencia

Elemento	elemento / campo 40X
Eritrocitos	0 - 5
Leucocitos	0 - 10
Células epiteliales	Ocasionales
Cilindros	Ocasionales (hialinos)
Cristales	Ocasionales
Bacterias	0
Levaduras	0
Parásitos	0

f) Interpretación de resultados

Elemento	Resultado
Eritrocitos	El hallazgo de más de uno o dos eritrocitos por campo con objetivo seco fuerte es una condición normal. Puede indicar una variedad de enfermedad renal. También se pueden encontrar después del ejercicio exagerado, el paso de cálculos o por contaminación menstrual.
Leucocitos	En abundancia denotan inflamación de vías urinarias, especialmente cistitis y pielonefritis.
Células epiteliales	El número excesivo de células epiteliales denota la fuerte posibilidad de degeneración tubular activa en casos de necrosis tubular y de papilitis necrosante.
Cilindros	<p>Son formaciones de material proteínico compacto que suelen ser mucoproteínas de elevado peso molecular. Estos son formados en el túbulo contorneado distal y conductos colectores por aglutinación de proteínas y restos celulares.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cilindros hialinos:</b> Son pálidos, incoloros ocasionalmente refringentes, se forman del gel de proteínas que cruzan la membrana capilar glomerular, se observan en enfermedad del parénquima renal, inflamación traumática de la membrana capilar.</li> <li>• <b>Cilindros Céreos:</b> Tienen un contorno altamente refringente y una apariencia muy quebradiza. Se dan en el síndrome nefrótico, nefropatía crónica y diabetes sacarina.</li> <li>• <b>Cilindros Hemáticos:</b> Se forman en tres etapas: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Presencia de glóbulos rojos.</li> <li>2. Células de degeneración dentro de una matriz proteínica.</li> <li>3. Como cilindros sanguíneos homogéneos</li> </ol> <p>Se dan en glomerulonefritis, infarto del riñón, endocarditis bacteriana subaguda, anemia drepanocítica, escorbuto, disracias sanguíneas, hipertensión e inflamación aguda.</p> </li> <li>• <b>Cilindros Leucocitarios:</b> Están constituidos por leucocitos y se dan en pielonefritis y glomerulonefritis agudas, síndrome nefrótico, infección piógena y nefritis lúpica.</li> <li>• <b>Células epiteliales:</b> Se forman por la fusión de células tubulares descamadas. Se dan en lesión tubular renal, nefrosis, eclampsia, amiloidosis e intoxicación por metales pesados.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cilindros granulares y finos:</b> Contienen material granular homogéneo, los granulares gruesos representan las etapas iniciales degenerativas de cilindros de células epitelioideas para después degenerar en forma de gránulos finos. Estos surgen en caso de insuficiencia renal aguda o crónica, pielonefritis e intoxicación crónica por plomo.</li> </ul>
--	---

**Cristales**  
 En general la presencia de cristales en la orina reviste poca importancia clínica. Aunque en abundancia permanente pueden sugerir presencia de cálculos renales, para la identificación exacta de los cristales es importante conocer el pH, esto es útil para la separación preliminar:

ORINA ACIDA		
NOMBRE	FORMA	CARACTERISTICA
Acido úrico	Agujas, hexágonos, rosetas o placas rómbicas	Fiebre, leucemia, enfermedades tubulares renales.
Oxalato de calcio	Octahédricos, sobres de cartas	
Cistina	Hexagonales	Cistinuria, cistinosis.
Uratos amorfos (calcio, magnesio, sodio y potasio)	Gránulos amarillo pardo	
ORINA ALCALINA		
NOMBRE	FORMA	CARACTERISTICA
Fosfatos amorfos (calcio y magnesio)	Gránulos incoloros amorfos	
Fosfato cristalino (amónico-magnésico)	Prismas incoloros de tres a seis lados con extremos oblicuos que recuerdan tapas de ataúd.	Infecciones.
Carbonato de calcio	Pequeños gránulos o esferas incoloras forma parejas o dobles parejas.	

Elemento	Resultado
Bacterias	La orina normal no contiene, si se utilizó la técnica adecuada para obtener la muestra y si se protegió de una contaminación. Si hay en cantidades importantes indica infección del tracto urinario.
Levaduras	Los elementos levaduriformes indican una moniliasis urinaria especialmente en pacientes con diabetes mellitus.
Parásitos	Usualmente Trichomona vaginalis causando vaginitis.

**g) Cuidados en la determinación**

⇒ Cumplir correctamente con la técnica de recolección de orina, refrigerarla si no se trabaja de inmediato.

## MANEJO Y CUIDADO DEL MICROSCOPIO OPTICO

La invención del microscopio hacia finales del siglo XVI e inicios del siglo XVII, señala el inicio de la biología moderna. Los grandes microscopistas del siglo XVII, Leewenhock, Hooke y Swammerdan abrieron a los investigadores un campo de acción nuevo e inspeccionado haciendo retroceder las fronteras del mundo viviente hasta los límites de lo desconocido de la pequeñez, poniendo también de manifiesto el infinito poder de expansión de la vida.

El microscopio es el instrumento más importante usado en las ciencias químico-biológicas, por lo que el cuidado y uso correcto son esenciales para lograr su mejor funcionamiento.<sup>37,39,40.</sup>

### PARTES ESENCIALES DEL MICROSCOPIO.<sup>38,39.</sup>

El microscopio simple es una lente de aumento ordinario, con la cual se pueden observar pequeños objetos microscópicos. El microscopio compuesto (de la raíz *micro*=pequeño y *scopiens*=observar), difiere del microscopio simple, en que tiene dos sistemas de lentes, el primero conocido como objetivo y el otro como ocular, montado en un tubo o cuerpo del microscopio, la imagen que ve el ojo, tiene un aumento igual al producto de la multiplicación de los aumentos de los dos sistemas de lentes.

Las diferentes partes del microscopio pueden clasificarse en:

**Sistema de soporte que comprende:**

Base.

Trípode.

Revolúver.

Platina (sitio donde se coloca la muestra a observar).

Carro (permite deslizar la laminilla con la muestra).

**Sistema óptico que está constituido por una combinación de lentes:**

El primer conjunto de lentes abajo del tubo y arriba de la preparación a examinar es la lente objetivo.

El segundo conjunto de lentes está a lo alto del tubo, donde se colocan los ojos, éstas son las lentes oculares.

Entre los objetivos y oculares pueden haber lentes adicionales que desvíen la luz para permitir una visión más cómoda o que produzcan un aumento o decremento adicional del tamaño de la imagen.

**Sistema de iluminación que comprende:**

La fuente luminosa de preferencia eléctrica, permite un manejo más fácil, está representada por una lámpara integrada al microscopio de la platina, estas son generalmente lámparas de tungsteno o de cuarzo halógeno (el filamento debe estar perfectamente protegido para lograr la iluminación óptima).

El condensador, sirve para concentrar los rayos luminosos y dirigirlos hacia la preparación a examinar. Está situado entre la fuente luminosa y la platina.

El diafragma, sirve para aumentar o disminuir la cantidad de luz que pasa en el condensador. El obturador cuya apertura tiene un diámetro variable, está colocado en el condensador.

l) **Sistema de ajuste** que comprende:

1. **Tornillo de enfoque rápido (macrométrico):** Es el tornillo más grande y se utiliza primero para poner el objeto a la vista, se hace girar hasta que la imagen aparece.
2. **Tornillo de enfoque fino (micrométrico):** Es el tornillo pequeño que con un desplazamiento muy lento permite enfocar después del ajuste aproximado, obtenido con el tornillo macrométrico.
3. **Tornillo de carro móvil:** Sirve para desplazar la laminilla sobre la platina. Un tornillo desplaza de adelante hacia atrás y otro desplaza de izquierda a derecha.

La finalidad del ajuste es poner la muestra en el foco, de manera que sus bordes sean nítidos y claros, ambos tornillos de ajuste deben manejarse cuidadosamente, especialmente el micrométrico, debido a que su mecanismo es muy delicado.

### **Ajuste de un microscopio**<sup>36,37,38,39,40.</sup>

Es la puesta a punto de un microscopio para su utilización, se deben realizar tres tipos de ajuste:

1. Se debe centrar la fuente luminosa y todos los componentes sobre el eje óptico del microscopio.
2. Se debe enfocar el objetivo.
3. Se tiene que ajustar la iluminación.

En la mayoría de los microscopios de campo claro, el condensador, los objetivos y los oculares son coaxiales, de tal forma que sólo debe centrarse la fuente de luz. Esto se logra enfocando sobre el portaobjetos, quitando el ocular, mirando hacia el interior del tubo del microscopio y moviendo la fuente de luz hasta que esté en el centro del objetivo.

En el diafragma iris del condensador tiene que ajustarse siempre de tal manera que se tiene la **amplitud numérica (A.N.)** de la lente, lo cual se puede determinar mirando al interior del tubo sin ocular y observando que la lente esté completamente iluminada.

El diafragma iris de campo puede reducirse para iluminar la luz desviada y los destellos, de tal manera que sólo quede iluminada la parte del campo que contiene el objeto.

### **Enfoque de imágenes.**<sup>39</sup>

1. Con la muestra sobre la platina, hacer girar hasta su lugar el objetivo que se va a emplear, entre tanto se observa lateralmente, colocando el objetivo justamente en la posición en que se enfocará.
2. Vea por el microscopio y asegure la adecuada cantidad de luz, moviendo el condensador y el diafragma.
3. Enfoque primero con el tornillo macrométrico y luego con el micrométrico, siempre moviendo los dispositivos hacia arriba, mantenga el foco mediante el manejo continuo del tornillo micrométrico.

### **MANEJO DEL MICROSCOPIO.**<sup>38,39,40.</sup>

El esfuerzo excesivo y la fatiga deben evitarse en la observación microscópica, esto se consigue atendiendo a los siguiente hábitos:

1. El banco y la mesa deben estar a una altura que le permita al observador el uso del microscopio en posición vertical de manera comfortable.

Encender la fuente de iluminación.

Montar la preparación que se va a observar.

Separar los binoculares, adaptándolos a la forma de cada uno de los observadores.

Enfoque de imágenes: se enfoca especialmente con el objetivo seco débil, el objetivo seco fuerte y el objetivo de inmersión deberá acercarse el objetivo a la preparación lentamente para controlar su descenso hasta que la lente quede dentro de la distancia focal.

#### **Objetivo seco débil:**

Descender el condensador al fondo, bajar el objetivo hasta que quede sobre la preparación, regresar el objetivo con el macrométrico hasta que se vea la imagen clara en binoculares, mover un poco el condensador si la iluminación es insuficiente.

#### **Objetivo de inmersión:**

Colocar la laminilla perfectamente seca, colocando una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la parte a examinar, regresar el condensador al fondo, bajar el objetivo a que quede en contacto con el aceite lo más cerca posible; aclarar la imagen con el anillo micrométrico.

### **SERVACION CON EL MICROSCOPIO**<sup>36,37,38,39.</sup>

Para observar una preparación al microscopio, deberá tenerse en cuenta las siguientes precauciones:

Asegurarse de las características del preparado que va a observarse, es decir, que la muestra se encuentre montada en el portaobjetos.

Limpia la preparación con cuidado, no ejerciendo mucha fuerza sobre ella.

Antes de colocar la preparación sobre la platina del microscopio, vease contra la luz a simple vista. Hay dos motivos para ello: primeramente, el cubreobjetos puede estar lleno de polvo, sucio o cubierto de aceite endurecido, a medida que esto se hace, se podrá deducir más fácilmente cual es el origen de la preparación.

El ocular y las lentes objetivas deben estar limpias, limpiando preferentemente con papel manufacturado para este propósito.

Seleccione un campo apropiado y previa observación a objetivo seco débil, para luego observar al seco fuerte.

Para hacer una observación a inmersión, es necesario centrar primero el campo a 10X, ajustando con el micrométrico para aclarar la imagen, después a 40X y finalmente a 100X.

#### **Ángulos vistas en el microscopio:**<sup>37</sup>

En el campo microscópico los objetos deben situarse preferentemente con referencia a las manecillas del reloj.

Las imágenes vistas en el microscopio son invertidas (debida a la disposición de las lentes).

Los objetos se ven abajo del campo cuando están situados arriba.

Los objetos se ven a la derecha del campo cuando están a la izquierda.

Si la laminilla se desplaza hacia la derecha, el objeto examinado va hacia la izquierda, si la laminilla se desplaza hacia adelante, el objeto examinado va hacia atrás.

### **Cuidados que deben tenerse en el microscopio.**<sup>38,39</sup>

El microscopio es un instrumento construido para realizar un trabajo delicado y preciso, que si no se le trata con el debido cuidado, puede dañarse y darnos un rendimiento limitado; deben tenerse en cuenta los siguientes cuidados y recomendaciones:

Debe guardarse en un lugar seco y cubierto para evitar el polvo, ya que este además de dificultar la observación daña las lentes.

Al trasladarlo de un lugar a otro debe ser tomado con una mano de su brazo y con la otra, por abajo del soporte y plataforma.

Antes de usarse debe cerciorarse que las lentes estén limpias.

Cuando se usa aceite de inmersión, una vez terminada la observación hay que quitar el aceite que haya quedado en la lente.

Los objetivos, el condensador y los oculares, pueden limpiarse con agua destilada, las lentes de inmersión y parte superior del condensador con xilol, pero en pequeñas cantidades, ya que las lentes vienen montadas con bálsamo de Canadá, el cual es disuelto por el xilol.

Las partes de soporte del microscopio deben limpiarse con un trapo de algodón.

Las muestras deben estar siempre limpias, sobre todo a nivel de cubreobjetos.

### **Cuidados que dañan al microscopio.**<sup>38</sup>

Lavar las lentes oculares y de los objetivos con alcohol.

Mojar los objetivos con xilol o alcohol.

Limpia las lentes con papel ordinario.

Limpia el soporte y la platina con xilol.

Limpia las lentes interiores y objetivos con tela o papel, deben emplearse un pincel de pelo fino.

Dejar el microscopio sin sus oculares.

Guardar el microscopio con el aceite de inmersión en el objetivo.

Transportar el microscopio con una sola mano.

## **MICROSCOPIA DE LUZ (CAMPO CLARO)**

Muchas especialidades en patología clínica y desde luego anatomía patológica y las ciencias morfológicas emplean al microscopio como un instrumento fundamental de trabajo. Sin embargo el poco conocimiento que se tiene del funcionamiento de este aparato trae como consecuencia una utilización pobre o inadecuada del mismo. Este pobre conocimiento probablemente tiene su origen en el hecho de que no existen libros o artículos comprensibles para el biólogo, el médico o el químico sobre la microscopía. Los artículos especializados con sus complejas fórmulas matemáticas producen un rechazo igualmente comprensible entre los que no poseemos una capacidad cerebral apropiada para comprender dichas fórmulas.

El propósito, es explicar en un lenguaje comprensible al estudioso de las ciencias biológicas el funcionamiento del microscopio de luz ordinario (campo claro).

*Los microscopios son aparatos destinados a proporcionar imágenes amplificadas de objetos y a mostrar más detalles que los observables a simple vista.*<sup>1,2</sup>

Frecuentemente se enseña que los microscopios sirven solamente para proporcionar imágenes aumentadas de los objetos; sin embargo la utilidad de estos aparatos depende fundamentalmente de su capacidad de discriminar pequeños detalles del objeto, no observables a simple vista. De cualquier forma, para que la retina distinga estos detalles como elementos separados se necesita amplificar la imagen en mayor o menor grado.

*La capacidad de un sistema óptico (microscopio, telescopio, cámara fotográfica) de mostrar detalles de un objeto se denomina poder de resolución.*

Un sistema óptico con alto poder de resolución es aquel que puede mostrar detalles muy pequeños en un objeto. Para medir el poder de resolución se utilizan unidades de longitud. Un concepto relacionado es el límite de resolución.

*La menor distancia entre dos estructuras muy cercanas que pueden ser observadas como elementos separados con un sistema óptico se denomina límite de resolución del sistema óptico en cuestión.*

Un sistema óptico proporcionará imágenes más nítidas en resolución inversa a su límite de resolución, ésto es, mientras menor sea el límite de resolución, mayor será el detalle de las estructuras observadas. Mientras menor sea el límite de resolución de un sistema óptico, mayor será su poder de resolución.

## CONCEPTOS FUNDAMENTALES SOBRE FORMACION DE IMAGENES POR LAS LENTES

### REFRACCION<sup>40,41,42</sup>

Cuando un rayo luminoso pasa de un medio a otro, por ejemplo de aire a vidrio o de aire a agua cambia su trayectoria, a este fenómeno se le denomina *refracción*. Mientras mayor sea el índice de refracción de una sustancia, mayor será la desviación que sufra el rayo luminoso, por ejemplo, el índice de refracción del vidrio es mayor que el del agua, por lo que el vidrio desviará más un rayo luminoso proveniente del aire, que el agua. El índice de refracción del aire se considera igual a 1. Cuando un rayo luminoso incide sobre un objeto con distinto índice de refracción del medio del cual proviene, en un ángulo muy inclinado, los rayos se reflejan formando un ángulo muy inclinado, los rayos se reflejan formando un ángulo que es exactamente igual al ángulo de incidencia del rayo (ver figura 1).

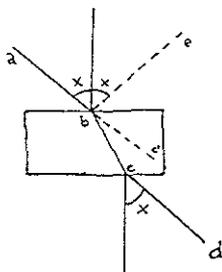


Fig. 1 Esquema que muestra un rayo luminoso viajando en el aire (ab) y pasando a un medio con índice de refracción mayor, en lugar de seguir la dirección bc' marcada con una línea punteada, el rayo se desvía (refracta) y sigue la dirección bc, marcada con línea continua al salir nuevamente vuelve, desviándose ahora en sentido inverso, dando origen al rayo cd.

### Eje óptico:

Es la línea que pasa por el centro de una lente perpendicular a su superficie (ver figura 2 EE')

### Distancia focal<sub>40,42</sub>

Cuando se hacen incidir sobre una lente rayos paralelos a su eje óptico, estos se refractan y se cruzan en un punto del eje óptico que se denomina distancia focal. (ver figura 2 f)

*Cuando frente a una lente biconvexa o un conjunto de lentes que se comporten como si fuera una sola biconvexa se coloca un objeto más alejado que la distancia focal, se obtiene una imagen real, invertida y de mayor tamaño.*

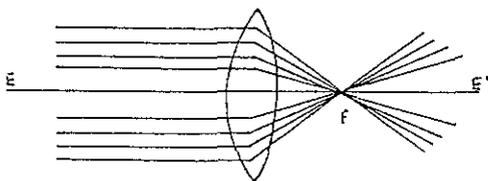


Fig. 2 Esquema que muestra una lente biconvexa. La línea recta que la atraviesa por el centro (EE') corresponde al eje óptico de la lente. Obsérvese como los rayos de luz paralelos al eje óptico son refractados por la lente y se juntan en un punto que corresponde a la distancia focal de dicha lente.

En la figura 3 la imagen formada por una lente biconvexa se puede obtener trazando los siguientes rayos:

1. Rayo VL va del vértice del objeto hacia la lente, paralelo al eje bb'.
2. Rayo Li va de la lente hacia el eje óptico atravesando el punto correspondiente a la distancia focal ( $f'$ ) y prolongándose posteriormente.
3. Rayo VI parte del vértice del objeto, cruza la porción central de la lente y se continúa hasta cruzarse con el rayo Li.
4. El rayo bb' va de la base del objeto a la base de la imagen siguiendo el eje óptico del sistema.

Obsérvese como la imagen formada es mayor e invertida con respecto al objeto original, si se sitúa una pantalla en el plano b'l se puede recoger la imagen del objeto por lo que dicha imagen es real.

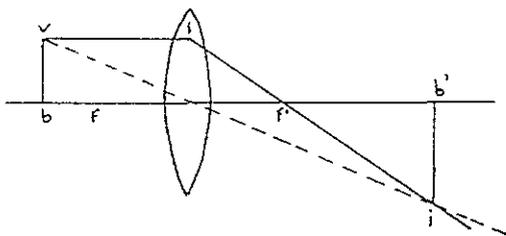


Fig.3 Formación de imágenes por una lente biconvexa, cuando el objeto se sitúa más allá de la distancia focal, la imagen formada es mayor, invertida y real, pues en el sitio en donde se forma puede ser captada por una pantalla. Es el tipo de imágenes que forma un proyector de diapositivas o la lente objetivo de un microscopio

*Cuando frente a una lente biconvexa o a un conjunto de lentes que se comporten como si fuera una sola lente biconvexa se coloca un objeto más cercano a la lente que la distancia focal, se obtiene una imagen virtual, no invertida y de mayor tamaño. 42*

En la figura 4 la imagen formada por una lente biconvexa puede obtenerse al trazar los siguientes rayos:

El rayo LE va de la lente hacia el eje óptico atravesando el punto en donde éste se cruza con la distancia focal ( $f'$ ) y prolongándose.

El rayo VC va del vértice del objeto atravesando la porción central de la lente y prolongándose.

Obsérvese como los rayos LE y VC no se cruzan pues son divergentes. Sin embargo, si los rayos se continúan del mismo lado en donde se encuentra el objeto ( $Ei'$  y  $Cl'$ ) se cruzan en el punto  $I'$  formándose una imagen de mayor tamaño, no invertida y virtual, que es de  $I'$  a  $B'$ . La imagen es virtual pues si se coloca en una pantalla en el plano  $I'B'$  no se forma una imagen alguna, sin embargo desde el lado contrario de la lente de dicha imagen puede observarse. Este es el tipo de imagen que se forma con una lupa o **microscopio simple**. En realidad la imagen se está formando en la retina del observador, pero da la impresión que se encontrara del lado de la lente contrario al observador ( $I'B'$ ).<sup>41,42</sup>

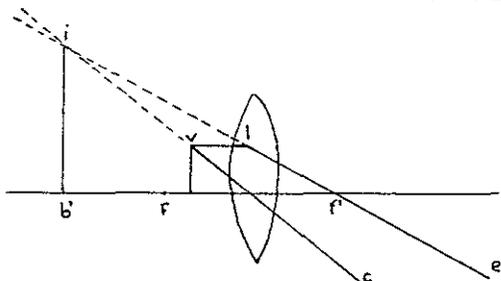


Fig.4 Formación de imágenes por una lente biconvexa, cuando el objeto se sitúa más cerca de la lente que la distancia focal, la imagen formada es mayor, no invertida y virtual, pues en el sitio en donde aparentemente se forma no puede ser captada por una pantalla. Es el tipo de imagen formada por una lupa o por el ocular del microscopio.

*En un microscopio de luz compuesto, la amplificación de la imagen se realiza en dos etapas*

El microscopio de luz puede compararse a un proyector de diapositivas. Posee una fuente de luz, un sistema que condensa los rayos luminosos sobre una preparación transparente (equivalente a la diapositiva), y lentes objetivas que proyectan la imagen amplificada (ver fig. 5a). A diferencia del proyector de diapositivas, cuya imagen es recogida en una pantalla, la imagen formada por el objetivo del microscopio se proyecta en el aire, en un punto bien definido dentro del tubo del microscopio (ver fig. 5b). La imagen formada en estos casos es mayor, invertida y real, pues el objeto (o diapositiva) se sitúa un poco más allá de la distancia focal del objetivo. La imagen es real porque puede ser captada en una pantalla colocada en el sitio donde se forma dicha imagen; de hecho si se coloca una pantalla en el interior del tubo del microscopio la imagen formada por el objetivo se proyectará en ésta.<sup>41,42,43</sup>

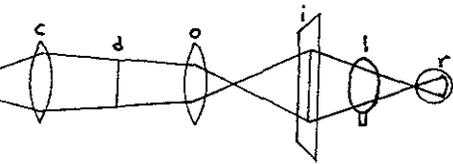


Fig.5a Esquema de un proyector de diapositivas. F: fuente luminosa; C: lente condensadora; D: diapositiva; O: lente objetivo; i: imagen primaria proyectada en una pantalla; L: lupa situada en el lado contrario de la pantalla (suponiendo que ésta fuera traslúcida), que aumenta aún más la imagen y la proyecta sobre R: retina.

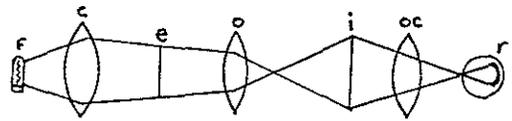


Fig.5b Esquema de un microscopio. F: fuente luminosa; C: lente condensadora; E: espécimen; O: lente objetivo; i: imagen primaria proyectada en el espacio; Oc: lente ocular que proyecta la imagen sobre R: retina

Si utilizando el proyector de diapositivas se proyectara la imagen sobre una pantalla lúcida, dicha imagen podrá ser ampliada un poco más utilizando una lupa situada del otro contrario del proyector (fig. 5a). Es así como funciona el microscopio compuesto:

El objetivo amplifica la imagen del objeto y esta imagen es virtual pues en el sitio en donde aparentemente se forma no puede ser captada con una pantalla, aunque se proyecta en la retina del observador. (la imagen primaria es utilizada a su vez como el objeto para una segunda lente (el ocular) que la amplifica nuevamente; como ahora la imagen (objeto) se sitúa más cerca al ocular que su distancia focal, se produce una imagen mayor, no invertida (aunque invertida en relación al objeto original) y virtual (ver fig. 6).<sup>41,42</sup>

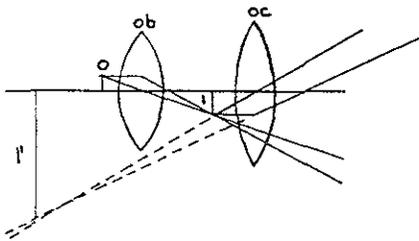


Fig. 6 Esquema de la formación de imágenes en un microscopio. Este esquema es una combinación de los esquemas 4 y 5. O: objeto; Ob: lente objetivo; i: imagen primaria (real); Oc: lente ocular; i': imagen secundaria (virtual).

El límite de resolución en el microscopio depende fundamentalmente de la lente del objetivo, los detalles obtenidos por el objetivo, es decir la calidad de la imagen, está definida por esta lente; el ocular sólo tiene la función de aumentarla, sin añadir más información sobre la estructura observada.<sup>40,42</sup>

*Los objetos que forman al microscopio se comportan como difractores de la luz*

Cuando un rayo luminoso roza el borde de un objeto se difracta, esto es, cambia de dirección, se desvía, esto puede demostrarse fácilmente de la siguiente manera:

Se oscurece una habitación y se coloca un proyector de diapositivas u otra fuente de luz en un extremo, frente al objetivo del proyector encendido se coloca un trozo de cartón con un orificio central de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, para producir un haz luminoso de pequeño diámetro.

Aproximadamente a cuatro metros de distancia se observa de frente la luz proveniente del proyector (sin una diapositiva colocada); se verá una imagen luminosa única. Si ahora se antepone al ojo un objeto formado por pequeñas rendijas, por ejemplo un tejido o un pañuelo blanco es ideal), se verá que la imagen se multiplica, pues la luz se ha desviado (difractado) al rozar los hilos del tejido (ver fig. 7). Si los hilos estuvieran situados en una sola dirección (vertical), la imagen observada sería así: (ver fig. 8)<sup>40,41,42</sup>

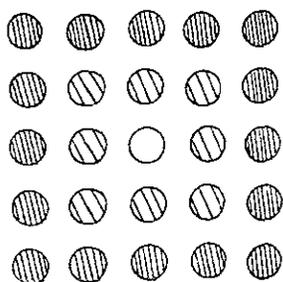


Fig. 7 Esquema que muestra el patrón de difracción producido por un tejido con hilos verticales y horizontales. Se observa una imagen más luminosa central (rayo directo), rodeada por imágenes difractadas menos luminosas a medida que se aleja del rayo directo.

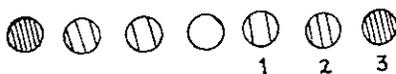


Fig. 8 Esquema que muestra el patrón de difracción producido por un tejido formado por hilos verticales. Se observa una imagen central (rayo directo) más luminosa y rayos difractados, a derecha e izquierda cada vez menos luminosos a medida que se alejan del rayo directo. Son los rayos difractados de primer, segundo y tercer orden (1, 2 y 3 respectivamente).

Al rayo que forma la imagen central se le llama rayo directo o no difractado; las imágenes que se forman a los lados provienen de rayos difractados de 1<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> orden. (ver fig. 8)

De la misma manera al atravesar la luz un tejido formado por células, las estructuras funcionan como pequeños difractores, produciéndose rayos directos y sus rayos difractados correspondientes.

*Mientras más pequeñas son las "rendijas" de un difractor, mayor es la difracción, es decir, mayor es la desviación que sufre la luz*

Este fenómeno es fundamental para comprender la formación de imágenes en el microscopio y la resolución de los objetivos.

Para rendijas (u objetos) de tamaño "X" la difracción puede ser así: (ver fig. 9a), si las rendijas (u objetos) son más pequeñas la difracción será mayor (ver fig. 9b).<sup>42</sup>

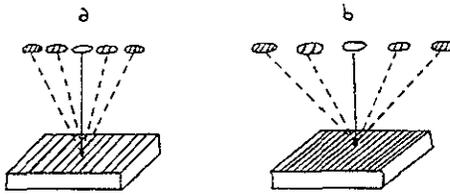


Fig. 9 En "a" se observa como un tejido formado por estructuras grandes difracta poca luz, esto es, los rayos difractados están situados más cerca de los rayos directos que por ejemplo en "b", en donde estructuras más pequeñas difractan más la luz, estando los rayos difractados más alejados de los directos.

*Los rayos luminosos pueden considerarse ondas con ciertas características (ver fig. 10)*

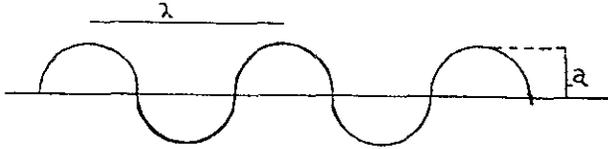


Fig. 10 Esquema de una onda luminosa. La distancia entre cresta y cresta o valle y valle corresponde a la longitud de onda de la luz ( $\lambda$ ), que determina el color de ésta. La altura de la onda (a) corresponde a la amplitud de onda, que determina la intensidad.

La radiación electromagnética tiene un amplio espectro del cual la luz visible es sólo una pequeña parte comprendida entre las longitudes de 400 a 700 nm. De éstas, las ondas de menor longitud son de color violeta; las de mayor longitud son de color rojo, el resto de los colores corresponden a las longitudes intermedias. Por arriba de los 700 nm. están las ondas infrarrojas y después las ondas de radio. Por debajo de los 400 nm. está la radiación ultravioleta y más abajo los rayos X, los rayos gama y los rayos de electrones, que tienen una longitud de onda muy pequeñas.

Así como la longitud de onda determina el color de la luz visible, la amplitud de onda determina la intensidad de la luz; mientras mayor es la amplitud, mayor es la intensidad.<sup>11,42</sup>

*Cuando dos ondas están en el mismo plano pueden interferir.*

Cuando dos ondas situadas en el mismo plano interfieren, el producto de la interferencia es la suma algebraica de las amplitudes de onda. (ver figura 11).

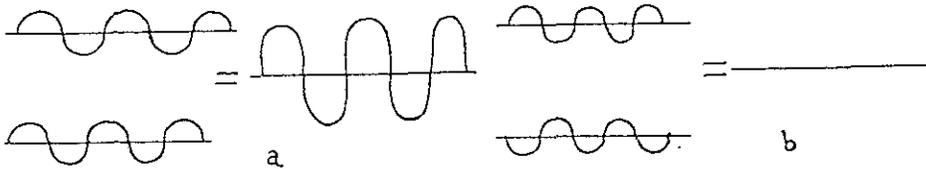


Fig. 11 Esquemas que muestran la interferencia de dos ondas, cuando éstas se encuentran en fase (las crestas de una corresponden a las crestas de la otra) la interferencia es constructiva (a). Cuando están separadas por media fase las crestas de una corresponde a los valles de la otra, la interferencia es destructiva (b).

Las ondas que están en fase (ésto es que las crestas corresponden a las crestas y los valles a los valles) interfieren constructivamente, es decir, suman sus amplitudes (fig 11a). Y que tomar en cuenta que la intensidad de la luz es directamente proporcional al cuadrado de la amplitud.

Las ondas que están desfasadas por media longitud de onda (ésto es que las crestas de una corresponden a los valles de la otra y viceversa), interfieren destructivamente, es decir, su amplitud y por lo tanto su intensidad disminuye (fig. 11b). Desde luego pueden existir infinitas combinaciones que den origen a distintos cambios de amplitud.<sup>42</sup>

*La imagen primaria de un microscopio es una imagen de interferencia de los rayos directos y los rayos difractados por el objeto.*

Cuando los rayos luminosos atraviesan el objeto examinado hemos visto que algunos siguen su trayectoria mientras que otros se difractan, ambos tipos de rayos (idealmente) van al objetivo. En el plano focal posterior del objetivo corren separados (fig. 12), pero posteriormente se reúnen en el sitio en donde se proyecta o forma la imagen primaria. Ambos tipos de rayos interfieren en este sitio para formar la imagen con sus porciones claras y oscuras. Los objetos opacos producen rayos difractados retrasados aproximadamente media longitud de onda con respecto a los rayos directos; cuando ambos interfieren dicha formación es destructiva y los objetos se ven oscuros.<sup>36,41,42</sup>

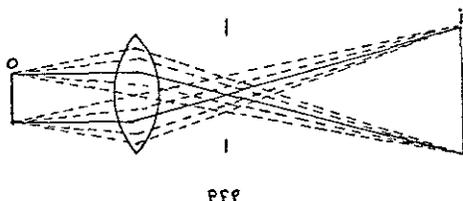


Fig.12 Esquema que muestra la marcha de los rayos directos (líneas continuas) y difractados (líneas punteadas) después de atravesar una estructura (O). Obsérvese como en el plano focal posterior del objetivo (PPF) los rayos directos y los difractados corren separados, para después reunirse e interferir en el plano en donde se forma la imagen primaria (y).

Experimentalmente se puede demostrar que los rayos difractados son indispensables para la formación de la imagen interponiendo un diafragma, en el plano focal posterior del objetivo que elimine dichos rayos, en estas condiciones la imagen microscópica no se forma.<sup>40,41,42</sup>

*Una conclusión fundamental es que para resolver una estructura se debe captar un rayo directo y por lo menos un rayo difractado por dicha estructura.*

La capacidad de un objetivo de microscopio de captar rayos difractados depende del ángulo de aceptación del objetivo para dichos rayos; mientras mayor sea dicho ángulo se podrán captar rayos más desviados.<sup>41,42</sup>

En la figura 13a el objeto está formado por estructuras muy pequeñas que difractan la luz en un ángulo tan abierto que el objetivo no puede captarlo, por lo tanto las estructuras se resuelven (no se ven como elementos separados, en la figura 13b el objeto está formado por estructuras de mayor tamaño, más separados entre sí. La difracción de la luz es menor y los rayos difractados son captados, por lo tanto las estructuras se resuelven (se ven como elementos separados); en la figura 13c las estructuras que forman el objeto son pequeñas como en la figura 13a pero el ángulo de aceptación del objetivo es mayor, por lo que se captan los rayos difractados y las estructuras se resuelven.<sup>42</sup> Por lo tanto un objetivo con gran ángulo de aceptación resolverá objetos más pequeños que uno con menor ángulo de aceptación.

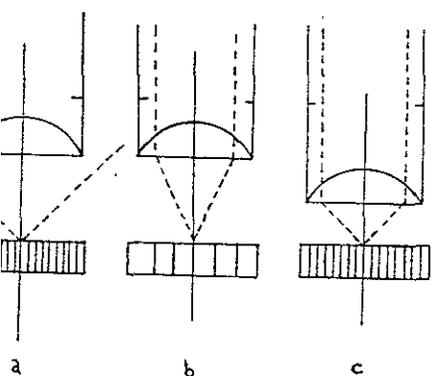


Fig.13 En "a" se observa un objeto formado por estructuras muy pequeñas; la luz se difracta en un ángulo muy abierto y los rayos difractados no pueden ser captados por el objetivo, que posee un ángulo de aceptación pequeño. En "c" las estructuras son del mismo tamaño que en "a", pero los rayos difractados pueden ser captados pues el objetivo tiene un ángulo de aceptación mayor (observe como la distancia focal es menor que en "a"). En "b", aunque el ángulo de aceptación es pequeño como en "a", los rayos difractados sí son captados pues las estructuras que los difractan son de mayor tamaño por lo que el ángulo de difracción es menor. Solamente se resuelven las estructuras en "b" y en "c" pues sólo en estos casos los rayos difractados son captados por el objetivo.

A la mitad del ángulo de aceptación se le denomina alfa ( $\alpha$ ); así un objetivo con un ángulo de aceptación de  $46^\circ$ , tendrá un  $\alpha=23^\circ$ . En la figura 14 el objetivo "b" tendrá mayor resolución que el objetivo "a".

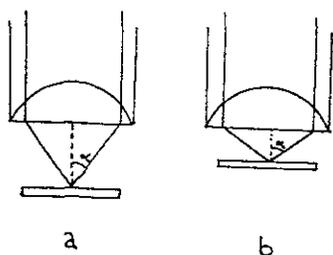


Fig.14 Se observan dos objetivos con diferente ángulo de aceptación; éste es menor en "a" que en "b", es decir, alfa no es igual en ambas condiciones. Obsérvese como en "b" la distancia del objetivo a la preparación es menor.

sin embargo experimentalmente se demuestra que la resolución no es, en forma exacta, directamente proporcional a alfa ( $\alpha$ ) sino al seno de alfa (seno  $\alpha$ ), y a este valor se le denomina apertura numérica (A.N.) del objetivo. (tabla 1)

Tabla 1. Ejemplos de ángulos de aceptación le corresponde las siguientes A.N.		
Ángulo de aceptación	alfa	seno de $\alpha=A.N.$
20°	10°	0.17
80°	40°	0.64
140°	70°	0.94

Para aprovechar la A.N. de un objetivo es fundamental la iluminación proporcionada por el condensador. Los rayos de luz llegan al objetivo en forma de un cono formado por el condensador y que se cruza en el espécimen (fig. 15).

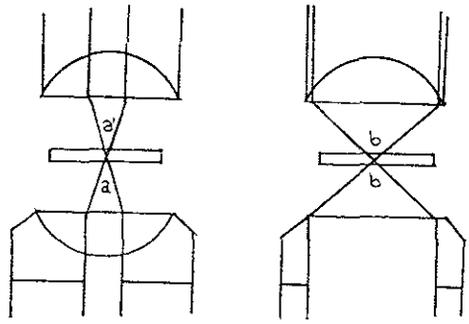


Fig.15 Se observan dos sistemas condensador/objetivo. Nótese como el cono de luz formado por el condensador es similar al captado por el objetivo, menor en  $aa'$  y mayor en  $bb'$ , puesto que en  $aa'$  el diafragma del condensador está más cerrado.

A la mitad del ángulo de los rayos que emergen del condensador se le denomina " $\beta$ " (fig. 16) y el seno de  $\beta$  corresponde a la A.N. del condensador. Los rayos más periféricos del condensador tienen un papel fundamental en la formación de la imagen, ya que los rayos difractados provenientes de estructuras iluminadas por aquéllos pueden entrar al objetivo aunque su ángulo de aceptación no sea muy alto. Por ejemplo, un rayo directo proveniente del objetivo y situado en el eje óptico dará origen a rayos difractados que no son captados por el objetivo (fig. 17a); en cambio un rayo directo proveniente de la porción periférica del condensador dará origen a un rayo difractado que sale por fuera del objetivo y un rayo difractado que entra en aquél, al igual que lo hace el rayo directo, por lo que la estructura iluminada puede resolverse (fig 17b).<sup>41,42</sup>

*A diferencia de la mayor parte de los objetivos a la A.N. del condensador es variable, dependiendo de que tan abierto o cerrado esté el diafragma del condensador, situado en el plano focal de éste. (fig. 15 y 16)*

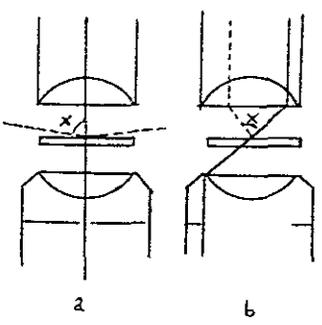
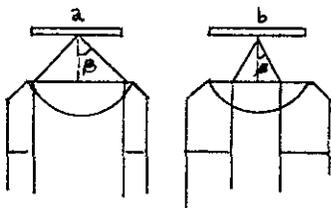


Fig.17 En "a" el diafragma de condensador está cerrado, el rayo directo es coincidente con el eje óptico; los rayos difractados están muy inclinados y no pueden penetrar al objetivo por lo que la estructura no se resuelve. En "b" el rayo directo proviene de la porción periférica del condensador, llega muy inclinado a la preparación y aunque el rayo difractado del lado derecho no logra entrar al objetivo, el rayo difractado del lado izquierdo sí lo hace, resolviéndose entonces la estructura. Nótese como los ángulos "X" en los dos casos son iguales.

Fig.16 Se observan dos conos de luz con diferente ángulo formados por el condensador. El ángulo  $\beta$  es mayor en "a" porque el diafragma está más abierto que en "b"



En la figura 16b el diafragma está más cerrado y  $\beta$  es menor que en 16a, en donde el diafragma está totalmente abierto. El diafragma es necesario para adecuar la amplitud numérica del objetivo en uso; si el objetivo tiene una amplitud numérica elevada el diafragma del condensador deberá abrirse más que si tiene una amplitud numérica baja. Si el diafragma del condensador se cierra, el contraste y la profundidad del foco aumentan, pero disminuye la amplitud numérica utilizable del objetivo y por lo tanto disminuye la resolución.<sup>41,42</sup>

En 15a el condensador está parcialmente cerrado y no permite la utilización de la amplitud numérica total de objetivo pues sólo entra a éste un cono reducido de rayos, reduciéndose la resolución.<sup>42</sup>

En 15b el condensador tiene amplitud numérica similar a la del objetivo: en la práctica el condensador debe tener una amplitud numérica que sea aproximadamente el 70% de la del objetivo en uso; aunque esto disminuye un poco la amplitud numérica utilizable del objetivo y por lo tanto la resolución, aumenta el contraste y en estas condiciones se obtienen las imágenes más nítidas.<sup>41,42</sup>

*Para una misma estructura, la luz se difracta más mientras mayor sea su longitud de onda.*

Esto quiere decir que los rayos rojos se difractan más que por ejemplo los azules o los violetas (fig. 18).

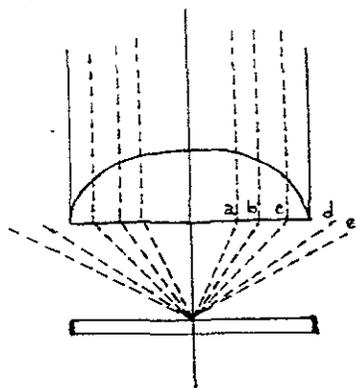


Fig.18 Cuando se produce el fenómeno de difracción de rayos en la preparación, los rayos de menor longitud de onda (a) se difractan menos que los de mayor longitud de onda (e), pudiéndose captar más fácilmente los primeros; el resto de los rayos se encuentran en posiciones intermedias.

La consecuencia práctica es que será más fácil resolver una estructura iluminada con la luz azul que con luz roja. Dicho de otra manera, mientras menor sea la longitud de onda empleada para iluminar un objeto, menos serán captados por un objetivo, resolviéndose con mayor facilidad una estructura, para amplitudes numéricas iguales se resolverán

estructuras más pequeñas mientras menor sea la longitud de onda empleada. Esto tiene su explicación más espectacular en el microscopio electrónico de transmisión en el que se ilumina el objeto con un rayo de electrones que posee una longitud de onda muy pequeña (aproximadamente 1/10,000 de la longitud de onda de la luz), a pesar de que la amplitud numérica de las lentes electromagnéticas utilizadas en el microscopio electrónico no es alta, se alcanzan resoluciones 2000 veces mayores que con el microscopio de luz.<sup>40,41,42</sup>

Como hemos visto el tamaño de un objeto que se puede resolver con un sistema óptico depende de dos factores, la longitud de onda de la energía empleada para iluminar el objeto (entre 400 y 700 nm para la luz visible), y la amplitud numérica del sistema objetivo / condensador, el tamaño de los objetos resueltos es directamente proporcional a la longitud de onda e inversamente proporcional a la amplitud numérica. Esto quiere decir que la mínima distancia entre dos objetos resueltos será más pequeña mientras menor sea la longitud de onda utilizada para iluminarlo, y más pequeñas mientras mayor sea la amplitud numérica (del objetivo y del condensador).<sup>41,42</sup>

Por lo tanto, la fórmula para calcular la mínima distancia entre dos objetos resueltos por un sistema objetivo / condensador (*límite de resolución*), será:

$$\text{Límite de resolución} = \frac{\text{Longitud de onda}}{\text{Amplitud numérica del objetivo} + \text{Amplitud numérica del condensador}}$$

Si se ilumina con luz blanca que es una combinación de distintas longitudes de onda, puede utilizarse para los cálculos de longitud de onda de la luz verde (550 nm.) En la tabla 2 se muestran los siguientes ejemplos:

Objetivo (aumento)	Amplitud numérica del objetivo	Amplitud numérica del condensador	Límite de resolución
10 X	0.25	70% de 0.25	1,294 nm
40 X	0.65	70% de 0.65	498 nm
63 X	1.40	70% de 1.40	231 nm
100 X	1.30	70% de 1.30	248 nm

Tabla 2. Ejemplos de aumento de objetivos su amplitud numérica y su límite de resolución

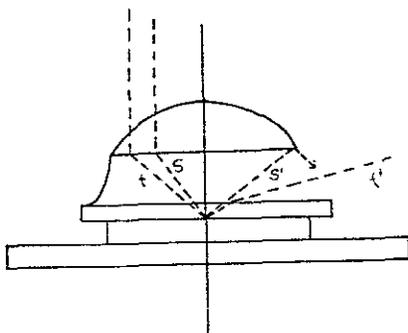
Es muy común que surja la pregunta ¿Cómo es posible tener una amplitud numérica mayor de 1, si el seno de 90° es 1 y alfa no puede ser ni siquiera de 90° (fig. 17a).

La respuesta es que para que objetivos “secos”, es decir que no utilizan ningún fluido entre la preparación y el objetivo, la amplitud numérica es el seno de alfa multiplicado por el índice de refracción del medio entre preparación y objetivo, como este medio es el aire que tiene un índice de refracción de 1, la amplitud numérica será simplemente el seno de alfa; sin embargo, cuando se coloca una sustancia como agua, o aceite de inmersión entre la preparación y el objetivo (especialmente diseñado para este uso), para obtener la amplitud numérica, el seno de alfa debe multiplicarse por el índice de refracción de la sustancia empleada.<sup>40,41,42</sup>

El índice de refracción del agua es de 1.333, el índice de refracción del aceite de inmersión es de 1.520. Así si un objetivo de inmersión en aceite tiene un ángulo de rotación de  $140^\circ$ ,  $\alpha$  será de  $70^\circ$  y el seno de  $70^\circ$  es de 0.94, que multiplicado por 1.52 da una amplitud numérica de 1.40.<sup>36,40,41,42</sup>

Otra pregunta condicionada es ¿Porqué un medio con índice de refracción (IR) mayor que el aire aumenta la amplitud numérica?, sencillamente porque aumenta el número de rayos difractados que pueden entrar al objetivo.<sup>42</sup>

En la figura 19s se observa como los rayos muy inclinados con respecto al eje óptico objetivo se reflejan al pasar del aire al vidrio, al agregar aceite de inmersión dichos rayos pueden entrar al objetivo. (ver figura 19)



En el lado derecho del esquema del objetivo se observa la trayectoria de los rayos en el aire, después de difractarse en la preparación. Obsérvese como  $s'$  se refleja y  $t'$  ni siquiera puede incidir en el objetivo. En el lado izquierdo, con un medio de inmersión, ambos rayos penetran en el vidrio, aumentándose por lo tanto la capacidad de resolución del sistema

Explicaremos esto con más detalle, cuando los rayos llegan muy inclinados a la interfase entre dos medios con diferente índice de refracción, en lugar de pasar al otro medio y refractarse, se reflejan, el ángulo máximo con el que pueden llegar los rayos a una interfase sin reflejarse se denomina **ángulo crítico**, más allá de este ángulo todos los rayos se reflejan. Sin embargo, si existe, como en nuestro ejemplo, en lugar de aire un medio con un índice de refracción similar al del vidrio, se elimina la interfase (es decir, el aceite funciona como una continuación del vidrio entre objetivo y preparación) y los rayos llegan con un ángulo mayor que el crítico pueden pasar al objetivo sin dificultad (fig. 19s). De igual manera, los rayos que saldrían muy desviados de la preparación, al pasar del vidrio de ésta al aire (fig. 19t'), se desviarán menos si pasan a un medio con índice de refracción similar al vidrio y podrán ser captados por el objetivo (fig. 19t).<sup>41,42</sup>

**En la práctica la máxima amplitud numérica obtenible con objetivos secos es de 0.95, con objetivos de inmersión en aceite se puede aumentar hasta 1.40.**

De igual manera, en el caso del condensador la mayor amplitud numérica obtenible con condensador "seco" es de 0.95, sin embargo utilizando aceite de inmersión entre el condensador (especialmente diseñado) y la preparación se logran amplitudes numéricas de

40 que son necesarias para formar conos de luz con un ángulo suficientemente grande para permitir el uso de objetivos con amplitud numérica de 1.40 (fig. 20). Obsérvese como un condensador seco los rayos muy tangenciales se reflejan en la interfase con el portaobjetos (fig. 20s), pero son perfectamente utilizables en un condensador de inmersión (fig. 20i).<sup>42</sup>

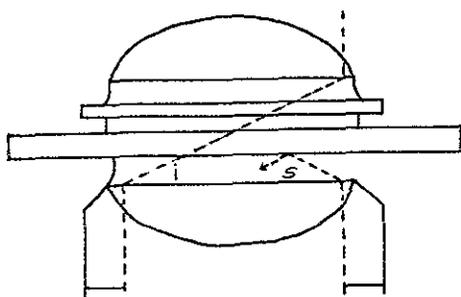


Fig.20 En un condensador seco (lado derecho) los rayos muy tangenciales "s" se reflejan en el portaobjetos no pudiéndose utilizar para la formación de la imagen. En un condensador de inmersión (lado izquierdo) los rayos pasan directamente al portaobjetos, pudiéndose utilizar la A.N. total del condensador

#### Aberraciones de las lentes

*Una aberración es la diferencia entre la imagen formada por una lente y la imagen ópticamente esperada.*

Como la amplitud numérica con la que se puede construir una lente y por lo tanto su resolución, está severamente limitada por la aberración cromática veremos lo siguiente:

La luz "blanca" está constituida por rayos de diferentes longitudes de onda y por lo tanto de diferente color, desde el rojo hasta el violeta. Cuando un rayo de luz "blanca" pasa del aire a un medio de índice de refracción diferente, por ejemplo un prisma de vidrio, los diferentes colores se refractan en distintos ángulos formando el conocido "espectro luminoso". Los rayos más refractados son los violetas y azules, los que menos lo hace son los rojos, con los otros colores en posiciones intermedias (no confundir con el fenómeno de difracción en el que los rayos más difractados son los rojos). Esto mismo sucede con la luz blanca que atraviesa una lente de vidrio, en la figura 21 se observa como los rayos azules se refractan más que los verdes (V) y éstos más que los rojos (r), existiendo entonces distintos focos para todo el espectro visible); por lo tanto, una estructura "X" formará imágenes en diferentes puntos del eje óptico (fig 22); esto se denomina **aberración cromática longitudinal** (fig. 22x). Además las imágenes formadas tendrán diferente tamaño, lo que se denomina **aberración cromática lateral** (fig. 22y); otra forma de esquematizar esto se muestra en la figura 23 en donde "L" es la lente, "o" el objeto, "a" la imagen formada a partir del "foco para rayos verdes" y "r" la imagen formada a partir del "foco para rayos rojos". En este esquema las imágenes se observan de perfil, pero en la realidad las distintas imágenes formadas por los diferentes rayos con distancia longitudinal y onda se encontrarán superpuestas, como su tamaño es distinto, se observará una imagen con halos de distintos colores; dichos halos, al superponerse, ocasionarán que dos puntos muy cercanos se confundan y no se observen como elementos separados, disminuyéndose considerablemente la resolución (fig. 24).<sup>40,41,42</sup>

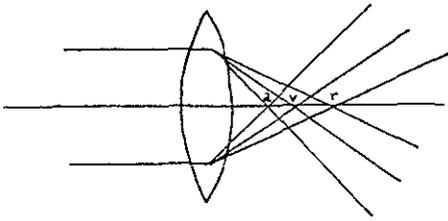


Fig.21 Los rayos de menor longitud de onda se refractan más que los de mayor longitud de onda, por lo que en este sistema, los focos para los rayos azules "a", verdes "v" y rojos "r", se producen en puntos diferentes.

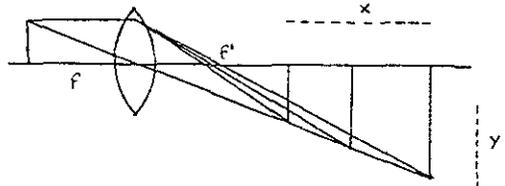


Fig. 22 En el esquema se advierte como si existen focos distintos para diferentes colores, se formarán varias imágenes de diferentes tamaños y a distinta distancia de la lente.

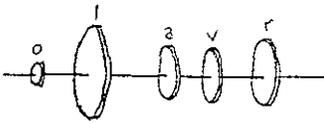


Fig.23 El mismo esquema anterior de una manera más esquemática. Una estructura circular producirá imágenes circulares de distinto aumento y color, situadas en planos distintos.

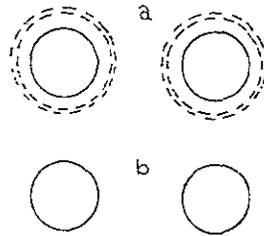


Fig. 24 La imagen anterior vista de frente. En "a" se observan varias imágenes circulares concéntricas de distintos tamaños que al superponerse impiden la resolución de las estructuras individuales originales. En "b" si no hubiera aberración cromática se verían imágenes circulares perfectamente discernibles.

En los primeros aparatos ópticos en los que se corrigió la aberración cromática fue en los telescopios utilizando dos lentes adyacentes, una convexa y la otra cóncava, construidas con diferentes tipos de vidrio (crown y flint) con distintas características de refracción (fig 25), el primer lente producía cierta aberración cromática, pero el segundo producía la aberración cromática inversa, compensando o neutralizando la del primerio. Este conjunto de dos lentes se llamó **doblete acromático** y en el siglo XIX fué incorporado a los objetivos de los microscopios, disminuyendose así notablemente la aberración cromática y empezandose a fabricar lentes con mayores amplitudes numéricas, con el consiguiente aumento en la resolución. En la actualidad aún los objetivos más simples y baratos están corregidos de esta manera y se denominan **acromáticos**.<sup>36,40,41,42</sup>

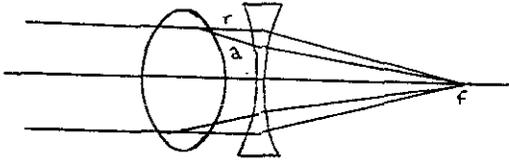


Fig. 25 Doblete acromático formado por una lente biconvexa gruesa y una bicóncava delgada, con diferentes índices de refracción. El rayo "a" (azul) se refracta más hacia el centro, pero esta desviación es compensada por la lente bicóncava; el rayo "r" (rojo) se refracta más hacia la periferia, pero esta desviación es compensada nuevamente por la bicóncava. El resultado final es que ambos colores se juntan en un sólo punto obteniéndose un sistema con un sólo foco y eliminándose la aberración cromática.

A pesar de lo que pareciera indicar el término acromático, estos objetivos poseen cierto grado de aberración acromática (sólo están corregidos para dos colores) que limita su resolución por lo que se han diseñado objetivos cada vez con menor aberración cromática (lo que implica un aumento importante en el número de lentes), pudiéndose así construir objetivos con amplitudes numéricas mayores y por lo tanto con mejor resolución.<sup>41,42</sup>

Desde el punto de vista de su aberración cromática los objetivos actuales se pueden dividir en tres grupos:

Acromáticos	Semiapocromáticos	Apocromáticos
Corrección parcial de la aberración cromática (dos colores).	("Fluoritas") mayor corrección de la aberración cromática que los anteriores.	Corrección prácticamente total de la aberración cromática (tres colores).

La corrección en los últimos dos objetivos se logra añadiendo lentes que corrigen las aberraciones que aún quedan de las anteriores. Algunas de las lentes utilizadas son de fluorita. De ahí el nombre de "fluoritas" para los objetivos semiapocromáticos (los apocromáticos también poseen elementos de fluorita).

En general se puede decir que para un mismo aumento un objetivo acromático tendrá menor amplitud numérica que un semiapocromático y éste a su vez menor amplitud numérica que un apocromático, la buena corrección de la aberración cromática y las altas aperturas numéricas van de la mano.<sup>42</sup>

#### Aberración esférica.<sup>36,37,40,41,42</sup>

Este tipo de aberración consiste en que los rayos que pasan por la parte periférica de una lente no forman una imagen en el mismo punto que aquellos que pasan por el centro. En un objetivo microscópico el resultado es que al enfocar una imagen, esta tendrá poco contraste pues las diferentes partes de ella se enfocarán en distintos puntos. Para corregir

Este defecto se utilizan lentes adicionales que, como en el caso de la aberración cromática, producen aberraciones pero de sentido inverso que compensan a las aberraciones originales.

### Aberración de planicidad de campo.<sup>40,41,42</sup>

El resultado de esta aberración es que al enfocar la porción central de la imagen la periferia se observa desenfocada y viceversa (fig. 26). Los objetivos corregidos para esta aberración se denomina "Plan" y existen en tres variedades dependiendo de su corrección de la aberración cromática: Planocromáticos, Plansemiapocromáticos y Apocromáticos. Estos últimos, los más finos que se producen en la actualidad, corrigen también otras aberraciones no mencionadas aquí como la aberración de coma.

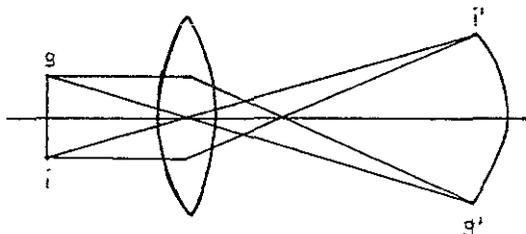


Fig.26 Aberración de planicidad de campo.

### Etiquetado de los objetivos y sistemas ópticos.<sup>40,41,42</sup>

En microscopía se emplean los términos "seco débil", "seco fuerte" e "inmersión", para referirse a los objetivos con aumento de 10X, 40X, y "100X" respectivamente, la casa Carl Zeiss produce objetivos "Plan Neofluar" (Plansemiapocromáticos) 16X y 25X de inmersión (en agua, en glicerina y en aceite), y objetivos Planapocromáticos 40X y 63X, también de inmersión en aceite (fig. 27).

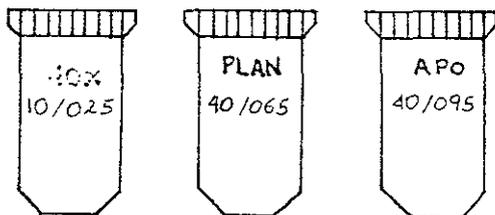


Fig.27 Esquemas de diferentes tipos de objetivos. En todos ellos se observa un primer número que corresponde al aumento; el segundo número corresponde a la apertura numérica. Nótese como los dos objetivos 40X tienen una A.N. diferente. Debajo de estos números se encuentran frecuentemente otros dos; el primero corresponde a la longitud del tubo del microscopio que es generalmente 160 o 170 mm; el segundo corresponde al grosor del cubreobjetos que debe ser utilizado con el sistema (generalmente 0.17 mm). En el segundo objetivo se observan las siglas "Plan", lo que quiere decir que está corregido para la aberración de planicidad de campo. En el tercer objetivo se observan las siglas "apo", lo que significa que es un apocromático, es decir, que tiene una corrección prácticamente total de la aberración cromática.

## MANEJO Y CUIDADO DEL ESPECTROFOTOMETRO DE LUZ VISIBLE

La Espectrofotometría es uno de los métodos fisicoquímicos más empleados en el análisis cuantitativo para medir la absorbancia o emisión de la energía radiante. El método es muy cómodo para medidas repetidas de un mismo constituyente, como sucede en la rutina del análisis de control; también es aplicable a la determinación exacta de cantidades de constituyentes mucho menores que con los métodos gravimétricos o volumétricos (muy adecuado para el análisis de trazas), este es un método no destructivo de la muestra, lo que puede ser importante cuando el constituyente resulta muy valioso.<sup>44,45</sup>

El término **determinaciones espectrofotométricas** es empleado para referirse a los instrumentos que utilizan filtros para aislar parte del espectro como fotómetros o colorímetros, mientras que los instrumentos que utilizan redes de difracción o prismas o ambos reciben el nombre de espectrofotómetros.<sup>1</sup>

El término **Espectrofotometría** se refiere al uso de la luz para medir las concentraciones de sustancias químicas; más adelante se consideran los principios fundamentales de la absorción y la emisión de luz en el análisis cuantitativo.<sup>45</sup>

Los **métodos espectrofotométricos** tienen tal importancia, que son los más utilizados en casi todos los laboratorios industriales, clínicos, de investigación o de enseñanza.<sup>1,3,42,44,45,46.</sup>

### Partes esenciales del espectrofotómetro.<sup>1,45,46</sup>

El **espectrofotómetro** es un equipo para medir la absorción de luz, la luz de una fuente continua pasa a través de un **monocromador**, que selecciona una banda estrecha de longitudes de onda del haz incidente, esta **luz monocromática** atraviesa una muestra de espesor  $b$  y se mide la potencia radiante de la luz que sale (fig. 1).

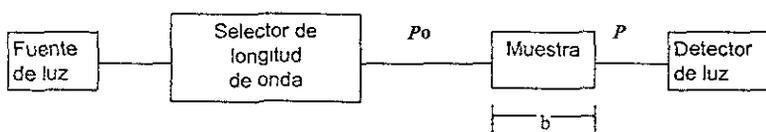


Fig.1 Esquema que ilustra el principio de la medición espectrofotométrica.

#### a) Fuente de luz<sup>1,45</sup>

La misión de la fuente de luz es proporcionar energía radiante en forma de luz visible o no visible, la lámpara de tungsteno se emplea para efectuar mediciones en soluciones moderadamente diluidas en las que la diferencia en la intensidad de color varía significativamente con los pequeños cambios de concentración; pero no aporta energía radiante suficiente para realizar determinaciones en la región ultravioleta por debajo de 320 nm.

Para este propósito resulta conveniente una lámpara de arco de mercurio (Hg), hidrógeno (H) o deuterio (H<sub>2</sub>O), ya que estos si proporcionan una energía adecuada en el ámbito UV. Las mediciones en la región visible y UV, frecuentemente utilizan lámparas de yoduro de tungsteno; estas fuentes son de menor intensidad y duran más (2000 a 3000 hrs antes de reemplazarlas).

#### b) Monocromador<sup>1,45,46,55</sup>

El monocromador está formado por rejillas de entrada y de salida, un prisma o una red y lentes o lentes colimadores y focalizadores dispuesto de tal modo que emerja energía radiante con una amplitud de banda espectral relativamente estrecha.

Los prismas son fragmentos de vidrio, cuarzo, cloruro de sodio o de cualquier otro material que permita la transmisión de la luz. La rejilla es un dispositivo que presenta pequeñas hendiduras dispuestas en un ángulo determinado de manera que cada una de ellas se comporta como un pequeño prisma, estas tienen de 3000 o más pequeñas hendiduras por mm en su superficie.

#### c) Celdas<sup>46</sup>

La función de la celda es mantener la solución en el instrumento mientras se realiza la medición de la absorción, se construyen de vidrio blando o de boratosilicato, cuarzo o plástico.

#### d) Detector de luz (medidor)<sup>1,46,55</sup>

Después de que la radiación ha pasado a través de la muestra hay que detectar y medir la intensidad de la misma, los tipos de detectores fotoeléctricos más usados en Espectrofotometría visible es el fotomultiplicador; este es un tubo de electrones capaz de amplificar de forma significativa una corriente (fig. 2).

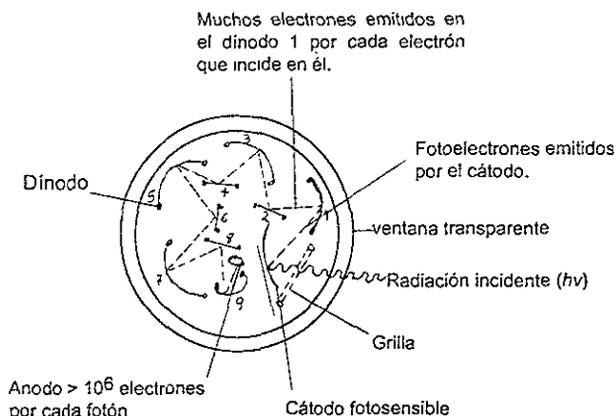


Fig.2 Diagrama de un tubo fotomultiplicador con nueve dinodos. La señal es amplificada en cada uno de ellos. El potencial de cada dínodo es unos 90 volts más positivo que el potencial del dínodo anterior.

Se construye utilizando un material sensible a la luz que emite electrones en proporción a la energía radiante que incide sobre la superficie de dicho material sensible.

### **Factores importantes del método espectrofotométrico.**<sup>55</sup>

Gran cantidad de iones inorgánicos en disolución acuosa absorben suficiente energía radiante en la región del visible, lo que permite su determinación espectrofotométrica, directa incluso en muy bajas concentraciones.

Cuando se encuentra un sistema coloreado prometedor o un color producido en una reacción, es preciso una investigación adecuada del constituyente, muchos de los factores a tener en cuenta se enumeran a continuación:

1. **Selección de la longitud de onda analítica:** Si no hay interferencias con otros componentes de la muestra en disolución, se escoge la longitud de onda del máximo de absorción para medidas futuras.
2. **Efecto del exceso de reactivo:** Si la reacción formadora de color es prácticamente completa cuando están presentes cantidades estequiométricas a los reactivos la adición de más cantidad de reactivos dará lugar a pequeños incrementos de la absorbancia si es que la hace aumentar algo.
3. **Efecto del tiempo:** Lo ideal es que la reacción de formación de color sea rápida de tal forma que los resultados analíticos puedan obtenerse con rapidez, y que las especies coloreadas sean estables en el tiempo, de forma que no sea necesario realizar el análisis en un tiempo prefijado.
4. **Efecto de pH:** Cuando el control del pH es muy crítico, se deben utilizar disoluciones adecuadas de gran capacidad reguladora; o bien, se ajusta el pH de la solución al valor deseado mediante un *pHmetro*.
5. **Efecto de la temperatura:** El control de la temperatura puede ser necesario no sólo para el desarrollo del color, sino también durante la medida de la absorbancia; esto es muy importante cuando se utilizan disolventes orgánicos que tienen un elevado coeficiente de dilatación.
6. **Conformidad con la Ley de Beer:** Una relación lineal entre concentración y absorbancia simplifica el procedimiento de calibración, así como los cálculos en los análisis; también da la seguridad de que las condiciones de análisis que se han establecido son satisfactorias.
7. **Efecto de las sustancias extrañas:** El reactivo formador de color debería ser específico o muy selectivo para el constituyente que se analiza, las sustancias extrañas no deberían impedir la reacción de formación de color, ni dar otro análogo en el espectro de absorción.
8. **Precisión del método:** Se deben hacer medidas de muestras repetidas para evaluar la precisión del método, la mejor forma de expresar la precisión es mediante la desviación típica.

### **Manejo del espectrofotómetro:**<sup>55</sup>

El buen funcionamiento del aparato se consigue atendiendo a los siguientes hábitos:

1. El calentamiento previo del espectrofotómetro se hace encendiéndolo de 5 a 10 minutos antes de su uso.

- Una vez encendido el espectrofotómetro, se ajusta a cero de absorbancia (se calibra a cero de absorbancia con aire, esto es que sin celda se ajusta a cero).
- Ajustar ahora a la longitud de onda que se desee trabajar con las muestras problema.
- Contar siempre con el blanco de reactivos hará calibrar a cero de absorbancia.
- Una vez ajustado el aparato para trabajar, se coloca la muestra problema dentro de las celdas espectrofotométricas, siendo el llenado igual en todas las muestras a leer.
- Correr un patrón (Pt) para corroborar las lecturas de las muestras problema (Pb); anotar siempre ambas lecturas para realizar los cálculos que en su técnica se establezcan.
- Al terminar de utilizar el espectrofotómetro se apaga y se desconecta de la fuente de corriente.

#### Determinaciones espectrofotométricas.<sup>44,45,50</sup>

La espectroscopia de absorción es una de las herramientas ampliamente utilizada en el análisis cuantitativo. El espectro de absorción de las regiones del ultravioleta (UV) y visible, es muy útil para detectar la presencia de ciertos grupos funcionales que actúan como cromóforos, en la tabla 1 se muestra un listado de los grupos cromóforos orgánicos más comunes.

*“ La parte de la molécula a la que se debe la absorción de la luz se llama cromóforo .”*

Cromóforo	Absorbancia (nm)	$\lambda$ máxima
Alqueno	177	13000
Alquino	178	10000
	196	2000
	225	160
Carbonilo	186	1000
	280	16
Carboxilo	204	41
Amida	214	60
Azo	339	5
Nitro	280	22
Nitroso	300	100
	665	20
Nitrato	270	12
Olefina	184	10000
Diolefina (no conjugada)	185	20000
Diolefina (conjugada)	217	21000
Triolefina (conjugada)	250	
Cetona	282	27
Cetona insaturada (no conjugada)	278	30
$\alpha,\beta$ -cetona insaturada (conjugada)	324	24
	219	3600

Compuesto	Banda E		Banda B	
	máx (nm)	máx	máx (nm)	max
Benceno	204	7900	256	200
Tolueno	207	7000	261	300
m-Xileno			263	300
Clorobenceno	210	7600	265	240
Fenol	211	6200	270	1450
Fenolato	235	9400	287	2600
Anilino	230	8600	254	1430
Anilinio	203	7500	254	160
Tiofenol	236	10000	269	700
Naftaleno	286	9300	312	289
Estireno	244	12000	282	450

El análisis espectrofotométrico para cualquier compuesto orgánico que contiene uno o más de estos grupos es potencialmente posible y también absorben algunas especies inorgánicas siendo por tanto susceptibles a determinación directa.

Numerosos reactivos reaccionan selectivamente con especies no absorbentes dando productos que absorben fuertemente en las regiones del ultravioleta (UV) y visibles; la aplicación con éxito de tales reactivos al análisis cuantitativo requiere normalmente que la reacción de formación del color sea prácticamente completa.

#### Selección de longitud de onda.<sup>47</sup>

Las medidas espectrofotométricas de la absorbancia se hace normalmente a una longitud de onda correspondiente a un pico de absorción ya que el cambio en la absorbancia por unidad de concentración es mayor en este punto y se alcanza, por tanto la sensibilidad máxima, las variables que influyen en el espectro de absorbancia de una sustancia incluyen la naturaleza del disolvente, pH de disolución, temperatura, concentración elevada del electrolito y la presencia de sustancias interferentes.

#### Manejo de celdas espectrofotométricas.<sup>45,47,51</sup>

Para un análisis preciso se requiere de celdas de buena calidad contrastadas; estas deben calibrarse regularmente una frente a otra para detectar las diferencias que pueden surgir de ralladuras y desgaste.

**Limpieza:** Las caras externas de las celdas se limpian con un papel para lentes empapado con metanol (grado espectrofotométrico de marca comercial), el papel se toma con pinzas, después de la limpieza el metanol se evapora dejando las superficies libres de contaminantes.

#### Relación Absorbancia-Concentración.<sup>47</sup>

Es necesario preparar una curva de calibración a partir de series de soluciones estándar, estas deben aproximarse a la composición global de las muestras y deben cubrir un intervalo de concentración razonable del analito (sustancia de estudio).

La absorbancia total de una disolución a una longitud de onda dada es igual a la suma de las absorbancias de los componentes individuales presentes:

$$\text{Absorbancia total} = \text{Abs. 1} + \text{Abs. 2} + \text{Abs. 3} + \dots + \text{Abs. n}$$

Esta relación hace posible la determinación cuantitativa de los constituyentes individuales de una mezcla, incluso si su espectro se superpone.

#### Sistema Blanco.<sup>45</sup>

En la mayoría de los análisis espectrofotométricos es importante preparar un sistema blanco, el cual debe tener todos los reactivos (fuentes de absorbancia), pero en el que el analito se ha sustituido por agua destilada; la absorbancia del blanco se resta de las absorbancias antes de cualquier cálculo.

#### Sistema Estándar (Patrón).<sup>44</sup>

Los análisis con soluciones patrón consisten en llevar a cabo las mismas operaciones analíticas que se realizan con la muestra problema, pero sobre un sistema que contiene una cantidad conocida del constituyente a determinar. La muestra control deberá tener dentro de lo posible una composición análoga a la muestra problema. El valor obtenido en la muestra control se aplica como corrección al análisis del problema.

## ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCIÓN (ESPECTRO VISIBLE Y ULTRAVIOLETA)

### Naturaleza de la energía radiante

La energía radiante se define como: la energía transmitida en forma de energía electromagnética; puede ser emitida por sustancias bajo condiciones de gran excitación, tales como las producidas por altas temperaturas o por descargas eléctricas. Esta energía puede ser absorbida, emitida, reflejada y refractada por muchas sustancias en diferentes estados de agregación (sólido, líquido, disolución y gas) si la radiación incidente tiene una longitud de onda apropiada.

Es conveniente describir a la luz (radiaciones electromagnéticas) en términos tanto de partículas como de ondas: las ondas de luz están constituidas por campos eléctrico y magnético oscilante, perpendiculares entre sí. En la figura 3 se presenta el esquema de una onda polarizada en un plano.

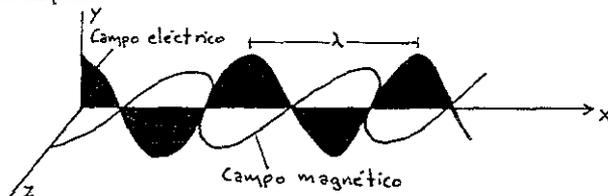


Fig.3 Radiación electromagnética con longitud de onda  $\lambda$ , polarizada en un plano y se propaga a lo largo del eje x.

La longitud de onda ( $\lambda$ ), es la distancia entre cresta y cresta de onda.

La frecuencia ( $\nu$ ), es el número de oscilaciones completas de la onda cada segundo.

La unidad de frecuencia es el segundo recíproco ( $s$ ).

Una oscilación por segundo es igual a un **Hertz (Hz)**

Por lo tanto se dice que una frecuencia de  $10^6$  = a 10 Hz, o sea un **Megahertz (Mhz)**.

La relación entre frecuencia y longitud de onda es:

$$c = \lambda \nu$$

$c$ : Es la velocidad de la luz ( $2.99792458 \times 10^8$  m / s en el vacío).

En cualquier medio distinto del vacío, la velocidad de la luz es igual a  $c / n$ , donde  $n$  es el **índice de refracción del medio de que se trate**. Puesto que  $n$  es siempre  $\geq 1$ , la luz se propaga más lentamente en un medio material que en el vacío. Cuando la luz pasa de un medio a otro cuyo índice de refracción es mayor, su frecuencia no varía pero su longitud de onda disminuye.

Desde el punto de vista energético, es más conveniente considerar a la luz constituida por partículas llamadas **fotones**. Cada fotón tiene una energía  $E$ , la cual está dada por:

$$E = h\nu$$

En donde  $h$  es la constante de Planck ( $6.6260755 \times 10^{-34}$  Js). Un mol de fotones constituye un **einstein**.

### **Espectro electromagnético.**<sup>44,45,46,47</sup>

Un espectro de absorción es una gráfica que indica en que forma la absorbancia ( $A$ ) depende de la longitud de onda, las regiones más importantes del espectro electromagnético se presentan en la figura 4, al pasar de una región a otra del espectro no se encuentran discontinuidades en las propiedades de las radiaciones.

*“Cualquier sustancia que absorba luz visible se verá coloreada cuando refleje la luz blanca o cuando ésta se transmita sobre ella”.*

Región visible

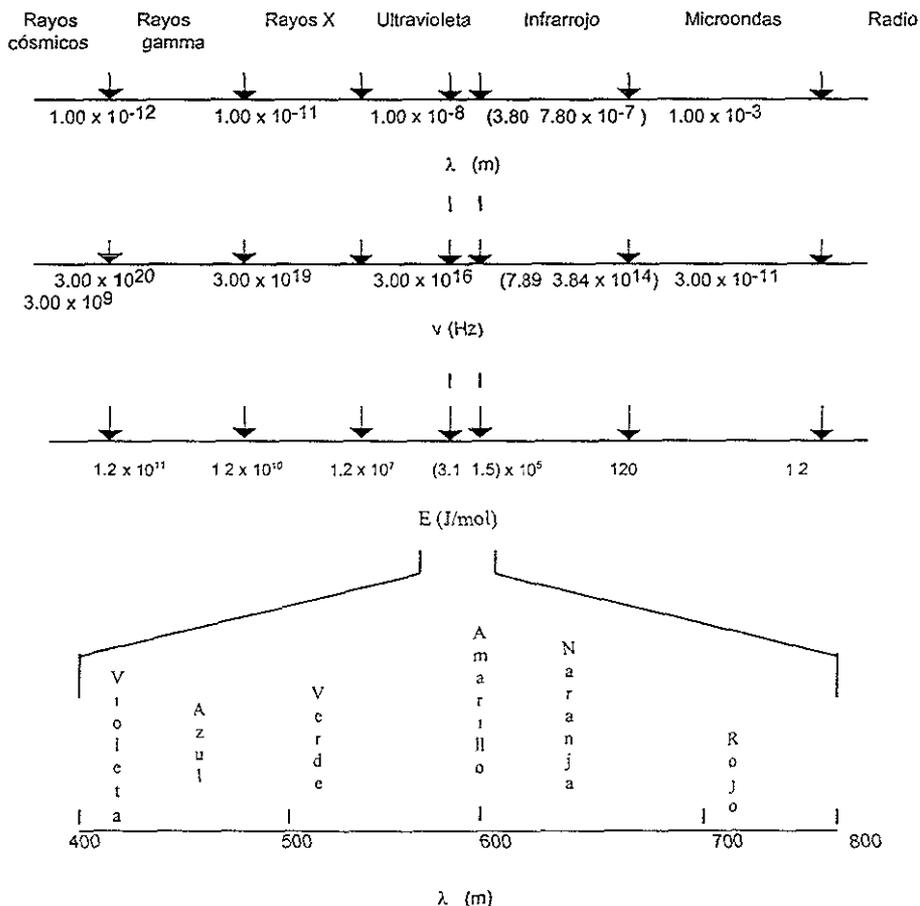


Fig.4 El espectro electromagnético. Las unidades de longitud de onda en la porción visible dele espectro son nanómetros ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ M}$ ). Las definiciones de las distintas regiones son las recomendadas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC).

Debe observarse que la radiación visible (luz), la que el ojo humano puede detectar sólo presenta una fracción muy pequeña del espectro electromagnético.

Absorción de la luz.

Cuando una molécula *absorbe* un fotón, la energía de la molécula se incrementa: se dice que la molécula *emite* un fotón, su energía *disminuye*; el estado de menor energía de una molécula pasa aun *estado basal* (fundamental), ver figura 5.

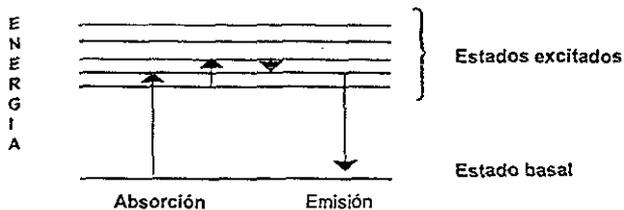


Fig.5 La absorción de la luz incrementa la energía de la molécula, la emisión de la luz reduce su energía.

*“Cuando una sustancia absorbe luz blanca; el ojo humano detecta las longitudes de onda absorbidas”.*

En la tabla 1 se presenta una guía de colores aproximada correspondientes a determinada longitud de onda.

Tabla 1 Colores de la luz visible

Longitud de onda de máxima absorción (nm)	Color absorbido	Color observado
380 - 420	Violeta	Amarillo - Verde
420 - 440	Azul - Violeta	Amarillo
440 - 470	Azul	Anaranjado
470 - 500	Verde - Azul	Rojo
500 - 520	Verde	Púrpura
520 - 550	Amarillo - Verde	Violeta
550 - 580	Amarillo	Azul - Violeta
580 - 620	Anaranjado	Azul
620 - 680	Rojo	Verde - Azul
680 - 780	Púrpura	Verde

*“El color observado es el complementario del color que se absorbe”*

### ESPECTROFOTOMETRIA (ASPECTOS INSTRUMENTALES)

Cuando una molécula absorbe luz, necesariamente pasa a un estado excitado de mayor energía. Por el contrario, cuando una molécula emite un fotón, su energía disminuye necesariamente en una cantidad igual a la del fotón. Si analizamos la figura 6 encontraremos

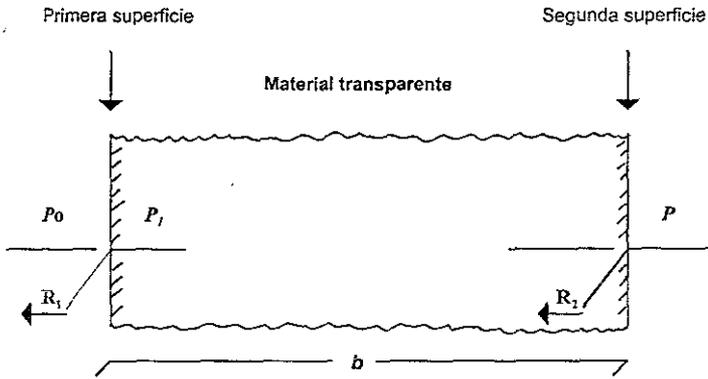


Fig.6 LA luz potencial radiante  $P_0$  incide en la primera superficie de la muestra, cuyo espesor es  $b$ . La potencia radiante  $R_1$  se refleja, y la potencia radiante  $P_1$  penetra en la muestra. Una parte de  $P_1$  se absorbe a medida que atraviesa la muestra, y la potencia  $P_2$  llega a la segunda superficie. Aquí, la potencia  $P$  se transmite y la potencia  $R_2$  se refleja.

La potencia radiante se define como: la energía que incide por segundo por unidad de área y tiene como unidades  $W / m$ .

*“La potencia radiante es propiamente el flujo de energía radiacional por unidad de tiempo”*

**¿Qué le sucede a la luz cuando incide sobre una muestra?**

Cuatro cosas pueden sucederle a la luz que incide sobre una muestra y son:

1.- Parte de la luz se **transmite** a través de la muestra.

La transmitancia medida es la fracción de luz incidente que emerge del otro lado de la muestra.

*“La transmitancia externa (la que se mide) está dada por la relación  $P / P_0$ ”.*

*“La transmitancia interna de la muestra es la fracción de la potencia radiante dentro de la muestra a que se transmite a través del material”.*

$$T = \frac{P}{P_0} \qquad T \text{ varía de } 0 \text{ a } 1$$

La transmitancia porcentual es simplemente 100 ( $T$  varía de 0 a 100 %)

2.- El material **absorbe** una parte de la luz.

La absorbancia se define como:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = -\log T$$

La absorbancia también es conocida como: *densidad óptica* (DO) y en ocasiones se representa como E (extinción).

La importancia de la absorbancia estriba en que es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente en la muestra; la ecuación fundamental para aplicar la espectrofotometría en química analítica se denomina *Ley de Beer* ( $A = \epsilon b c$ ).

Donde A es la absorbancia no presenta unidades es un número adimensional,  $\epsilon$  es el coeficiente de absortividad molar sus unidades son  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ . (es la propiedad característica de las sustancias que indica cuánta luz se absorbe a una longitud de onda determinada);  $b$  es la longitud del trayecto óptico y se expresa en cm.;  $c$  es la concentración de la muestra y se expresa en Molaridad (moles  $\cdot$  L).

3.- Una parte de la luz se **refleja** en cada superficie y finalmente sale de la muestra en la dirección de la fuente de luz.

4.- Una parte de la luz se **dispersa** hacia los lados. Si la muestra es un líquido, la luz puede dispersarse debido a partículas de polvo presentes en él o a moléculas de soluto muy grandes. Si la muestra es un sólido constituido por muchas partículas microcristalinas aglomeradas, la dispersión ocurre en las superficies de contacto entre las partículas o en intersticios microscópicos entre partículas.

**Reflexión y refracción**

Una superficie perfectamente pulida reflejará la luz con un mismo ángulo que el de incidencia, como se muestra en la figura 7.

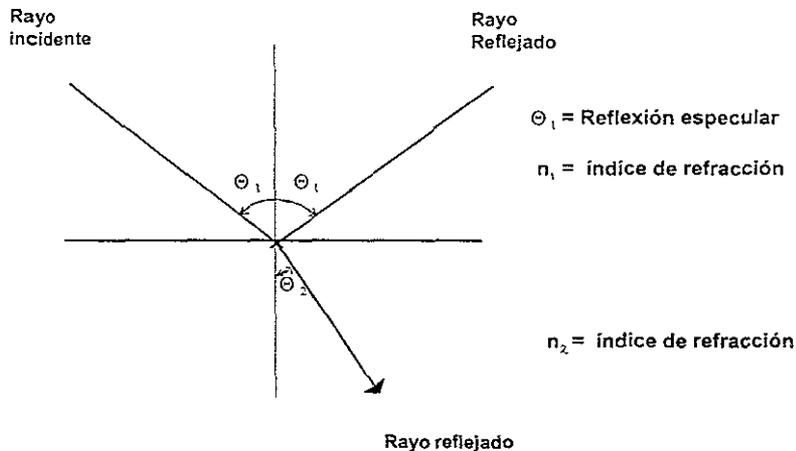


Fig.7 Ilustración de la ley de Snell: al viajar de un medio 1 a un medio 2 con  $\theta = 0^\circ$  la luz no es refractada pero si parcialmente reflejada.

En la figura 6 se ve que ocurre reflexión en cada superficie los rangos reflejados rebotan hacia atrás y adelante, sufriendo transmisión y reflexión parciales en cada superficie hasta que su potencia se hace despreciable. Una fracción significativa de la luz en un espectrofotómetro puede perderse por reflexión en los componentes ópticos, para reducir en gran medida la reflexión pueden emplearse *recubrimientos antirreflejantes*.

Cuando la luz pasa de un medio a otro, su trayectoria es desviada, a este fenómeno se le llama *refracción* y la magnitud de la desviación está dada por la *Ley de Snell*:

$$n_1 \text{ seno } \theta_1 = n_2 \text{ seno } \theta_2$$

Donde:  $n_1$  y  $n_2$  son los índices de refracción de cada medio

$\theta_1$  y  $\theta_2$  son ángulos de reflexión.

*“Refracción es la desviación de la luz cuando pasa de un medio a otro de diferente índice de refracción”.*

La velocidad de la luz en un medio con *índice de refracción n* es  $c / n$ , donde  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío. ( $n$  vacío = 1)

*“El índice de refracción de un material es función de la longitud de onda de la luz y de la temperatura de dicho material”.*

El índice de refracción se mide generalmente a 20°C a la longitud de onda de la línea D de sodio ( $\lambda = 589.3 \text{ nm}$ ).

## CITOMETRIA AUTOMATIZADA (BIOMETRIA HEMATICA)

En los contadores ópticos electrónicos (figura 1), un tubo fotomultiplicador detecta la luz dispersa, por reflexión externa de las superficies celulares o por transmisión y refracción a través de las células o de la luz difractada que pasa tangencialmente a las superficies celulares:<sup>54</sup>

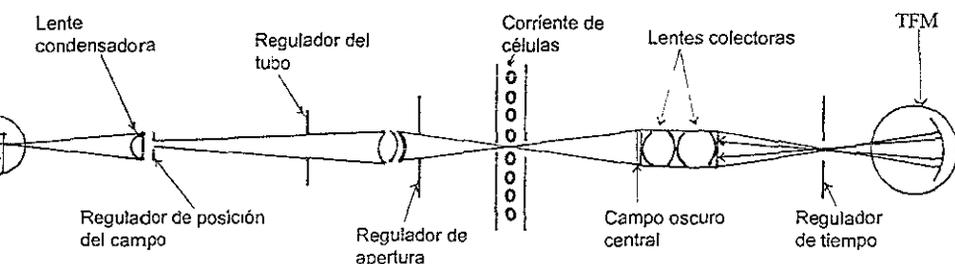


Fig. 1 Partes que integran el citómetro de flujo.

La incorporación a los aparatos hematológicos del rayo láser y el citómetro de flujo, permite tener hoy en día en menor tiempo datos numéricos relacionados con la cantidad de eritrocitos, leucocitos, plaquetas, histogramas de hemoglobina para cada hematíe, concentración de hemoglobina individual, plaquetas, diagrama de Perox donde gráficamente se aprecian poblaciones de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y los diagramas de baso, relacionado con blastos, desviación a la izquierda, polinucleados, hipersegmentados y normoblastos; también por medio de cruces se obtiene una información gráfica del extendido periférico con 10 parámetros como anisocitosis, anisocromia, desviación a la izquierda, atípicos, blastos, entre otros.<sup>1,45,47</sup>

### Citometría de flujo.<sup>1,28,53,54.</sup>

En el citómetro de flujo, las células se dispersan en una suspensión líquida y fluyen a través del rayo láser que es indispensable para mantener un flujo constante. Las células suspendidas son inyectadas a través de un flujo de líquido de suspensión en forma de anillo que las envuelve, haciéndose cada vez más estrecho, hasta disminuir su diámetro y enfocarlas en el agujero que normalmente es de unas 76 micras de diámetro, donde son estimuladas uniformemente por el rayo láser.

Las células reflejan la luz del láser que incide sobre ellas, en ángulo mínimo de  $2^\circ$  a  $20^\circ$ , que están relacionados con el tamaño de las células y con un ángulo de  $90^\circ$  para las características del núcleo, las granulaciones citoplasmáticas (forma granular del citoplasma), el contenido proteínico de pigmentos de DNA y RNA.

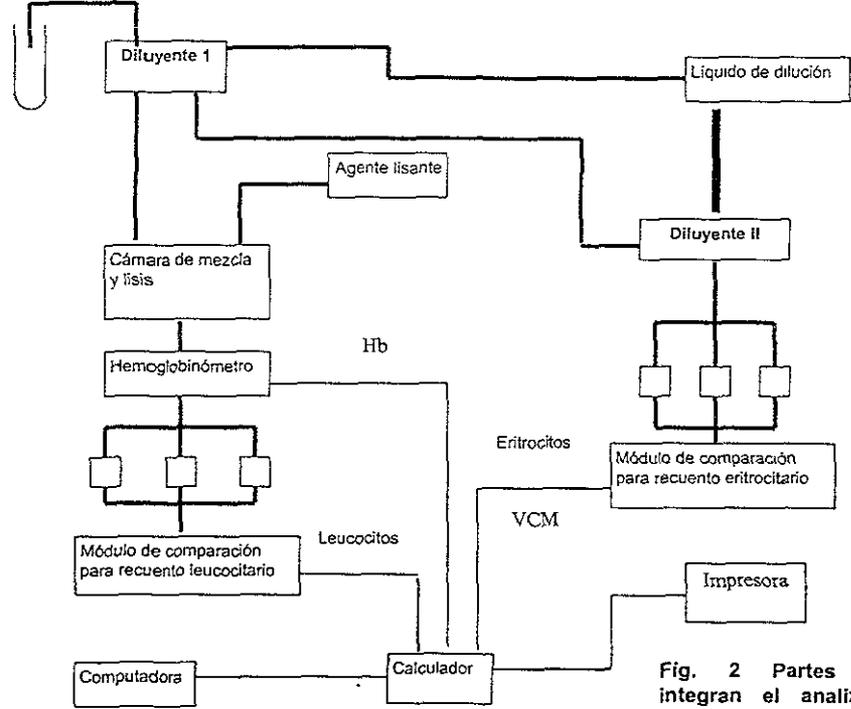
Los hematíes, mediante la difracción del rayo láser, se transforman en esferocitos, conservando su volumen. La medida de difracción láser en dos ángulos diferentes, hace posible la determinación independiente del volumen globular y del contenido de hemoglobina de cada hematíe, aislándolo gráficamente en el histograma, colocándolo hacia la izquierda los más pequeños, los normales permanecen en el centro y los grandes

a la derecha. Esto le permite al clínico ver gráficamente el grado de anemia de su paciente, bien sea microcítica o macrocítica y lo que es más importante: comparar en un histograma posterior la evolución al tratamiento.

**Principio de funcionamiento del analizador hematológico.**<sup>1,28, 45,47,53,54</sup>

El analizador hematológico es un aparato multicanal que proporciona mediciones simultáneas del recuento de células blancas (WBC), hematies (RBC), cifras de hemoglobina (HGB), plaquetas (PLT), hematócrito (HCT), en un tiempo aproximado de 40 seg. (el tiempo varía de acuerdo a la marca del aparato); estos emplean los principios de recuento de impulsos electrónicos y análisis de tamaño, junto con la colaboración de un aparato fotosensible para medir la concentración de hemoglobina; además, un dispositivo especial proporciona una presión negativa que aspira sangre y moviliza los líquidos diluyentes y las diluciones a través del sistema.

El análisis se puede practicar con sangre completa de la cuál el aparato aspira alrededor de 1.3 ml (la mayor parte se emplea para rellenar el sistema, luego se diluyen 44.7 lts (dilución 1:224 con diluyente I). A partir de esto se lleva a cabo una segunda dilución de 1:224, y de la segunda dilución resultan (1:50000) se determina: RBC; del diluyente Y se conduce a otra cámara de mezcla en donde se añade un agente para lisar los eritrocitos y obtener hemoglobina para medirla como cianohemoglobina y la dilución de 1:224 pasa a 1:250. Después de medir la concentración de hemoglobina, la suspensión de leucocitos se lleva a otro contenedor para posteriormente pasar a un módulo de comparación y después hacer el recuento leucocitario. En la figura 2 se muestra el sistema del cuál está compuesto el analizador hematológico.



**Fig. 2 Partes que integran el analizador hematológico**

El ensamblaje óptico de RBC PLT tiene dos canales de detectores, un fotodiodo enumera los recuentos de eritrocitos y las señales de dispersión luminosa son integrados para determinar el hematócrito (HCT).

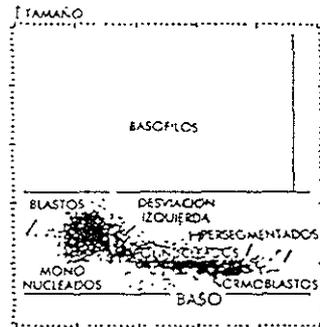
El conteo diferencial se mide en el contenedor de peroxidasa (canal de Perox), los neutrófilos inmaduros, los neutrófilos y los eosinófilos (todos contienen peroxidasa) absorben luz. Se utiliza un pH de 3.2, los eosinófilos adquieren un color más intenso que los neutrófilos y se diferencian de ellos por su mayor absorción y menor dispersión. Los neutrófilos inmaduros presentan mayor actividad peroxidásica que los maduros y se denomina *células grandes no teñidas* (CGNT) presentando alta dispersión y baja absorción e incluyen a los linfocitos atípicos y los blastos.

Las células son contadas y llevadas de inmediato a un dispersograma (dispersión frente a absorción). Los monocitos son llevados a un contenedor de lipasa (canal de lipasa) para ser teñidos con  $\alpha$ -naftilbutirato-esterasa; son separables de otras células por dispersión y absorción elevadas. En otro canal se encuentran los basófilos según su heparina granular teñida con azul alciano (no utilizar sangre heparinizada), en cada canal se cuentan 10,000 leucocitos (WBC); los resultados se expresan en porcentaje y en concentración absoluta, el recuento total de leucocitos se determina en el canal de peroxidasa, las plaquetas se cuentan utilizando un tubo fotomultiplicador sensible para detectar la dispersión de luz en las células sanguíneas.

Recuento celular en cifras

RECUESTO				
Resultado	Valor referencia	Parametro		
	4.8-10.8	LEU	Leucocitos	$\times 10^3/\mu L$
	H47-6.1 F42-3.4	HEM	Hemates	$\times 10^6/\mu L$
	H14-18 F12-16	HB	Hemoglobina	g/dL
	H42-52 F37-47	HCT	Hematocrito	%
	H80-94 F81-99	VCM	Volumen Corpuscular Medio	fL
	27-31	HCM	Contenido Corpuscular Medio HB	pg
	33-37	CHCM	Concentración Corpuscular Medio HB	g/dL
	11.5-14.5	RDW	Coefficiente de variación del tamaño de los hemates	%
	2.2-3.2	HDW	Desviación estándar de la distribución de la concentración globular de HB	g/dL
	130-400	PLQ	Plaquetas $\times 10^4$	$\mu L$
	7.2-11.1	VPM	Volumen plaquetario medio	fL

Diagrama de Baso  
Análisis de complejidad y lobulación del núcleo  $\times 1/2$  rayo laser

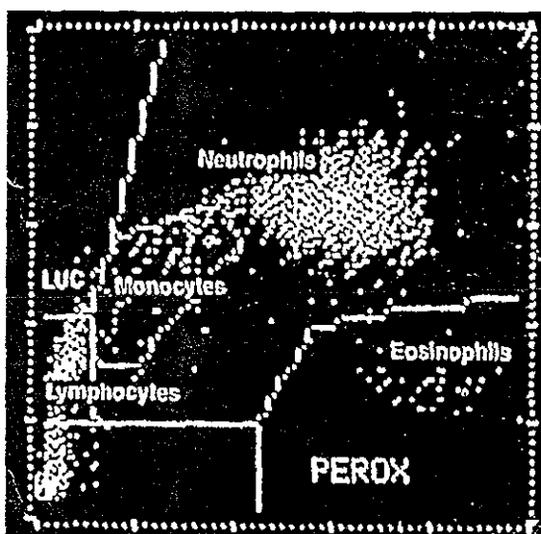


Recuento diferencial realizado individualmente en 10,000 células

Resultado	En %	FORMULA	Resultado	En valor absoluto $\times 10^3/\mu L$
	Valor de referencia 40.0-74.0	NEUTROFILOS		1.90-8.00
	19.0-48.0	LINFOCITOS		0.90-5.20
	3.4-9.0	MONOCITOS		0.16-1.00
	0.0-7.0	EOSINOFILOS		0.00-0.80
	0.0-1.5	BASOFILOS		0.00-0.20
	0.0-4.0	LUC grandes células sin actividad peroxidasa		0.00-0.40
			Valor referencia	Resultado
IL	Indice de lobuloridad $\leq 1.9$ de células no segmentadas $\geq 3.0$ de células segmentadas		1.9-3.0	
MPX1	Indice de actividad peroxidásica media de la población de neutrófilos $\leq -10$ déficit de peroxidasa $\geq +10$ presencia de coagulos		-10 + 10	

El registro impreso comprende las determinaciones: de células sanguíneas y los recuentos de leucocitos (WBC) y plaquetas (PLT), las distribuciones de los tamaños de los hematíes (RBC) y plaquetas (PLT); el recuento diferencial de leucocitos indicado en % y como recuento absoluto (células x  $10^6 / \mu\text{l}$ ); y la representación de la dispersión frente a la absorción de los leucocitos en el canal de la peroxidasa.

En el diagrama de Perox (proporciona gran parte de la información para clasificar a los leucocitos), las líneas horizontales representan umbrales bajos y altos para la dispersión de la luz, y las líneas verticales representan umbrales para la absorción de luz.

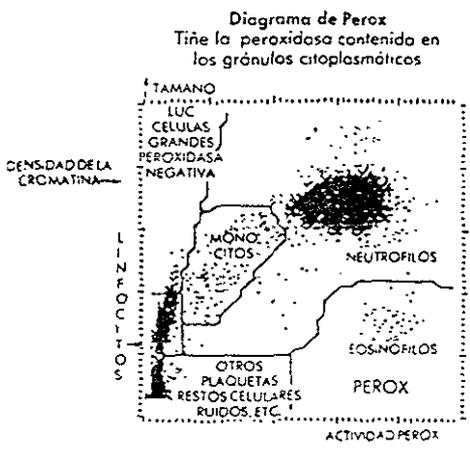


#### Partes que conforman el diagrama de PEROX

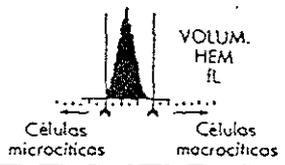
Como se muestra en la línea trazada (A) los umbrales fijados se encuentran sobre el eje horizontal para dispersión de la luz (SH = alta dispersión; SL = baja dispersión) y sobre el eje vertical para la absorción de la luz (AH = alta absorción; AL = baja absorción).

La población de neutrófilos (PMN) se identifica por el tamaño y tinción con peroxidasa; los umbrales verticales que identifican los PMN están señalados con flechas.

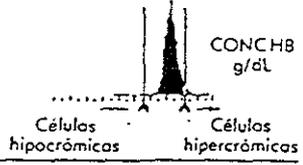
Otras poblaciones distintas comprenden células grandes no teñidas (CGNT), monocitos (MONO), linfocitos (LINFOS) y eosinófilos (EOS). Las células que tienen el mismo tamaño (dispersión de la luz) que los PMN, pero caen por encima del umbral de absorción señalado, se denominan células altas en peroxidasa (CAP).<sup>1,28</sup>



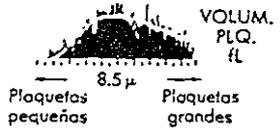
Histograma de volumen hemoglobina para cada hematie



Histograma de concentración de hemoglobina para cada hematie



Histograma de plaquetas



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Todd; Sanford; Davidsohn.  
DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO CLINICO POR EL LABORATORIO  
8a. edición.  
TOMO I  
Editorial Salvat; México, D.F. 1991
- 2.- F. Ciscar Ríos; P. Farreras Valenti  
DIAGNOSTICO HEMATOLOGICO (Laboratrio y Clínica)  
TOMO I  
Editorial Jims; Barcelona, España 1988
- 3.- M.J. Lynch; S.S.Raphael; L.D. Mellor; PD. Spare; M.J.H. Inwood.  
METODOS DE LABORATORIO  
2a edición.  
VOLUMEN I  
Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México, D.F. 1987
- 4.- H.K. Hamiltón; M.B. Rose  
DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO  
TOMO I  
Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México, D.F. 1993
- 5.- B.A. Brown  
TECNICAS DE HEMATOLOGIA  
Editorial Elicient; Barcelona, España 1986
- 6.- C. Albarran S.; L. Albarran B.  
MANUAL TECNICO DE BANCO DE SANGRE  
Ediciones Científicas Prensa Medica Mexicana S.A.; México, D.F. 1985
- 7.- D.W. Martín; P.A. Mayes; V. W. Rodwell; D.K. Granner.  
BIQUIMICA DE HARPER  
14a. edición.  
Editorial El Manual Moderno., México, D.F. 1995
- 8.- G. Farias M.  
QUIMICA CLINICA  
9a edición  
Editorial El Manual Moderno., México, D.F. 1988
- 9.- Taunton West; Wilbert R Todd; Howard Mason  
BIOQUIMICA MEDICA  
8a edición  
Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México, D.F. 1991
- 10.- DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES EN ANALISIS CLÍNICOS  
8a. edición.  
P.L.M. , S.A. de C.V., México, D.F. 1994
- 11.- Ganong  
FISIOLOGIA MEDICA  
14a. edición  
Editorial El Manual Moderno., México, D.F. 1994
- 12.- R. Segura Cardona  
PRACTICAS DE FISIOLOGIA  
Editorial Salvat; México, D.F. 1990
- 13.- Ch. Joulmes; A Jude.  
PRACTICAS DE LABORATORIO  
2a. edic.  
Editorial Toray-Masson, S.A. Barcelona, España. 1989

- 14.-Iovine E.  
EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD  
Editorial Médica Panamericana, México, D.F. 1987
- 15.- J.B. Harris  
GRUPOS SANGUINEOS Y TECNICAS PARA SU IDENTIFICACION  
4a edición.  
Editorial El Manual Moderno., México, D.F. 1989
- 16.-B.L. Gordon  
LO ESENCIAL DE LA INMUNOLOGIA  
2a edición.  
Editorial El Manual Moderno., México, D.F. 1985
- 17.-Ivan M. Roitt  
INMUNOLOGIA ESENCIAL  
6a. edición.  
Editorial Jims; Barcelona, España 1988
- 18.-Gradholl  
METODOS Y DIAGNOSTICOS DEL LABORATORIO CLINICO  
TOMO I y TOMO II  
Editorial
- 19.-Chery M. Coffin. M.D.  
ALTERACIONES DE LA COAGULACION POTENCIALMENTE FATALES  
TRIBUNA MEDICA, VOLUMEN 57, No. 5  
México, D.F. 1990
- 20.-Domarus  
MEDICINA INTERNA  
9a. edición.  
México, D.F. 1980
- 21.-Henry  
QUIMICA CLINICA  
TOMO i  
Editorial Jims; Barcelona, España 1988
- 22.-Walker  
METODOS CLINICOS  
2a edición.  
Editorial Interamericana, México, D.F. 1985
- 23.-Thompson A.R. , Harker L.A.  
MANUAL OF HEMOSTASIS AN THROMBOSIS  
3a. edición.  
Harker L.A. eds. Philadelphia; FA Davis 1983
- 24.-Tietz  
QUIMICA CLINICA MODERNA  
Editorial Interamericana, México, D.F. 1982
- 25.-MANUAL BIOXON  
Becton Dockinson, México, D.F. 1993
- 26.-MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO CLINICO  
Instituto Mexicano del Seguro Social; México, D.F. 1989
- 27.-Henry, Cannon, Winkelman  
QUIMICA CLINICA Principios y técnicas  
2a edición.  
Editorial Hagerstown; México, D.F. 1989

- 28.-Gilberto Angel  
**INTERPRETACION CLINICA DEL LABORATORIO**  
 4a edición.  
 Editorial Médica Panamericana, Bogota Colombia 1993
- 29.-Evelyn C. Pearce  
**MANUAL DE ANATOMIA Y FISIOLOGIA PARA AUXILIARES SANITARIOS**  
 2a. edición.  
 Editorial Elicien; Barcelona, España 1981
- 30.-H. Rouviere  
**COMPENDIO DE ANATOMIA Y DISECCION**  
 Editorial Salvat; México, D.F. 1987
- 31.-Kapit; Elson  
**ANATOMIA CROMODINAMIA (ATLAS ANATOMICO)**  
 Editorial Fernández, México, D.F. 1994
- 32.-Altman p. and Dittmer  
**DS.: BIOLOGY DATA BOOK VOL II**  
 2a ed.  
 Federation of American Societies of Experimental Biology 1980
- 33.-Miles Laboratories, Inc.  
**QUIMICA URINARIA MODERNA**  
 AMES; División de Laboratorios; México, D.F. 1992
- 34.- AMES Technicon  
 Bayer diagnosticos, S.A. de C. V. México, D.F. 1995
- 35.-Comburtest  
 Boheringer Mannheim, S.A., Barcelona, España 1988
- 36.-Wallis, T.E.  
**MICROSCOPIA ELECTRONICA**  
 Editorial Acribia, Zaragoza España 1984
- 37.-Bernis Meteu  
**ATLAS DE MICROSCOPIA**  
 Editorial Jover Barcelona, España 1980
- 38.-Casartelli  
**MICROSCOPIA TEORICO-PRACTICA**  
 Editorial Urmo; Bilbao, España 1978
- 39.-Nezelof  
**TECNICAS MICROSCOPICAS**  
 Editorial Jims; Barcelona, España 1977
- 40.-Simpson Diana  
**AN INTRODUCING TO APLICATIONS OF LIGHT MICROSCOPY IN ANALISIS**  
 Royal Society of Chemistry  
 London England 1988
- 42.-Dr. Carrillo Farga  
**MICROSCOPIA DE LUZ**  
 Laborat Acta 2 / 2 México, D.F. 1990
- 43.-James W. Williams, MD. y Seymour M Sabesin, MD.  
**TRASPLANTE HEPATICO Nuevas esperanzas para muchos pacientes.**  
 Tribuna Médica Volumen 58 No.1 México, D.F. 1990
- 44.-Ayres  
**ANALISIS QUIMICO CUANTITATIVO**  
 2a. edición.  
 Editorial Harla; México, D.F. 1987

- 45.-D.C. Harris  
ANALISIS QUIMICO CUANTITATIVO  
3a. edición.  
Grupo Editorial Iberoamerica, S.A. de C.V., México, D.F. 1992
- 46.-Martin  
METODOS FISICOQUIMICOS DE ANALISIS  
Editorial Urmo; S.A., Bilbao, España 1978
- 47.-Skogg; Leary  
ANALISIS INSTRUMENTAL  
4a. edición.  
Editorial McGrawHill; México, D.F. 1992
- 48.-Bausch & Lomb  
MANUAL DE OPERACION DEL ESPECTRONIC 20  
Derechos Reservados 1981
- 49.-Coleman  
MANUAL DE OPERACION DEL ESPECTROFOTOMETRO JUNIOR II  
Derechos Reservados 1983
- 50.-Silverstein, Bassler, Marill  
ESPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF ORGANICA COMPOUNDS  
5a. ed.  
Wiley, New York 1991
- 51.-Summer, Lumir  
ANALYTIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY IN THE VISIBLE AND  
ULTRAVIOLET: THE PRINCIPLES.  
Elsevier, Amsterdam 1989
- 52.-P.S. Zurer  
Determinación de compuestos biológicos por método espectrofotométrico  
CHEM ENG NEWS  
Nov. 28, pag 24 1983
- 53.-Passey R.B., Gillum R.L.; Fuller J.B.; Urry R.M. and M.L.  
Evaluation and comparison of 10 glucose methods and the reference method  
recomended in the proposed product classs standard.  
Clin, Chem; 23:131 1977
- 54.-Mansberg  
TECNICAS OPTICAS DEL CONTEO DE PARTICULAS  
Avances en analisis automatizado 1988
- 55.-Bender, Garyt  
METODOS INSTRUMENTALES DE ANALISIS EN QUIMICA CLINICA  
Editorial Acribia  
Zaragoza, España 1992